

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie

ANNÉE 2013

THÈSE N°

**Bénéfices de la combinaison Fingolimod/Sunitinib malate sur un modèle de
cancer du sein chez le rat.**

Quel avenir pour le Gilenva (Fingolimod) en cancérologie ?

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le 10 juin 2013

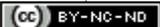
par

Yoanne MOUSSEAU

né le 24/08/1977, à Guéret

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. le Professeur Jacques Buxeraud	Président
M. le Professeur Alexis Desmoulière	Juge
Mme le Docteur Voa Ratsimbazafy	Juge
Mme le Docteur Hélène Chable	Juge
Mme le Docteur Jeanne Cook-Moreau	Juge



UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie

ANNÉE 2013

THÈSE N°

**Bénéfices de la combinaison Fingolimod/Sunitinib malate sur un modèle de
cancer du sein chez le rat.**

Quel avenir pour le Gilenva (Fingolimod) en cancérologie ?

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le 10 juin 2013

par

Yoanne MOUSSEAU

né le 24/08/1977, à Guéret

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. le Professeur Jacques Buxeraud	Président
M. le Professeur Alexis Desmoulière	Juge
Mme le Docteur Voa Ratsimbazafy	Juge
Mme le Docteur Hélène Chable	Juge
Mme le Docteur Jeanne Cook-Moreau	Juge



DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**

1^{er} VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNERE**, Maître de Conférences

2^{ème} VICE-DOYEN : Monsieur Serge **BATTU**, Maître de Conférences

PROFESSEURS :

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DREYFUSS Gilles IMMUNOLOGIE	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-
DUROUX Jean-Luc INFORMATIQUE	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
LOUDART Nicole	PHARMACOLOGIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

LACHATRE Gérard

TOXICOLOGIE

MOESCH Christian

HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT

ROGEZ Sylvie

BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

BATTU Serge

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

BEAUBRUN-GIRY Karine

PHARMACOTECHNIE

BILLET Fabrice

PHYSIOLOGIE

CALLISTE Claude
INFORMATIQUE

BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET

CLEDAT Dominique

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

COMBY Francis

CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE

COURTIOUX Bertrand

PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE

DELEBASSEE Sylvie
IMMUNOLOGIE

MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-

DEMIOT Claire-Elise

PHARMACOLOGIE

FAGNERE Catherine

CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE

FROISSARD Didier

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE

JAMBUT Anne-Catherine

CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE

LABROUSSE Pascal

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE

LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne IMMUNOLOGIE	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
SIMON Alain	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
TROUILLAS Patrick INFORMATIQUE	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET
VIGNOLES Philippe INFORMATIQUE	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET

PROFESSEUR :

ROUMIEUX Gwenhaël ANGLAIS

ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

IMBERT Laurent CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

Remerciements

Delphine,

Quand je t'ai dis que j'allais remettre ça, une fois encore, tu m'as soutenu. Les cinq dernières années ne se sont pas écoulées comme un long fleuve tranquille alors ta présence m'a été indispensable. Pour l'avenir qui se nourrit du passé, merci.

Maman,

Ma première thèse n'était finalement qu'une étape, j'espère que celle-ci t'emplira à nouveau de fierté.

Papa,

Je n'ai pas pu terminer ce travail avant que tu ne nous quittes. Quelques mois seulement nous aurons manqué pour pouvoir partager ce moment. C'est accompagné de ton souvenir que je présenterai ce travail.

Elyse, Agathe,

Cette histoire est longue, un peu compliquée, mais je vous la raconterai avec plaisir dans quelques années. Au-delà du travail que j'ai réalisé, c'est surtout l'environnement dans lequel je l'ai fait qui mérite d'être raconté.

David, Anthony, François, Cyril et le reste de la clique

Vous m'avez copieusement charrié lorsque je vous ai appris que j'allais reprendre mes études pour suivre le cursus de pharmacie après ma thèse de science. Je suis au regret de vous annoncer que cette source de raillerie va se tarir mais, rassurez-vous, je ne désespère pas d'en trouver une autre.

Monsieur le Professeur Jacques BUXERAUD

Professeur des Universités de Chimie Thérapeutique,
Faculté de Pharmacie de Limoges,

Je vous remercie de participer au jury de cette thèse et d'avoir pris le temps d'examiner et de juger mon travail. Votre approche pédagogique et votre science du VIDAL font de vous, selon moi, un des meilleurs enseignants de cette faculté.

Monsieur le Professeur Alexis DESMOULIERE

Professeur des Universités de Physiologie,
Faculté de Pharmacie de Limoges,

Je vous remercie d'avoir à nouveau accepté de juger mon travail dans le cadre, cette fois, de la thèse de pharmacie.

Madame le Docteur Jeanne COOK-MOREAU,

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

Ta constante bienveillance et ta délicatesse pendant les dix années au cours desquelles nous avons travaillé ensemble font définitivement de toi ma texane préférée. Tes qualités professionnelles m'ont évidemment conduit vers toi afin de diriger ma thèse. Mon avenir professionnel n'étant plus à Limoges, j'espère maintenir le lien malgré la distance.

Madame le Docteur Hélène CHABLE-RABINOVITCH,

Maître de Conférence des Universités de Biochimie,
Faculté de Médecine de Limoges,

Praticien Hospitalier, Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, C.H.U. de Limoges,
Je vous remercie de juger mon travail et de participer au jury de cette thèse. J'espère que les quatre ans et demi passés à vos côtés dans le service de Biochimie ne vous laisseront pas un trop mauvais souvenir. Même si je suis confiant quant à la conduite du service, je vous souhaite tout de même bon courage, car il me semble que le meilleur est à venir.

Madame le Docteur Karine DURAND,

Maître de Conférence des Universités de Biologie Cellulaire,
Faculté de Médecine de Limoges,

Merci pour ton aide dans le travail et ton amitié durant ces dix années passées à Limoges. Bon courage pour la suite de ton cursus de Pharmacie. J'aurai peut-être l'opportunité d'assister à ta thèse ... Prends bien soin des étudiants en médecine et surtout de ta petite famille qui, je l'espère, s'agrandira bientôt.

Monsieur le Docteur Yasser BAAJ,

Praticien Hospitalier Attaché, Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, C.H.U. de Limoges,

Ces quelques années au cours desquelles nous fumant intermittents du spectacle « Biochimique », m'ont permis de rencontrer un ami sincère. Ne désespère pas, lorsque la grenade aura explosé, nous nous retrouverons peut-être sous des cieux plus clément. In cha'Allah !

Droits d'auteurs



Cette création est mise à disposition selon le Contrat : « **Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification** » disponible en ligne

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/>

Liste des abréviations

Ang : Angiopoïétine
ARNi : ARN interférence
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ATP : Adénosine triphosphate
bFGF: Basic Fibroblasts growth factor
BSA : Albumine sérique bovine
CML : Cellules musculaires lisses
DEPC : Diethyl pirocarbonate
DMEM : Milieu minimum essentiel Dulbecco's modification de Eagle
DMSO : Diméthyl sulfoxyde
DO : Densité optique
ECL : « Enhancer chemiluminescence » : amplificateur de chimioluminescence
EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique
ERK : Extracellular signal regulated kinase
FITC : Fluoresceine Iso Thio Cyanate
GRB2 : Growth factor receptor-bound protein 2
GTP : Guanosine 5'-TriPhosphate
HEPES : Acide N-[2-hydroxyéthyl]piperazine-N'-[2-éthanesulfonide]
HIF : Hypoxia Inducible Factors
HRE: Element de reponse à l'hypoxie
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
kb : Kilo bases
kDa : Kilo daltons
MEC : Matrice extracellulaire
MEK : MAP/ERK kinase
MMP : Matrix metalloproteinase
miRNA : micro interfering RNA
pb : Paire de base
PBS : Phosphate buffer saline
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
PDGF: Platelet-derived growth factor
PDGFR-β: Platelet-derived growth factor receptor beta
PM : Poids Moléculaire
RISC : RNA-induced silencing complex
RNase : Ribonucléase
RPM : Rotations par minute
SDS : Sodium dodécyl sulfate
shARN : short hairpin ARN
siRNA : small interfering RNA
SVF : Sérum de veau foetal
S1P : Sphingosine-1-phosphate

S1PR1 : Sphingosine-1-phosphate receptor 1
S1PR2 : Sphingosine-1-phosphate receptor 2
S1PR3 : Sphingosine-1-phosphate receptor 3
TGF : Transforming growth factor
TNF α : Tumor Necrosis Factor α
UV : Ultraviolet
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VSMC : Vascular Smooth Muscle Cell (=CML)

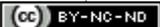


Table des matières

Introduction	16
1. Situation du sujet.....	18
1.1. Le Fingolimod (FTY-720 ; Gilenya®)	18
1.1.1. Structure et propriétés chimiques.....	18
1.1.2. Forme pharmaceutique.....	20
1.1.3. Indications thérapeutiques	20
1.1.4. Posologie et mode d'administration.....	21
1.1.5. Propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques	21
1.1.5.1. Mécanisme d'action	21
1.1.5.2. Effets pharmacodynamiques	22
1.1.5.3. Propriétés pharmacocinétiques	23
1.1.5.4. Contre-indications	25
1.1.6. Autres applications potentielles pour le fingolimod	27
1.1.6.1. Transplantation	27
1.1.6.2. Maladies autoimmunes	27
1.1.6.3. Cancer	28
1.2. L'angiogenèse tumorale.....	29
1.2.1. Structure de la paroi vasculaire.....	29
1.2.1.1. L'intima	30
1.2.1.2. La media	31
1.2.1.3. L'adventice.....	32
1.2.2. L'angiogenèse	32
1.2.3. L'artériogenèse	40
1.2.4. Mécanismes cellulaires.....	47
1.2.4.1. Dégradation de la matrice et MMPs	47
1.2.4.2. Cellules vasculaires et cytokines.....	48
1.2.5. Mécanismes moléculaires.....	54
1.2.6. Cibles thérapeutiques	58
1.3. Les traitements en cancérologie	59
1.3.1. Chimiothérapies cytotoxiques	60
1.3.2. Thérapies ciblées.....	61
1.3.2.1. L'hormonothérapie	62
1.3.2.2. HER2/ErbB2 comme cible thérapeutique	63
1.3.2.3. Chimiothérapies ciblant l'angiogenèse tumorale.....	66
1.3.3. L'avenir thérapeutique : du profilage des tumeurs aux combinaisons de traitements.....	71
2.1. Réactifs	73
2.2. Cultures cellulaires	73
2.3. Croissance cellulaire.....	73
2.4. Migration cellulaire en gel d'agarose.....	74
2.4.1. Composition du gel d'agarose.....	74
2.4.2. Différentes configurations de puits	75
2.4.2.1. Puits rapprochés	75
2.4.2.2. Puits distants.....	75
2.5. Interférence ARN.....	77
2.5.1. Sélection des siRNAs	77
2.5.2. Transfection avec la Lipofectamine™ 2000.....	78
2.6. Culture cellulaire en 3 dimensions	79
2.7. Modèle animal de cancer du sein	79
2.8. Immunomarquages.....	81
2.8.1. Immunocytochimie	81
2.8.1.1. Immunomarquage	81
2.8.1.2. Quantification du signal fluorescent.....	82

2.8.2. Immunohistochimie	83
2.9. Analyses statistiques	83
3. Résultats / Discussion:	84
3.1. Rôles des récepteurs de la S1P sur la migration des VSMCs induite par le PDGF-B	84
3.2. Rôle des voies de signalisation de la S1P et du PDGF-B sur le recrutement des VSMCs par les cellules endothéliales ou tumorales.....	85
3.3. Le blocage de la voie du signal PDGF-B/S1P perturbe l'organisation spatiale des VSMCs	87
3.4. Synergie du sunitinib malate et du fingolimod pour inhiber la croissance des tumeurs mammaires et leurs disséminations métastatiques.....	89
3.5. Le fingolimod induit une normalisation de la vascularisation des tumeurs.....	92
3.6. Discussion	94
3.7. La S1P régule négativement la prolifération et la migration des VSMCs induites par le PDGF-B.....	97
3.8. Rôle des récepteurs de la S1P sur la migration des VSMCs induite par la S1P ou le PDGF-B.....	100
3.9. Régulation de l'expression des récepteurs de la S1P par le fingolimod	101
3.10. Effet du fingolimod sur la croissance des VSMCs induite par le PDGF-B.....	103
3.11. Effet du fingolimod sur la migration des VSMCs induite par le PDGF-B.....	104
3.12. Discussion	106
Conclusion	110
Références bibliographiques	112

Introduction

La revue de la littérature ainsi que les données expérimentales antérieures obtenues dans le laboratoire de biochimie du CHU de Limoges montrent que la voie de signalisation de la sphingosine-1-phosphate (S1P) constitue un acteur clé du recrutement des cellules murales vasculaires au cours de l'angiogenèse tumorale. Toutefois, la S1P peut agir sur une grande variété de types cellulaires. En effet, le signal induit par la S1P est connu pour son action sur les cellules du système immunitaire et du système nerveux.

Ainsi, en 2011, la FDA (Food and Drug Administration) a donné son autorisation pour l'utilisation en clinique humaine d'un analogue de la sphingosine-1-phosphate, le fingolimod. Commercialisé sous le nom de Gilenya® (Novartis), le fingolimod est actuellement indiqué dans le traitement de la sclérose en plaque (SEP).

Au-delà de cette indication thérapeutique, la pharmacologie complexe de cette molécule permet d'envisager d'autres applications potentielles. Tantôt présenté comme un agoniste de la voie de signalisation de la S1P, tantôt comme un antagoniste, différentes études ont déjà mis en évidence certaines propriétés du fingolimod permettant de limiter la croissance de cellules cancéreuses ou d'inhiber l'angiogenèse tumorale.

Dans cette optique, nous avons comparé les propriétés anti-cancéreuses du fingolimod à celles d'autres molécules déjà utilisées en chimiothérapie. Plus particulièrement, nous avons cherché à identifier et caractériser les bénéfices de l'administration du fingolimod combinée à celle du sunitinib malate (Sutent®, Pfizer) sur un modèle de cancer du sein chez le rat. Afin de mieux appréhender les mécanismes moléculaires mis en jeu par cette combinaison de traitement, nous en avons aussi étudié les effets sur un modèle de cellules vasculaires *in vitro*.

Si les résultats présentés ici ne peuvent constituer qu'un travail préliminaire à des études cliniques, ils permettent toutefois d'envisager une future utilisation du fingolimod parmi les thérapies ciblées utilisées en cancérologie et ce d'autant que cette molécule a déjà

passé toutes les étapes de validation pharmacologiques et toxicologiques pour obtenir ses autorisation de mise sur le marché.

1. Situation du sujet

1.1. Le Fingolimod (FTY-720 ; Gilenya®)

1.1.1. Structure et propriétés chimiques

Le fingolimod (FTY 720) est un analogue structural de la sphingosine-1-phosphate (S1P) (Fig. 1). Il doit être phosphorylé par la sphingosine kinase 2 (SK2), intracellulaire, afin d'acquérir sa forme active [1].

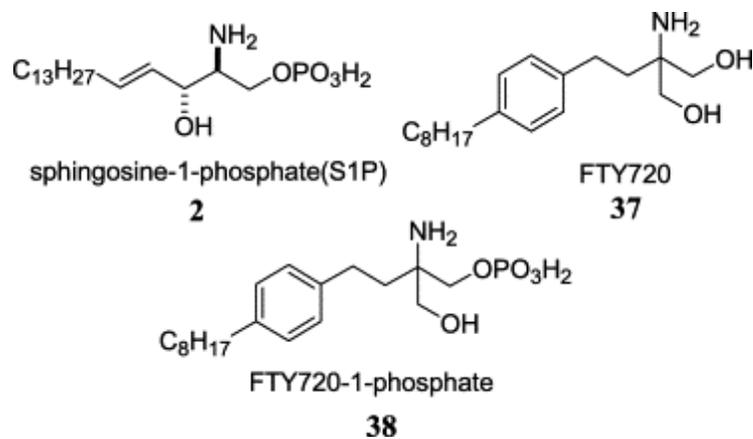


Figure 1 : Formules chimiques du Fingolimod (FTY 720) et de sa forme active [2].

Le fingolimod possède une très faible solubilité dans les solvants aqueux. Il peut être dissout dans l'éthanol ou le DMSO à une concentration de l'ordre de 100 mg/mL. Son sel, fingolimod-HCl (P.M. :343 ,93 ; C₁₉H₃₃NO₂•HCl) peut être dissout dans du DMSO puis dilué dans un solvant aqueux comme un tampon phosphate à pH 7 jusqu'à une concentration de 10 mM.

La structure des agonistes des récepteurs de la sphingosine-1-phosphate (S1P), tel que le fingolimod, peut être envisagée en trois parties aux fonctions distinctes. La tête correspond à l'extrémité portant le groupement phosphate. C'est cette partie qui se lie au site actif des récepteurs de la S1P. La queue est formée par une longue chaîne hydro-

carbonnée. Enfin, le « linker » constitue un axe autour duquel s'articulent la tête et la queue de la molécule (Fig. 2).

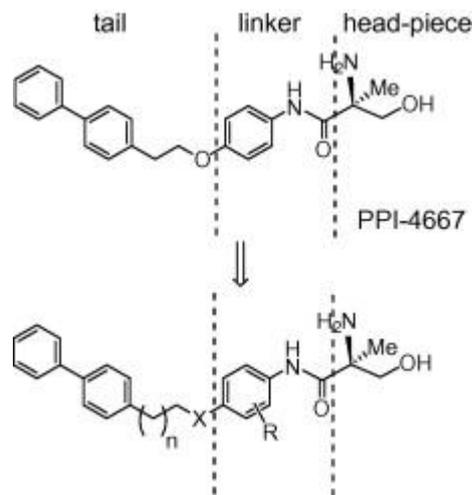


Figure 2: Structure des analogues des récepteurs de la sphingosine-1-phosphate [3].

La S1P étant une cytokine aux actions pléiotropiques dans l'organisme, la recherche de nouveaux agonistes de sa voie de signalisation est très dynamique. Ainsi, Elindar *et al.* ont montré récemment que l'introduction de groupements phénylamides et phénylimidazoles au niveau du « linker » de l'agoniste permet d'en augmenter la solubilité et la spécificité [4]. En effet, ces groupements stabilisent la queue de la molécule et optimisent l'orientation de la tête qui se fixe au site actif du récepteur. Par rapport au FTY-720, cette modification de structure de nouveaux agonistes a permis d'augmenter de 100 à 500 fois leur sélectivité vis-à-vis du récepteur S1PR1 *versus* S1PR3 (Fig. 3). Toutefois, ces molécules prometteuses n'en sont encore qu'aux phases précoces de développement.

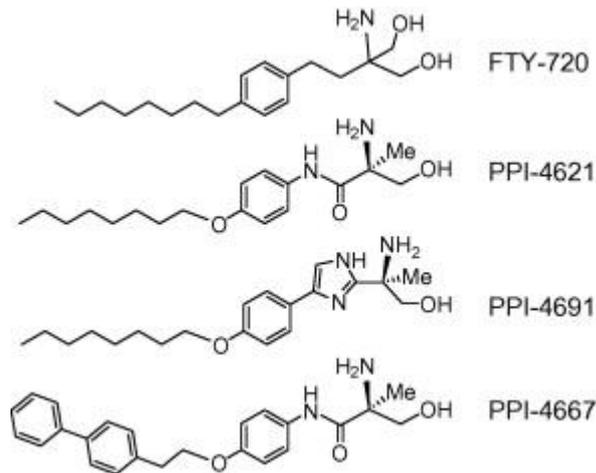


Figure 3: Analogues du FTY-720 en cours de développement [4].

1.1.2. Forme pharmaceutique

La spécialité pharmaceutique issue du fingolimod est un produit des laboratoires NOVARTIS commercialisée sous le nom de GILENYA 0,5 mg. Cette spécialité se présente sous forme de gélule de 16 mm avec une coiffe opaque jaune vif et un corps opaque blanc. Elle porte l'inscription « FTY0.5 mg » imprimée à l'encre noire sur la coiffe et deux bandes radiales imprimées à l'encre jaune sur le corps.

1.1.3. Indications thérapeutiques

Gilenya® est indiqué en monothérapie comme traitement de fond des formes très actives de sclérose en plaques (SEP) rémittente-récurrente pour les groupes de patients suivants :

- patients présentant une forme très active de la maladie malgré un traitement par interféron bêta ;
- patients présentant une sclérose en plaques rémittente-récurrente sévère et d'évolution rapide.

1.1.4. Posologie et mode d'administration

Le traitement doit être instauré et supervisé par un médecin expérimenté dans la prise en charge de la sclérose en plaques. La posologie recommandée est d'une gélule de 0,5 mg par voie orale une fois par jour. Gilenya® peut être pris au cours ou en dehors des repas. En cas d'omission d'une dose, le traitement doit être poursuivi en prenant la dose suivante comme prévu. Les patients peuvent passer directement de l'interféron bêta ou de l'acétate de glatiramère à Gilenya® à condition de ne pas présenter de signes d'anomalies significatives liées au traitement, comme une neutropénie.

1.1.5. Propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques

1.1.5.1. Mécanisme d'action

Le fingolimod est métabolisé par la sphingosine kinase 2 (SK2) en phosphate de fingolimod, son métabolite actif, et se lie à des concentrations nanomolaires aux récepteurs de la sphingosine 1-phosphate de type 1 (S1PR1) présents sur les lymphocytes. Il traverse facilement la barrière hémato-encéphalique pour se lier aux récepteurs S1PR1 situés sur les cellules neurales dans le système nerveux central. En agissant comme un antagoniste fonctionnel des récepteurs de la S1P sur les lymphocytes, le phosphate de fingolimod provoque leur séquestration dans les ganglions lymphatiques, ce qui entraîne une redistribution des lymphocytes, plutôt qu'une déplétion [5]. Cette redistribution diminue l'infiltration lymphocytaire pathogène du système nerveux central, qui serait responsable de l'inflammation des nerfs et de lésions du tissu nerveux.

Si ces mécanismes justifient les indications thérapeutiques actuelles du fingolimod, son action semble bien plus complexe. En effet, les récepteurs de la S1P sont exprimés par une grande variété de types cellulaires et le fingolimod-phosphate est capable d'activer 4 de ces récepteurs (S1PR1, S1PR3, S1PR4, S1PR5), S1PR2 étant l'exception [6]. De plus, le fingolimod a un effet biologique distinct de celui du fingolimod-phosphate. Par exemple, le fingolimod-phosphate inhibe l'autotaxine [7] alors que le fingolimod inhibe la phospholipase

A2 [8], la sphingosine lyase-1 [9], la sphingosine kinase-1 [10] et la ceramide synthase [11] et active la protéine phosphatase A2 [12]. Compte tenu de la complexité des effets pharmacologiques du fingolimod de nombreuses études se poursuivent afin de mieux caractériser les effets de cette molécule dans divers champs d'applications allant des maladies auto-immunes au cancer.

1.1.5.2. Effets pharmacodynamiques

Dans les 4 à 6 heures suivant la première administration de fingolimod 0,5 mg, le taux de lymphocytes dans le sang périphérique diminue d'environ 75 %. Avec une administration quotidienne continue, le taux de lymphocytes continue à diminuer sur une période de deux semaines, pour atteindre un taux minimal d'environ 500 cellules/ μ L ou environ 30 % de la valeur initiale. Un taux minimal inférieur à 200 cellules/ μ L a été observé chez 18 % des patients lors d'au moins un contrôle de la numération. Des taux de lymphocytes faibles sont maintenus en cas d'administration quotidienne chronique. La majorité des lymphocytes T et B circulants transitent en permanence par les organes lymphoïdes et sont les principales cellules ciblées par le fingolimod. Environ 15 à 20 % des lymphocytes T ont un phénotype de cellules T mémoires effectrices, cellules jouant un rôle important dans la surveillance immunitaire périphérique. La caractéristique de ce sous-groupe de lymphocytes étant de ne pas pénétrer dans les organes lymphoïdes, ils ne sont pas affectés par le fingolimod. L'augmentation du taux de lymphocytes périphériques est manifeste en quelques jours après l'arrêt du traitement et en général, le taux revient à la normale en un à deux mois. L'administration chronique de fingolimod entraîne une légère diminution du taux de neutrophiles, à environ 80 % de la valeur initiale. Le fingolimod n'a pas d'effet sur les monocytes.

Le fingolimod provoque une diminution transitoire de la fréquence cardiaque et diminue la conduction auriculo-ventriculaire en début de traitement. La diminution maximale de la fréquence cardiaque est observée dans les 6 heures suivant l'administration, 70 % de

l'effet chronotrope négatif étant atteint le premier jour. Avec la poursuite du traitement, la fréquence cardiaque revient à sa valeur initiale en un mois. La diminution de la fréquence cardiaque induite par le fingolimod peut être inversée par l'administration parentérale d'atropine ou d'isoprénaline. Le salmétérol inhalé s'est révélé avoir un effet chronotrope positif modeste. Une augmentation des extrasystoles auriculaires est observée lors de l'instauration du traitement par fingolimod, mais sans incidence accrue des fibrillation/flutter auriculaires ou des arythmies ou ectopies ventriculaires. Le traitement par fingolimod n'est pas associé à une diminution du débit cardiaque. Il n'affecte pas non plus les réponses cardiaques autonomes, incluant la variation diurne de la fréquence cardiaque et la réponse à l'effort.

L'administration de doses uniques ou répétées de 0,5 mg et 1,25 mg de fingolimod pendant deux semaines n'est pas associée à une augmentation détectable de la résistance des voies aériennes, mesurée par le VEMS et le débit expiratoire maximal (DEM) 25-75. Cependant, des doses uniques de fingolimod ≥ 5 mg (soit 10 fois la dose recommandée) sont associées à une augmentation dose-dépendante de la résistance des voies aériennes. L'administration de doses répétées de 0,5 mg, 1,25 mg ou 5 mg de fingolimod n'est pas associée à une diminution de l'oxygénation ou à une désaturation en oxygène lors de l'effort ou à une augmentation de la réactivité des voies aériennes à la méthacholine. Les sujets traités par fingolimod ont une réponse bronchodilatatrice normale aux bêta-agonistes inhalés.

1.1.5.3. Propriétés pharmacocinétiques

Les données pharmacocinétiques ont été obtenues chez des volontaires sains, des patients transplantés rénaux et des patients atteints de sclérose en plaques.

Le métabolite pharmacologiquement actif à l'origine de l'efficacité est le phosphate de fingolimod.

1.1.5.3.1. Absorption

Le fingolimod est lentement absorbé (t_{max} de 12 à 16 heures) et de façon importante ($\geq 85\%$). La biodisponibilité orale absolue apparente est de 93 % (intervalle de confiance à 95 % : 79-111 %). Après administration une fois par jour, l'état d'équilibre des concentrations sanguines est atteint en 1 à 2 mois et les concentrations à l'état d'équilibre sont environ 10 fois supérieures à celles observées après la dose initiale.

L'alimentation ne modifie pas la C_{max} ou l'ASC (exposition) du fingolimod. La C_{max} du phosphate de fingolimod est légèrement augmentée de 34 % mais l'ASC n'est pas modifiée. Par conséquent, Gilenya® peut être pris au cours ou en dehors des repas.

1.1.5.3.2. Distribution

Le fingolimod se distribue de façon importante dans les érythrocytes, la fraction liée aux cellules sanguines étant de 86 %; celle du phosphate de fingolimod est plus faible (< 17 %). Le fingolimod et le phosphate de fingolimod sont fortement liés aux protéines (à plus de 99 %).

Le fingolimod est largement distribué dans les tissus corporels, avec un volume de distribution d'environ $1\ 200 \pm 260$ litres.

1.1.5.3.3. Métabolisme

Chez l'homme, le fingolimod est transformé par phosphorylation stéréosélective réversible en énantiomère (S) de phosphate de fingolimod pharmacologiquement actif. Le fingolimod est éliminé par métabolisme oxydatif essentiellement par l'isoenzyme 4F2 du cytochrome P450, puis dégradation similaire à celles des acides gras en métabolites inactifs ainsi que par formation d'analogues du fingolimod de type céramide non polaires pharmacologiquement inactifs. L'isoenzyme principale impliquée dans le métabolisme du fingolimod est partiellement identifiée et peut être soit le CYP4F2 ou le CYP3A4.

Après administration orale d'une dose unique de fingolimod marqué au ^{14}C , les principaux composés apparentés au fingolimod dans le sang, évalués par leur contribution à l'ASC de la radioactivité totale jusqu'au 34^{ème} jour post-dose, sont le fingolimod (23 %), le phosphate de fingolimod (10 %) et les métabolites inactifs (métabolite acide carboxylique M3 [8 %], métabolite céramide M29 [9 %] et métabolite céramide M30 [7 %]).

1.1.5.3.4. Elimination

La clairance sanguine du fingolimod est de $6,3 \pm 2,3$ L/h et la demi-vie terminale apparente moyenne ($t_{1/2}$) est de 6 à 9 jours. Les concentrations sanguines de fingolimod et de phosphate de fingolimod diminuent parallèlement pendant la phase terminale, avec des demi-vies comparables pour les deux composés.

Après administration orale, environ 81 % de la dose sont excrétés lentement dans les urines sous forme de métabolites inactifs. Le fingolimod et le phosphate de fingolimod ne sont pas éliminés sous forme inchangée dans les urines mais sont les principaux composants retrouvés dans les fèces, à des quantités représentant pour chacun moins de 2,5 % de la dose. Après 34 jours, 89 % de la dose administrée sont retrouvés.

1.1.5.4. Contre-indications

Diverses contre-indications sont mentionnées au niveau du RCP Vidal.

- Patients ayant un risque accru d'infections opportunistes, en particulier les patients présentant une immunodéficience (incluant les patients recevant un traitement immunosuppresseur ou les patients immunodéprimés par un traitement antérieur).
- Infections actives sévères, infections chroniques actives (hépatite, tuberculose).
- Cancers diagnostiqués en évolution, à l'exception des carcinomes cutanés basocellulaires.
- Insuffisance hépatique sévère (classe C de Child-Pugh).
- Hypersensibilité à la substance active ou à l'un des excipients.

La liste des effets indésirables est présentée dans le tableau suivant (Tableau 1).

Tableau 1 : Liste des effets indésirables (EMA 2011).

Infections	
Très fréquent :	Infections grippales
Fréquent :	Infections à <i>Herpes virus</i> Bronchite Sinusite Gastro-entérite Dermatophyties
Peu fréquent :	Pneumonie
Affections hématologiques et du système lymphatique	
Fréquent :	Lymphopénie Leucopénie
Affections psychiatriques	
Fréquent :	Dépression
Peu fréquent :	Humeur dépressive
Affections du système nerveux	
Très fréquent :	Céphalées
Fréquent :	Sensation vertigineuse Paresthésies Migraine
Affections oculaires	
Fréquent :	Vision trouble Douleur oculaire
Peu fréquent :	Oedème maculaire*
Affections cardiaques	
Fréquent :	Bradycardie Bloc auriculo-ventriculaire (BAV)
Affections vasculaires	
Fréquent :	Hypertension
Affections respiratoires, thoraciques et médiastinales	
Très fréquent :	Toux
Fréquent :	Dyspnée
Affections gastro-intestinales	
Très fréquent :	Diarrhée
Affections de la peau et du tissu sous-cutané	
Fréquent :	Eczéma Alopécie Prurit
Affections musculo-squelettiques et systémiques	
Très fréquent :	Dorsalgies
Troubles généraux et anomalies au site d'administration	

Fréquent :	Asthénie
Investigations	
Très fréquent :	Elévation de l'alanine aminotransférase (ALAT)
Fréquent :	Elévation de la gamma-glutamyl transférase (GGT) Elévation des enzymes hépatiques Anomalies des paramètres hépatiques Hypertriglycémie Perte de poids
Peu fréquent :	Diminution du taux de neutrophiles

1.1.6. Autres applications potentielles pour le fingolimod

1.1.6.1. Transplantation

Le fingolimod apparaît comme un promoteur de la survie des allogreffes chez l'homme et sur différents modèles animaux en séquestrant les lymphocytes T dans le tissu lymphoïde périphérique [13].

Ce mécanisme de séquestration se traduit selon les modalités suivantes [14] :

- le fingolimod conduit les lymphocytes T dans les ganglions lymphoïdes périphériques sur un mode chimiotactique ;
- le fingolimod induit une régulation négative de l'expression des récepteurs de la sphingosine-1-phosphate à la surface des lymphocytes T ; ceci inhibe alors leur migration suivant le gradient de concentration en S1P ;
- le fingolimod bloque la barrière stromale de la face adluminale de l'endothélium lymphatique.

1.1.6.2. Maladies auto-immunes

Les propriétés du fingolimod permettent de réduire une réponse immunitaire excessive dans un contexte pathologique [15]. Son efficacité a été démontrée sur des

modèles expérimentaux d'encéphalomyélites auto-immunes ainsi que sur plusieurs modèles animaux de lupus érythémateux systémiques et de myocardites auto-immunes [16].

1.1.6.3. Cancer

Les effets anti-tumoraux et anti-angiogéniques du fingolimod ont été décrits en liaison à une régulation négative du signal de la S1P [17-19].

Le fingolimod non phosphorylé induit une diminution de croissance et une apoptose de diverses lignées de cellules cancéreuses [17, 20]. Il inhibe la phosphorylation de protéines kinases intracellulaires telles que ERK1, ERK2 (Extracellular Regulated Kinases 1 and 2) et Akt qui sont des protéines impliquées dans les mécanismes de croissance et de migration cellulaires. Il active les caspases, les protéines kinases JNK (Janus Kinases) et PKC (Protein Kinase C) et augmente la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) [21].

Le fingolimod-phosphate, agoniste des récepteurs S1PR1, S1PR3, S1PR4 et S1PR5, inhibe la croissance et la vascularisation tumorale sur divers modèles de tumeurs murines [22] [23]. Il réduit le taux plasmatique d'acide lysophosphatidique (LPA) [7].

Contrairement au fingolimod-phosphate, le fingolimod exerce un effet anti-prolifératif sur des lignées cellulaires de cancer du sein et du colon *in vitro*. Ceci suggère que le fingolimod peut agir selon un mécanisme indépendant des récepteurs de la S1P. Toujours indépendamment des récepteurs de la S1P, le fingolimod inhibe la sphingosine kinase 1, conduisant à l'apoptose cellulaire, en modifiant le rhéostat céramides-sphingosine-S1P [24, 25].

Paradoxalement, sur un modèle de sphéroïdes *in vitro*, un effet anti-angiogénique comparable à celui du fingolimod a été obtenu avec le SEW2871. Le SEW2871 étant un agoniste sélectif du récepteur S1PR1, l'effet du fingolimod dans ce cas semble dépendant de S1PR1 et passe probablement par la forme phosphorylée de cette molécule [17].

Récemment, la capacité de potentialiser les effets d'inhibiteurs des récepteurs du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ont aussi été rapportés [26].

En conséquence, les effets anti-cancéreux du fingolimod apparaissent complexes, potentiellement contradictoires et nécessitent une exploration approfondie afin d'en évaluer le potentiel clinique en cancérologie.

1.2. L'angiogenèse tumorale

L'angiogenèse tumorale est un phénomène complexe faisant intervenir les différents types cellulaires composant la paroi vasculaire ainsi que de nombreuses cytokines. Suivant le gradient de cytokines sécrétées par la tumeur, de nouveaux vaisseaux vont se former à partir des vaisseaux sanguins existants les plus proches (Figure 4).

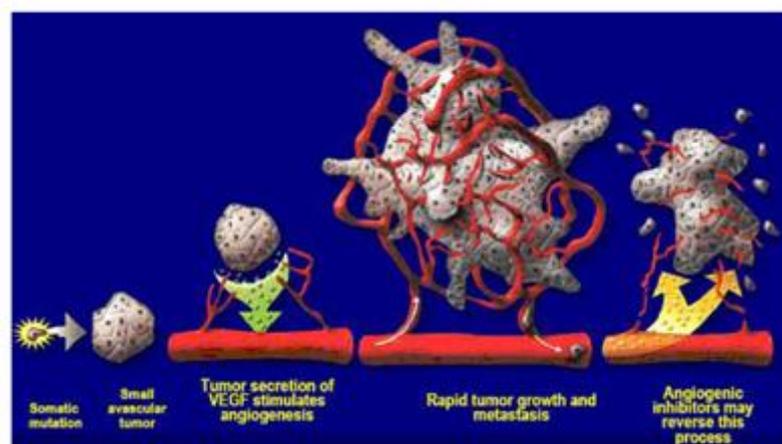


Figure 4 : Schéma général de l'angiogenèse tumorale et rôle des anti-angiogéniques {Griffoen, #310}.

1.2.1. Structure de la paroi vasculaire

Dans son état mature, stable, la paroi des vaisseaux de moyens et gros calibres, est constituée de trois couches distinctes possédant chacune une structure et des fonctions spécifiques (Figure 5). Les capillaires et les artérioles sont uniquement composés d'une couche de cellules endothéliales.

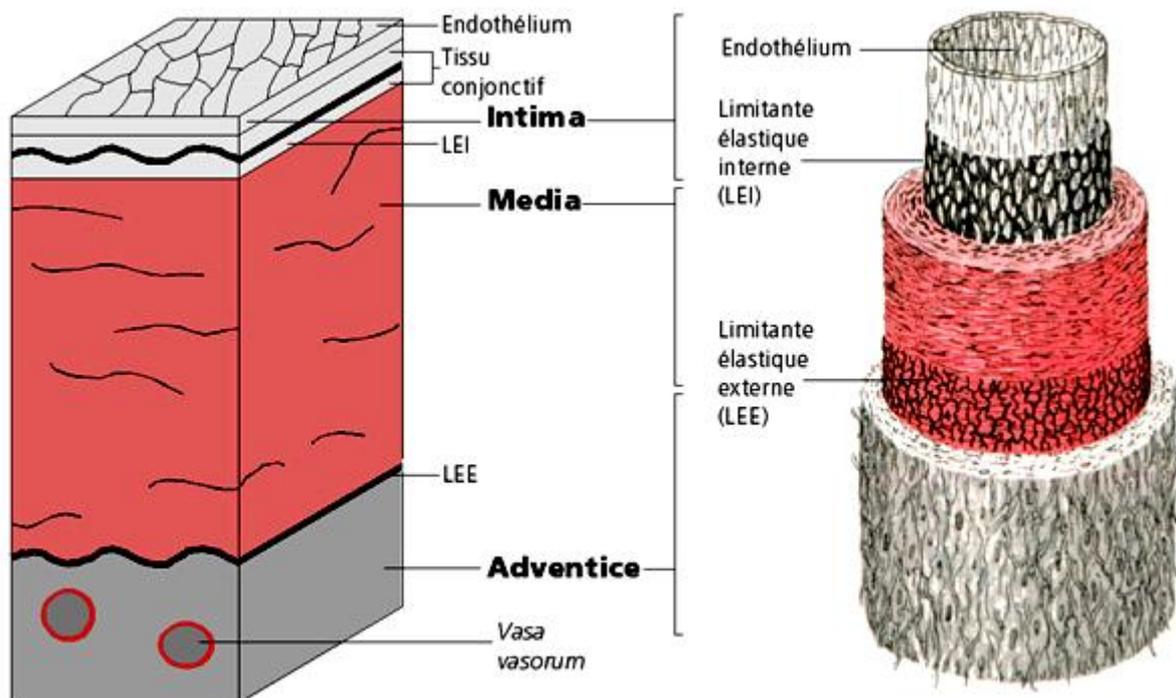


Figure 5 : Structure de la paroi vasculaire.

Une couche de cellules endothéliales compose la paroi interne (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.

1.2.1.1. L'intima

C'est la tunique la plus interne et la plus fine. Elle est constituée d'une couche unique de cellules endothéliales, d'une couche de tissu conjonctif fibro-élastique et d'une limitante élastique interne constituée d'élastine (absente dans de nombreux vaisseaux). Parfois, on observe un épaississement de la zone sous-intimale formant un coussinet intimal, constitué de cellules musculaires lisses et de macrophages. Ces épaississements sont observés dès la vie foetale et leur nombre augmente avec l'âge.

Les cellules endothéliales sont imbriquées les unes dans les autres et forment une couverture étanche. Cet endothélium possède différentes propriétés :

- des activités métaboliques : synthèse de substances vasoactives (EDRF, endothéline), conversion de l'angiotensine ;
- une thromborésistance : synthèse de prostaglandine I₂, d'antithrombine III, de β_2 -microglobuline, d'activateur tissulaire du plasminogène ;
- une fonction immunitaire : synthèse d'Interleukine-1.

La couche sous-endothéliale de tissu conjonctif contient des fibres de collagène, quelques fibres élastiques, des fibres musculaires lisses et des fibroblastes qui produisent des protéoglycannes, des glycosaminoglycannes (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. Il faut également noter que les héparane-sulfates sont produits par les cellules endothéliales.

1.2.1.2. La media

C'est la tunique moyenne, la plus épaisse, représentant le constituant principal de l'artère. Elle est essentiellement constituée de cellules musculaires lisses (CML), empilées de façon concentrique en couches appelées : unités lamellaires. Le nombre de ces couches varie suivant le type d'artère : une couche, pour les artérioles, plusieurs couches, pour les artères élastiques. Chaque unité lamellaire est composée de cellules musculaires lisses entourées d'une matrice extra-cellulaire constituée des protéines fibreuses et élastiques (collagène et élastine) et de muco-polysaccharides.

Hormis dans l'aorte thoracique, la media est avasculaire, à l'exception de 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.

1.2.1.3. L'adventice

C'est la tunique externe. 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.

1.2.2. L'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus naturel qui consiste à élaborer le réseau vasculaire lors du développement embryonnaire. Chez l'adulte, le système vasculaire est stable et seules 0,1 % des cellules endothéliales sont en activité de prolifération. On parle de néo-angiogenèse lors d'un développement vasculaire en réponse à des situations spécifiques telles que la cicatrisation, le développement musculaire ou adipeux et la maturation du corps jaune et de la muqueuse utérine [27]. L'angiogenèse physiologique est régulée par un

équilibre entre des facteurs pro-angiogéniques tel que le VEGF (vascular endothelial growth factor) et des facteurs anti-angiogéniques tels que l'angiostatine et l'endostatine. La rupture de l'équilibre entre ces facteurs pro et anti-angiogéniques, conduisant au développement vasculaire, constitue le « switch angiogénique ». La néo-angiogenèse peut aussi être activée dans des situations pathologiques comme l'arthrite, la rétinopathie diabétique et le cancer.

Le développement tumoral nécessite la mise en place d'une vascularisation riche et adaptée aux spécificités métaboliques des cellules cancéreuses. En effet, afin d'assurer leur prolifération, les cellules tumorales ont besoin d'un apport en oxygène et en nutriments proportionnel à leur forte consommation énergétique. Par ailleurs, il leur est également indispensable de pouvoir éliminer les déchets provenant de leur catabolisme. Tant que l'épaisseur de la tumeur est inférieure à 1 ou 2 mm³, la simple diffusion à travers la paroi des vaisseaux à proximité suffit généralement à permettre ces échanges [28]. La distance maximale entre le foyer tumoral et un vaisseau excède rarement 150 à 200 microns ; au-delà, la diffusion de l'oxygène n'est pas possible. Par ailleurs, dans une tumeur, l'activité mitotique diminue considérablement en s'éloignant des vaisseaux. La prolifération anarchique et rapide du tissu tumoral génère la formation de zones peu ou pas oxygénées au sein de la tumeur, ainsi que la compression des capillaires à proximité. Si la tumeur ne trouve pas le moyen d'augmenter ses apports en oxygène, elle entre en nécrose [29]. Les lésions précoces, telles que les carcinomes *in situ*, présentent une densité vasculaire normale. Cependant, les cellules tumorales se trouvent confinées par la membrane basale et donc relativement isolées du stroma vascularisé. En fonction de la capacité proliférative de la lésion, les diffusions de l'oxygène et du glucose vont très vite constituer des facteurs limitants. Des conditions d'hypoxie et d'acidose plus ou moins sévères vont exercer une pression importante sur les cellules tumorales, favorisant l'émergence de clones qui ont acquis des mécanismes d'utilisation, les plus efficaces possibles, des ressources énergétiques restreintes.

L'acquisition de ce profil métabolique particulier trouve sa place dans la liste des propriétés altérées, nécessaires à la transformation maligne. Sur le plan mécanistique, le profil repose sur l'augmentation du transport du glucose (surexpression de *GLUT1* ou *GLUT3*) ou sur l'efficacité de la phosphorylation (surexpression des hexokinases). L'expression constitutive de HIF-1 α fournit partiellement une explication, d'autant plus qu'une de ces cibles transcriptionnelles est le gène de l'hexokinase II.

La voie de signalisation en réponse aux conditions hypoxiques débute par l'activation du facteur HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor1 α). Celle-ci est induite par la molécule d'hème, par les espèces réactives de l'oxygène (ROS), produites par les mitochondries en cas de carences oxygéniques, ainsi que par des cascades de phosphorylations cytoplasmiques [30]. Les espèces réactives de l'oxygène ont en particulier une fonction de stabilisation du complexe HIF-1 α en réponse aux variations des potentiels d'oxydo-réduction [31].

Le complexe HIF-1 est constitué par deux sous-unités protéiques : HIF-1 β /ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), qui est continuellement exprimée, et HIF-1 α , qui n'est présente qu'au moment de la survenue de conditions hypoxiques. En fait, la sous-unité alpha est également synthétisée continuellement mais elle est systématiquement dégradée dans les conditions normoxiques, alors qu'elle s'accumule très rapidement dès l'apparition d'une carence en oxygène [32]. Il devient alors possible à HIF-1 α , en démasquant son signal de localisation nucléaire (NLS), d'être internalisée et transloquée au travers de la membrane nucléaire. Un facteur nucléaire ARNT est alors recruté par HIF-1 α et l'hétérodimère formé reconnaît la structure génique de l'élément de réponse à l'hypoxie (HRE). L'activation finale des promoteurs des gènes des facteurs de croissance est réalisée lorsque les coactivateurs transcriptionnels, CPB (CREP binding protein) et p300 terminent la complexation avec HIF-1 α -ARNT et HRE [33].

Pour échapper à la nécrose, la tumeur met en place un processus de néo-vascularisation qui se déroule schématiquement en deux temps. L'angiogenèse « précoce »

correspond à la déstabilisation de la paroi existante, à la dégradation de la matrice extracellulaire (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 néo-vaisseau, avec la migration et l'adjonction de cellules musculaires (péricytes et CMLs), qui stabilisent la paroi et protègent les cellules endothéliales.

La néo-angiogénèse tumorale suit quatre étapes principales :

- les cellules tumorales en hypoxie initient le processus par la sécrétion et la libération directe de facteurs pro-angiogéniques ;
- les cellules musculaires se détachent de la paroi vasculaire (péricytes et cellules musculaires lisses) ;
- les composants de la membrane basale et de la matrice extracellulaire sont dégradés, provoquant la libération de facteurs de croissance qui diffusent jusqu'aux vaisseaux pré-existants [34] ;
- les cellules endothéliales migrent et forment un nouveau capillaire pour irriguer la tumeur.

Lorsque la tumeur déclenche le processus angiogénique, le recrutement de nouveaux vaisseaux est assuré par l'expression d'une série de facteurs de croissance sécrétés par les cellules cancéreuses mais aussi les cellules du stroma, comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), dont les gènes sont régulés par le facteur sensible à l'hypoxie HIF-1 α [35], ainsi que le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) et de nombreux autres facteurs. 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 6). Sous la pression exercée par la prolifération des cellules endothéliales,

l'activation de 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 ce phénomène, restent largement méconnus.

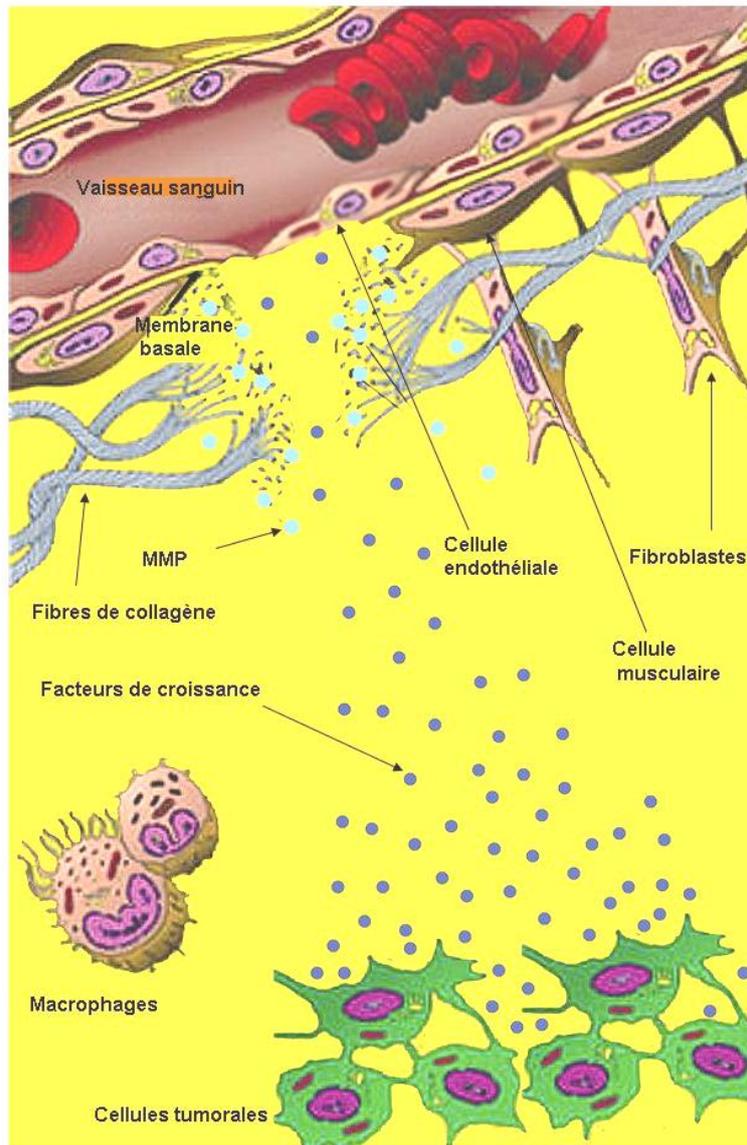


Figure 6 : Sécrétion de facteurs de croissance par les cellules tumorales et dégradation de la matrice extracellulaire.

Le remaniement de la MEC, et plus particulièrement de sa forme spécialisée que constitue la membrane basale vasculaire (MBV), constitue le premier changement structurel mis en place au cours de l'angiogenèse tumorale. Ce processus implique le remaniement du tissu de soutien par activation de cascades protéolytiques qui agiront sur la MEC. Ces cascades de réactions vont induire la production de collagénase, d'héparinase, d'activateur du plasminogène (uPA), de métalloprotéases de la matrice (MMP), 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, la matrice extracellulaire est composée 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, aussi appelée collagénase de type IV, 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, ou gélatinase B, lyse les fibres d'élastine et les noyaux protéiques des protéoglycanes [36, 37].

Parallèlement, les cellules endothéliales activées par les facteurs de croissance acquièrent de nouvelles caractéristiques de prolifération et d'invasion tissulaire. Elles se détachent de la matrice extra-cellulaire et migrent en direction du stimulus angiogénique libéré par la tumeur, amorçant ainsi le bourgeonnement orienté du vaisseau parental (Figure 7).

Les facteurs de croissance de l'endothélium des vaisseaux sanguins sont des molécules fondamentales dans la biologie tissulaire normale et pathologique, dont la

concentration doit être strictement contrôlée. Ainsi, l'inactivation d'un seul allèle du gène VEGF suffit à induire une létalité embryonnaire précoce. Ces facteurs angiogéniques qui commandent indirectement la formation des néo-vaisseaux sont synthétisés par les cellules cancéreuses lorsque certaines conditions limites sont atteintes. Ce sont ces conditions particulières, notamment hypoxiques, qui engendrent la surexpression des gènes des facteurs de croissance de l'endothélium des vaisseaux sanguins. A ce jour, il est connu que l'activation moléculaire initiale de la formation des néo-vaisseaux sanguins se fait par l'intermédiaire d'une interaction entre le récepteur VEGFR-1 (Flt-1) ou le récepteur VEGFR-2 (Flk-1, KDR), localisés sur l'endothélium des vaisseaux sanguins, et de nombreux facteurs de croissance tels le VEGF (ou VEGF-A), le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D, le VEGF-E ou encore le PlGF [38-42]. Il est actuellement décrit que VEGFR-1 est davantage impliqué dans la perméabilité cellulaire tandis que le récepteur VEGFR-2 est inducteur de l'effet mitogène et de la réponse proliférative des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins [43, 44].

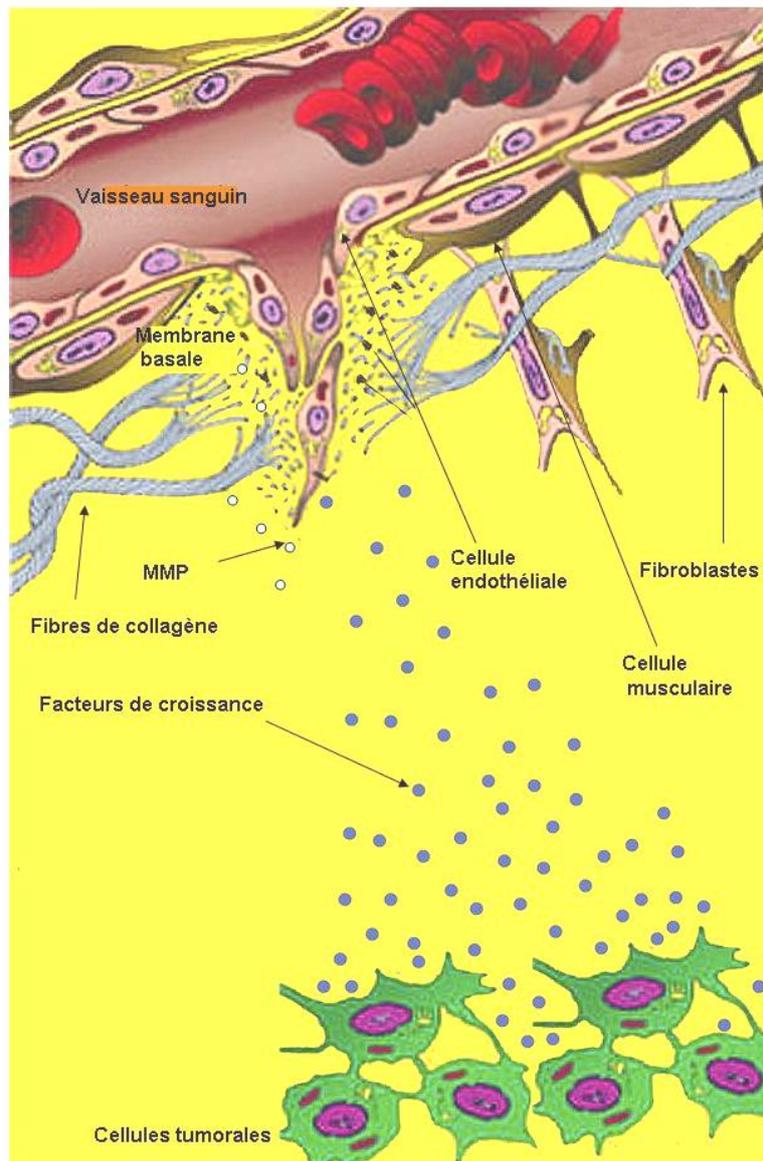


Figure 7 : Migration des cellules endothéliales sous l'impulsion des facteurs de croissance.

Par ailleurs, il est désormais connu que le récepteur VEGFR-1, qui peut être exprimé soit sous forme membranaire soit sous forme soluble, est plus spécifiquement activé par VEGF-A, VEGF-B et PlGF, alors que le récepteur VEGFR-2 semble davantage sous la dépendance des facteurs VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D et VEGF-E [45].

Le VEGF apparaît comme un acteur central dans l'initiation des mécanismes angiogéniques, en particulier concernant les cellules endothéliales. Toutefois, de nombreux autres facteurs de croissance interviennent et jouent un rôle important dans la prolifération, le recrutement et la migration des cellules endothéliales et musculaires lors de la phase « tardive » de l'angiogenèse ou artériogenèse.

1.2.3. L'artériogenèse

Cette phase « tardive » de l'angiogenèse tumorale se caractérise principalement par la formation d'une « néo-media » qui va stabiliser la structure du bourgeon capillaire essentiellement composé jusque là de cellules endothéliales (Figure 8).

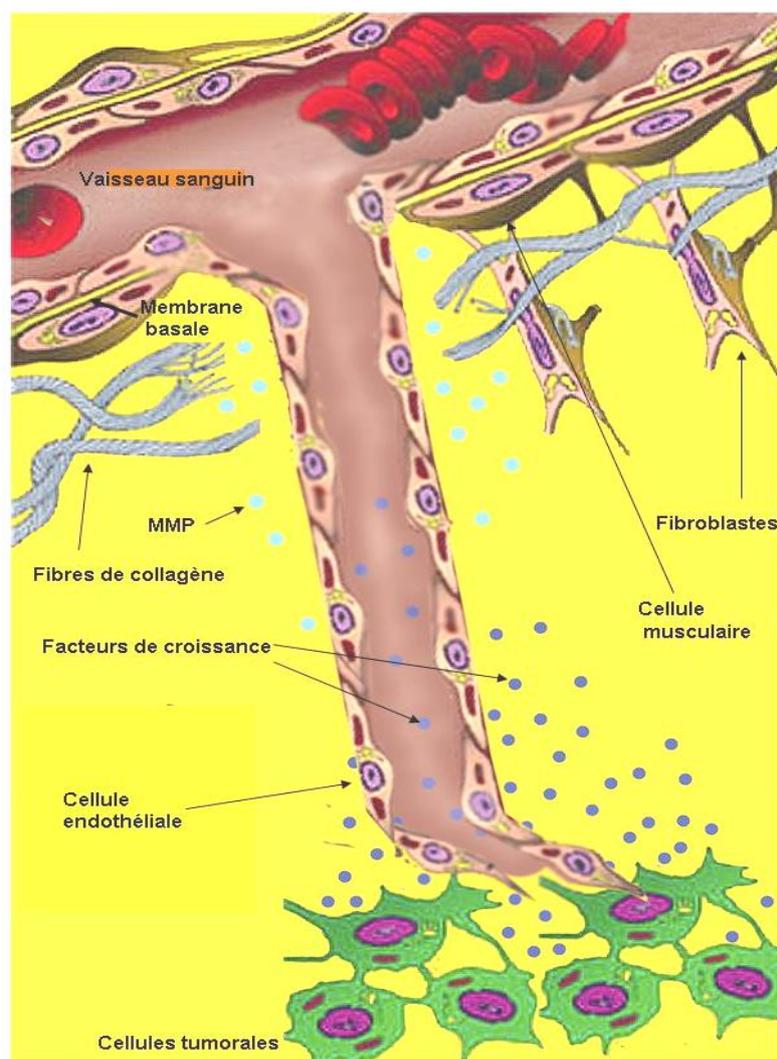


Figure 8 : Vascularisation de la tumeur par un néo-capillaire composé de cellules endothéliales.

Après s'être décrochés de la paroi pour permettre la migration des cellules endothéliales, les péricytes et les CML, vont proliférer et migrer vers le néo-vaisseau sous l'effet des facteurs de croissance sécrétés par les cellules tumorales et endothéliales (Figure 9).

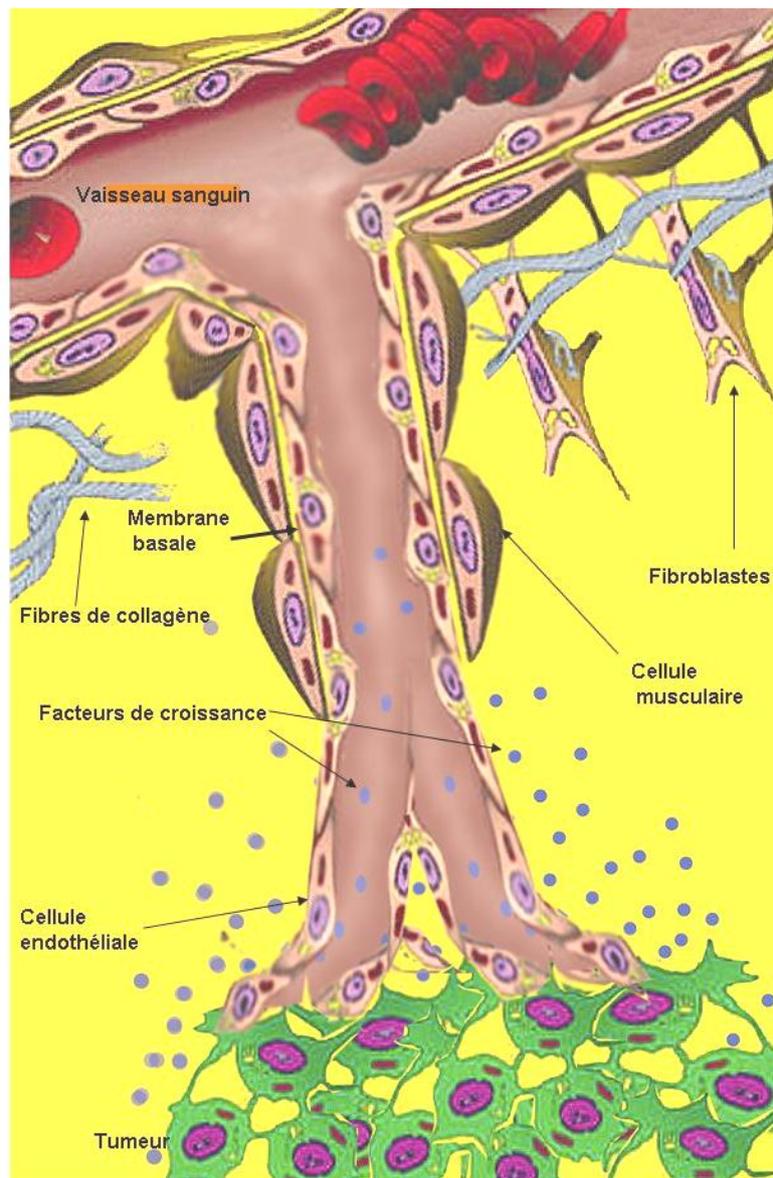


Figure 9 : Stabilisation et protection des cellules endothéliales par les péricytes.

Physiologiquement, les CML sont quiescentes. Elles confèrent à la paroi ses caractéristiques élastiques et participent à l'échange de molécules apportées par le sang. On peut observer deux phénotypes : le phénotype contractile et le phénotype synthétique. Le phénotype synthétique correspond à des CML qui ne se contractent plus, et qui produisent certains facteurs de croissance (TGF- β) et des produits importants comme les protéines de la matrice extracellulaire : fibronectine, collagène. Durant la phase « tardive » de l'angiogenèse tumorale, les CMLs se différencient et adoptent un phénotype prolifératif sous l'action de facteurs de croissance tels que FGF et TGF- β . Le gradient de concentration de ces mêmes facteurs ainsi que d'autres plus spécifiques du recrutement des CML (PDGF, S1P) vont induire la migration de ces cellules.

La nouvelle matrice ainsi formée va jouer deux rôles principaux.

En tant que structure de la paroi vasculaire, les CML apportent une stabilité mécanique en protégeant les cellules endothéliales de la pression exercée par la forte croissance tumorale. Par leurs capacités contractiles, elles régulent le flux sanguin et participent à la transduction de signaux mécaniques au niveau de l'endothélium. La contrainte de cisaillement à laquelle est soumise la surface endoluminale vasculaire joue un rôle fondamental sur de nombreuses voies de signalisation. Elle induit la production de radicaux libres oxygénés (O_2^-), la libération de monoxyde d'azote (NO) et la synthèse de MMP par les cellules endothéliales. L'interaction NO/ O_2^- produit du peroxy-nitrite, qui active les MMP. Ces dernières dégradent la matrice extracellulaire, provoquant d'une part l'apoptose des cellules ayant perdu leurs attaches matricielles et d'autre part l'augmentation du calibre des vaisseaux. Le NO peut aussi, avec le concours des facteurs de croissance stimulés par la contrainte de cisaillement, participer à l'hyperplasie des cellules vasculaires. L'activation de la protéine kinase Akt protège la cellule endothéliale de l'apoptose en inhibant la voie de caspases : soit en activant la synthèse de NO par l'intermédiaire de la NO synthase (eNOS), soit en phosphorylant Bad (Bcl-2-antagonist of cell death), empêchant sa

liaison avec Bcl-2 (B-cell/lymphoma 2) ou Bcl-XL (Bcl-2-like 1) à la membrane des mitochondries.

L'activation d'Akt peut également induire l'expression de gènes favorisant la survie cellulaire. La contrainte de cisaillement peut stimuler soit directement, soit indirectement (via la synthèse de facteurs vasoactifs), plusieurs voies menant à l'activation des MAP-kinases. La contrainte de cisaillement stimule la libération d'angiotensine II (Ang 2) et de VEGF, qui interagissent ensuite avec leurs récepteurs respectifs (couplé à une protéine G hétérotrimérique dans les cas de l'Ang 2, ou à une tyrosine kinase dans le cas du VEGF). La contrainte de cisaillement peut aussi induire la phosphorylation des c-Src kinases (Src), ou stimuler les intégrines qui sont fonctionnellement liées aux protéines du cytosquelette y compris les FAK (focal adhesion kinases). Des phosphorylations successives mènent à l'activation des ERK 1/2 ou des JNK qui conduisent à la transcription génétique [46].

D'autre part, les CML jouent un rôle de filtre cellulaire favorisant la survie des cellules endothéliales. Par un jeu d'interactions très sensibles entre les cellules tumorales, endothéliales et musculaires, les péricytes modulent les signaux induits par les facteurs de croissance sécrétés par la tumeur et contrôlent ainsi la survie et la prolifération des cellules endothéliales. Le PDGF-BB, sécrété par la tumeur et les cellules endothéliales, active chez les péricytes la voie de signalisation PI-3 kinase/P-Akt qui conduit à la sécrétion de VEGF par ces cellules. Ce VEGF, s'additionnant à celui produit par la tumeur, active les cellules endothéliales et les préserve d'une mort apoptotique.

Même lorsque le processus d'artériogénèse est aboutit, les vaisseaux tumoraux présentent des caractéristiques sensiblement différentes de la normale physiologique. Ils se distinguent des vaisseaux normaux par une morphologie plus tortueuse, un calibre irrégulier, avec la présence de nombreuses zones dilatées, et une perméabilité accrue. Ces

différences sont dues aux contraintes mécaniques liées à la croissance rapide de la tumeur, ainsi qu'à la structure de la paroi vasculaire.

Il existe une forte corrélation entre la densité en micro-vaisseaux et l'évolution clinique (progression tumorale et survie des patients), de nombreux cancers : sein, colorectal, poumon, peau, tête et cou, SNC [47]. Plus la tumeur est vascularisée, plus sa croissance est rapide et plus le risque de dispersion métastatique est important.

La paroi des vaisseaux tumoraux n'est pas aussi clairement délimitée en couches cellulaires distinctes (intima, media, adventice) que la paroi normale. Les cellules tumorales participent elles aussi à la formation des capillaires irrigant certaines tumeurs (mélanomes) (Figure 10). Ce phénomène de vasculogénèse tumorale (Vasculogenic mimicry, VM) implique des cellules tumorales qui se conduisent comme des cellules endothéliales. Elles expriment des protéines comme les VEGFR-1 et 2, la vascular endothelial (VE)-cadherin, la laminine-5 ou encore le marqueur CD34. Ce type de profil d'expression génétique permet aux cellules tumorales de dégrader la MEC, de migrer et former des capillaires à l'instar des cellules endothéliales. 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 {Carmeliet, 2000 #22}.

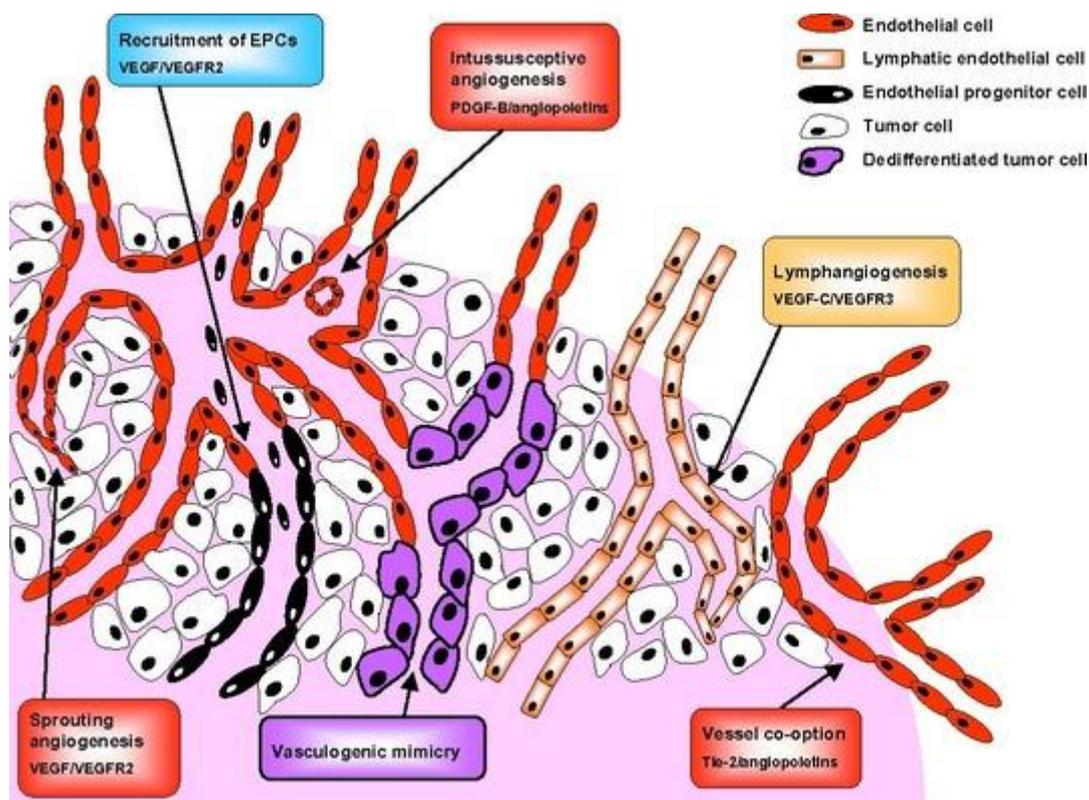


Figure 10 : Implication des cellules cancéreuses dans la vasculogénèse tumorale [48].

L'extension hématogène des cellules cancéreuses s'effectue, soit secondairement par l'intermédiaire des voies lymphatiques qui aboutissent au réseau sanguin, soit directement par effraction des membranes vasculaires sanguines. La voie hématogène directe est d'autant plus facile à atteindre que la paroi des vaisseaux péri-tumoraux est fine et que la pénétration des cellules tumorales se fait régulièrement par l'intermédiaire des petits capillaires sanguins. Par ailleurs il existe, particulièrement dans le cas des sarcomes, des lacunes vasculaires bordées de cellules tumorales, qui favorisent davantage encore l'accélération du processus de dissémination.

De plus, les tumeurs secondaires dérivées des métastases, parfois diagnostiquées avant la tumeur primitive sont fréquemment inopérables, et ne permettent qu'un recours à la chimiothérapie, avec ou sans le bénéfice supplémentaire de la radiothérapie. La dissémination des métastases constitue actuellement l'écueil majeur du traitement des

tumeurs solides représentant plus de 95 % des cancers, tous types histologiques confondus (Tableau 2).

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

Tableau 2 : Incidence des métastases sur différents organes.

Les valeurs indiquent la fréquence en pourcentage d'apparition de métastases en fonction du cancer primaire.

Une fois le processus métastatique enclenché et les métastases à distance présentes, la maladie atteint un stade critique, avec généralement une perte d'efficacité de la chimiothérapie (phénomène de chimiorésistance) et de l'hormonothérapie (perte des récepteurs hormonaux à la surface des cellules). La maladie entre en stade final dit d'échappement thérapeutique.

La mise en place de mécanismes concertés complexes (dégradation du tissu de soutien, prolifération, reconstruction) fournit de nombreuses cibles d'intervention thérapeutique anti-angiogénique.

1.2.4. Mécanismes cellulaires

1.2.4.1. Dégradation de la matrice et MMPs

Le système uPA (urokinase) et son récepteur, facteurs clés de l'activation du plasminogène en plasmine, participe à la dégradation de la MEC, à l'activation des autres cascades protéolytiques, mais aussi à la signalisation *via* les intégrines. Les cathepsines, protéases à cystéine de localisation lysosomiale, mais également sécrétées, participent aussi à la dégradation de la MEC. La cathepsine B jouerait aussi un rôle dans l'activation de l'uPA, montrant l'étroite interdépendance des différentes cascades (Figure 11).

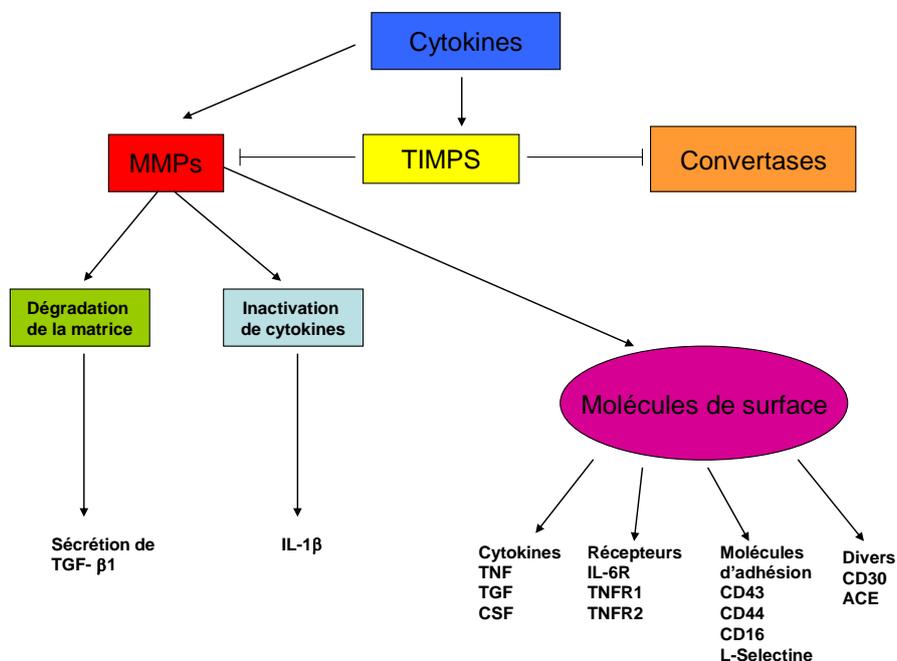


Figure 11 : Activité et régulation des MMPs (sigmaaldrich.com).

Les MMPs appartiennent à une vaste famille d'une vingtaine d'endopeptidases contenant un ion zinc dans leur site catalytique dont l'activité est dirigée contre les différents constituants de la matrice extracellulaire. La majorité d'entre elles se trouve sous forme libre dans le tissu interstitiel. Il en existe cependant quelques unes qui sont des enzymes membranaires. Leur expression est stimulée par des facteurs de croissance, des cytokines, des promoteurs de tumeurs et par les interactions intercellulaires ou cellule-MEC. Leur activité est modulée par des inhibiteurs tissulaires spécifiques (TIMPs). Plusieurs études, en particulier animales, ont montré l'importance des MMPs dans la pathogenèse des cancers. En règle générale, chez les animaux dont un gène de MMP est invalidé ou surexprime un TIMP, on observe moins de cancers spontanés ou induits. Cependant, il a aussi été montré que l'expression de MMP9 ne provient pas nécessairement de la tumeur. Le phénotype métastatique peut être restauré par des cellules de la moëlle exprimant MMP9. Ainsi, les cellules tumorales utilisent des protéases exprimées par des cellules inflammatoires.

Certains facteurs de croissance sont liés à la MEC et sont libérés lors de sa dégradation, accentuant le phénomène de l'angiogenèse. De même, certains composants de la MEC, une fois libérés par le processus de dégradation, grâce à des motifs normalement cryptiques peuvent exercer une action stimulatrice ou inhibitrice. Ainsi des fragments de collagène XV (endostatine) ou de collagène IV (arrestine, tumstatine, canstatine) sont parmi les plus puissants inhibiteurs de la prolifération et la migration des cellules endothéliales.

1.2.4.2. Cellules vasculaires et cytokines.

A l'instar de la croissance tumorale, l'angiogenèse tumorale est sous l'influence d'un grand nombre de cytokines pro- ou anti-angiogéniques agissant sur les différents types de cellules constituant la paroi vasculaire (Tableau 3). Les mécanismes de prolifération et de migration des cellules endothéliales ou musculaires vasculaires sont particulièrement

complexes du fait du nombre de facteurs intervenant, de la sensibilité des modes de régulation et de l'évolution constante du processus angiogénique s'adaptant aux besoins de la tumeur. De ce fait, l'identification précise du rôle de chacun de ces facteurs est difficile.

Parmi les cytokines impliquées on trouve des protéines activatrices de récepteurs à activité tyrosine-kinase comme VEGF, FGF, PDGF, EGF (Figure 12). Chacune d'entre elle, existe sous différentes isoformes capables d'activer spécifiquement plusieurs homo ou hétérodimères de récepteurs [49].

Facteurs pro-angiogéniques	Facteurs anti-angiogéniques
Angiogénine	Angiostatine
Angiopoïétine-1	Angiopoïétine-2
«Epidermal growth factor» (EGF)	Endostatine
«Fibroblast growth factor» (aFGF, bFGF)	Facteur 4 plaquettaire
«Hepatocyte growth factor» (HGF)	Fragments de la prolactine
«Insuline like growth factor» (IGF1-2)	Héparinase I, III
Interleukines (IL-1-6-8)	maspin
«Placental growth factor» (PLGF)	« matrix metalloprotease 2 » (MMP2)
«Platelet-derived growth factor» (PDGF)	«Tissular inhibitor of matrix
«Platelet-derived endothelial growth factor» (PD- ECGF)	metalloprotease» (TIMP 1, 2, 3)
«Secreted protein acidic and rich in cystein» (SPARC)	Interférons (INF α , β , γ)
«Sphingosine-1-phosphate» (S1P)	«Pigment epithelium derived factor» (PEDF)
«Transforming growth factor» (TGF- α , TGF- β) *	Protamine
«Tumor necrosis factor» (TNF- α)	«Transforming growth factor» (TGF- β) *

«Vascular endothelial growth factor» (VEGF-B-C-D)	Trombospondine-1
---	------------------

* Le rôle du TGF-β est complexe puisqu' in vitro il inhibe la croissance des cellules endothéliales et in vivo il induit l'angiogenèse.

Tableau 3 : Principaux facteurs endogènes régulant l'angiogenèse tumorale [50-52].

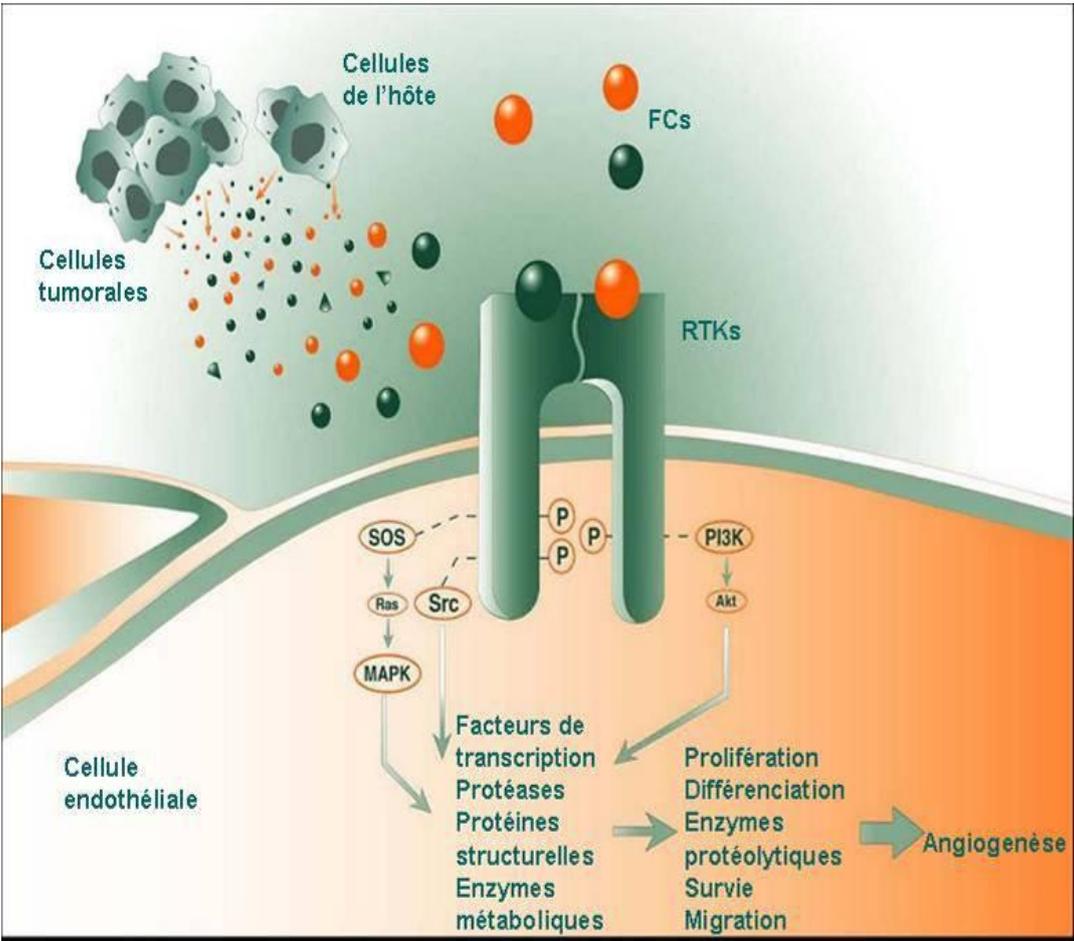
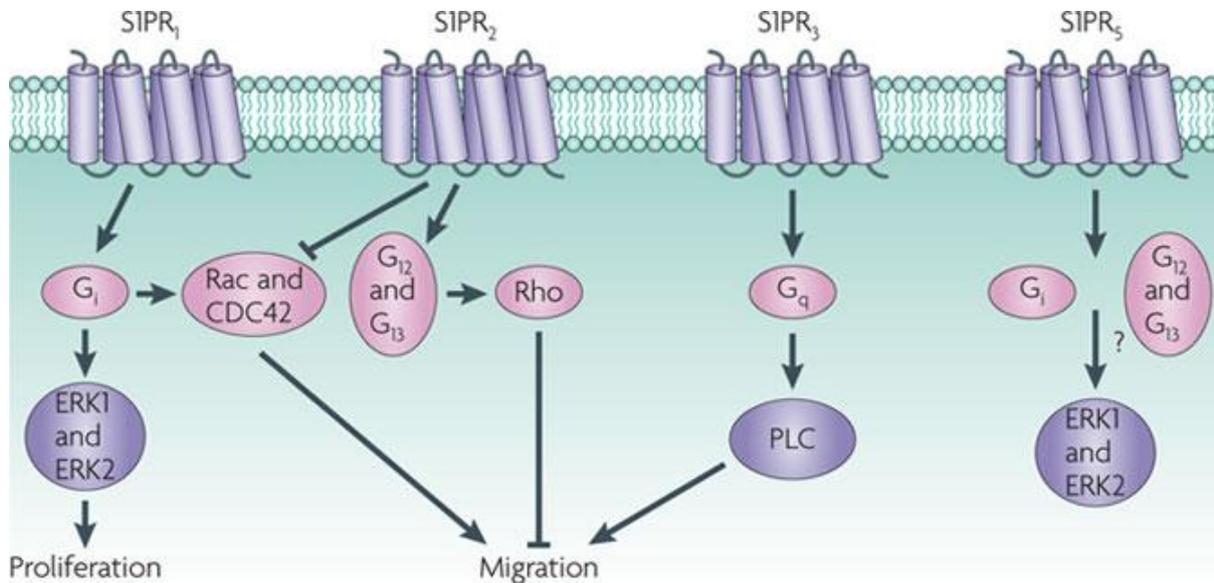


Figure 12 : Récepteurs à activité tyrosine kinase et angiogenèse tumorale. Certains facteurs de croissance (FCs) peuvent activer des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs) et induire divers réponses cellulaires.

On trouve aussi des activateurs de récepteurs couplés aux protéines G comme S1P {Kohno, 2006 #24;Skoura, 2007 #28}. Ce sphingolipide peut activer cinq récepteurs de la même famille (S1PR1-5) pouvant induire des signaux cellulaires variables (Figure 13).



Nature Reviews | Cancer

Figure 13 : Famille de récepteurs activés par la S1P [25].

En outre, certaines cytokines ont le pouvoir de transactiver le récepteur d'une autre cytokine afin d'en moduler le signal [25, 53] (Figure 14). Ainsi, la communication intra et intercellulaire est influencée par la variété des stimuli, leurs intensités relatives et leurs activités synergiques ou antagonistes.

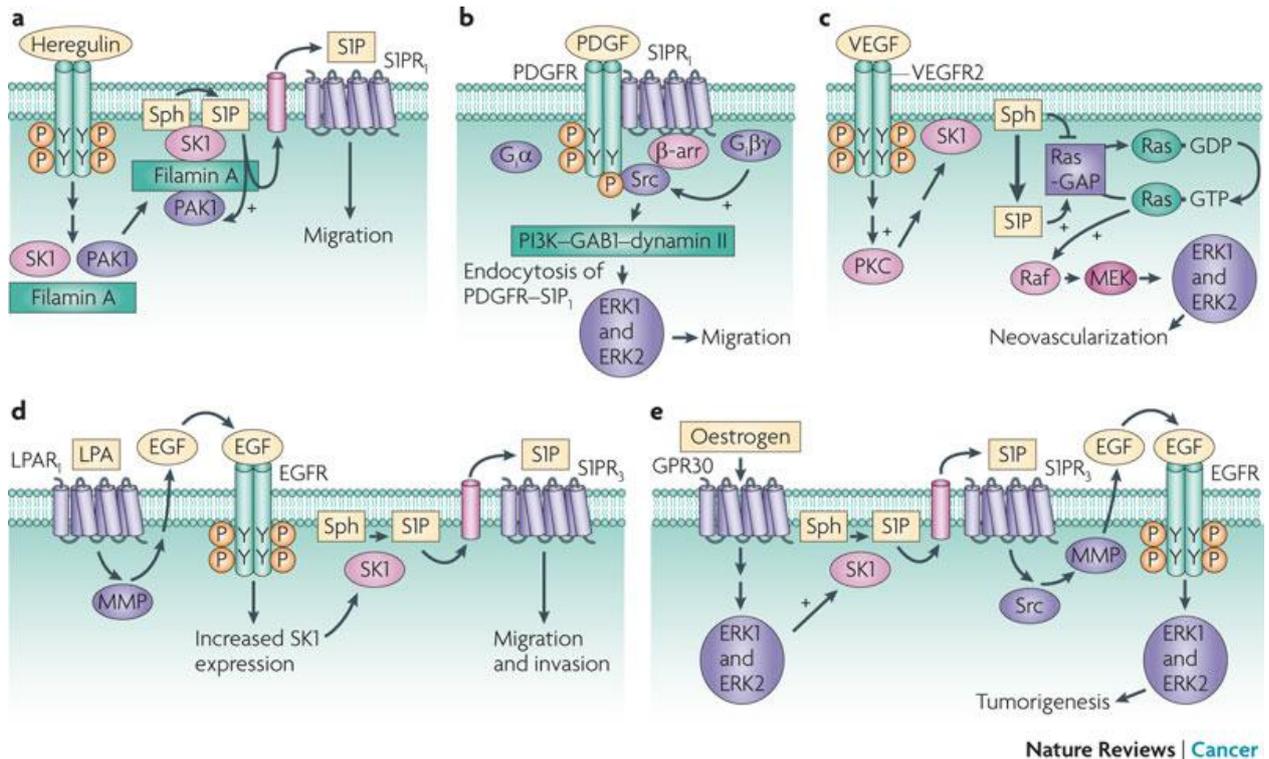


Figure 14 : Transactivation des facteurs de croissance angiogénique [25].

Concernant le recrutement des cellules musculaires de la paroi vasculaires, le TGF- β , Ang1, le bFGF, le PDGF-BB, et la S1P semblent jusqu'à maintenant constituer les acteurs centraux de ce phénomène (Figure 15) {Papetti, 2003 #25; Bondjers, 2003 #26; Stoeltzing, 2003 #27}. Le TGF- β , issu de l'endothélium, intervient dans la différenciation des péricytes. L'activation de TGF- β latent est dépendante du contact entre cellules endothéliales et musculaires. Le signal Ang1/Tie2, dérivé des péricytes, induit la stabilisation des cellules endothéliales. Inversement, Ang2/Tie2 déstabilise la paroi vasculaire par un effet antagoniste [54]. Le bFGF et le PDGF-B exercent un puissant pouvoir prolifératif et chimiotactique, nécessaire à la division des péricytes et des CMLs lors de la formation de la « néo-média ». Enfin, le signal S1P/S1PR1 provenant des cellules endothéliales participe à l'établissement d'une couverture stable et homogène des péricytes autour du néo-vaisseau [55].

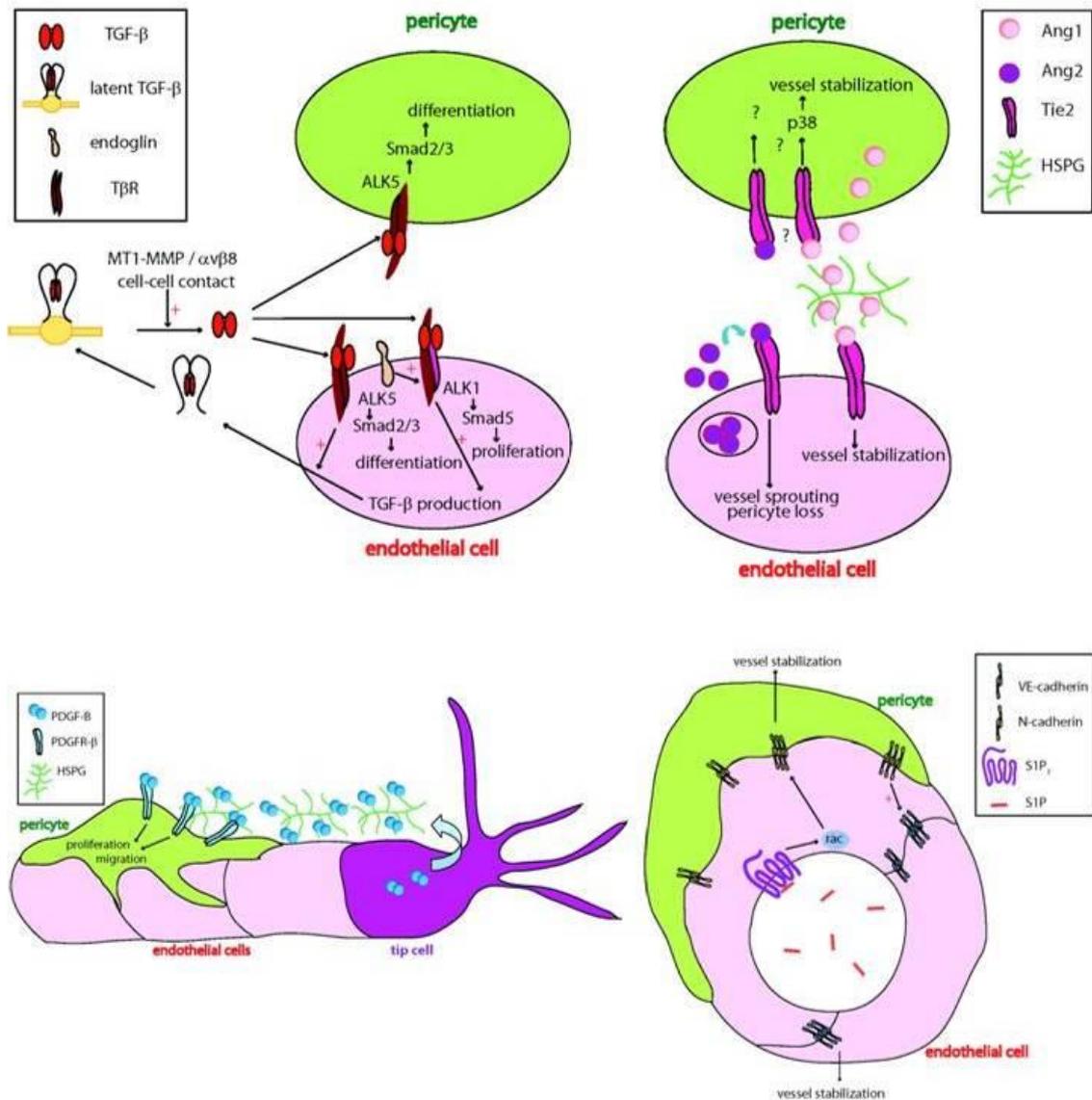


Figure 15 : Cytokines et recrutement des cellules musculaires vasculaires {Armulik, 2005 #29}.

Cependant, les effets combinatoires de ces différents facteurs restent obscurs. Si la voie S1P/S1PR1, activée chez les cellules endothéliales, stabilise le néo-vaisseau [56], certaines études *in vitro*, démontrent une régulation négative de la S1P sur la migration des CMLs induite par le PDGF-B [57]. En outre, les cinq récepteurs susceptibles d'être activé par la S1P ne sont pas distribués de manière homogène sur tous les types de cellules [58]. Le récepteur S1PR1 est majoritaire chez les cellules endothéliales, mais S1PR3 et à un

moindre niveau S1PR2 sont principalement exprimés par les CMLs chez le rat adulte [59, 60].

Si aujourd'hui, un certain nombre de facteurs de croissance a été identifié ainsi que la voie de signalisation intracellulaire qu'ils activent, leur effet potentiel sur les cellules vasculaires, et leurs interactions restent en grande partie mystérieuse. Les inhibiteurs spécifiques, d'un ou plusieurs facteurs de croissance similaires, ont eu dans les années 90 un impact majeur pour élucider le rôle physiologique et le fonctionnement moléculaire de diverses cytokines. Depuis les années 2000, de nouvelles molécules inspirées de celles utilisées pour la recherche fondamentale ont permis d'obtenir des résultats thérapeutiques très encourageants lors d'essais cliniques. En effet, l'approche antiangiogénique du traitement des tumeurs porte maintenant ses fruits avec l'apparition de molécules ciblant les facteurs de croissance ou les voies de signalisation qu'ils activent durant l'angiogenèse tumorale.

1.2.5. Mécanismes moléculaires

La plupart des facteurs caractérisés comme intervenant dans les mécanismes d'angiogenèse font ou ont fait l'objet d'études visant à les inhiber par le biais de molécules végétales ou synthétiques (Tableau 5). Diverses stratégies ont été mises en œuvre en fonction de la molécule ciblée (Figure 16).

Les MMPs semblent participer à la mise en place du "switch" angiogénique. Pour ces raisons, différentes approches thérapeutiques sont développées pour inhiber l'activité des MMPs[61]. Les inhibiteurs naturels (TIMP1 et 2) ou synthétiques (batimastat, marimastat), la calphostine (inhibiteur de la PKC), ou encore des vecteurs antisens et des ribozymes se sont montrés efficaces dans des systèmes *in vitro* ou dans des modèles animaux.

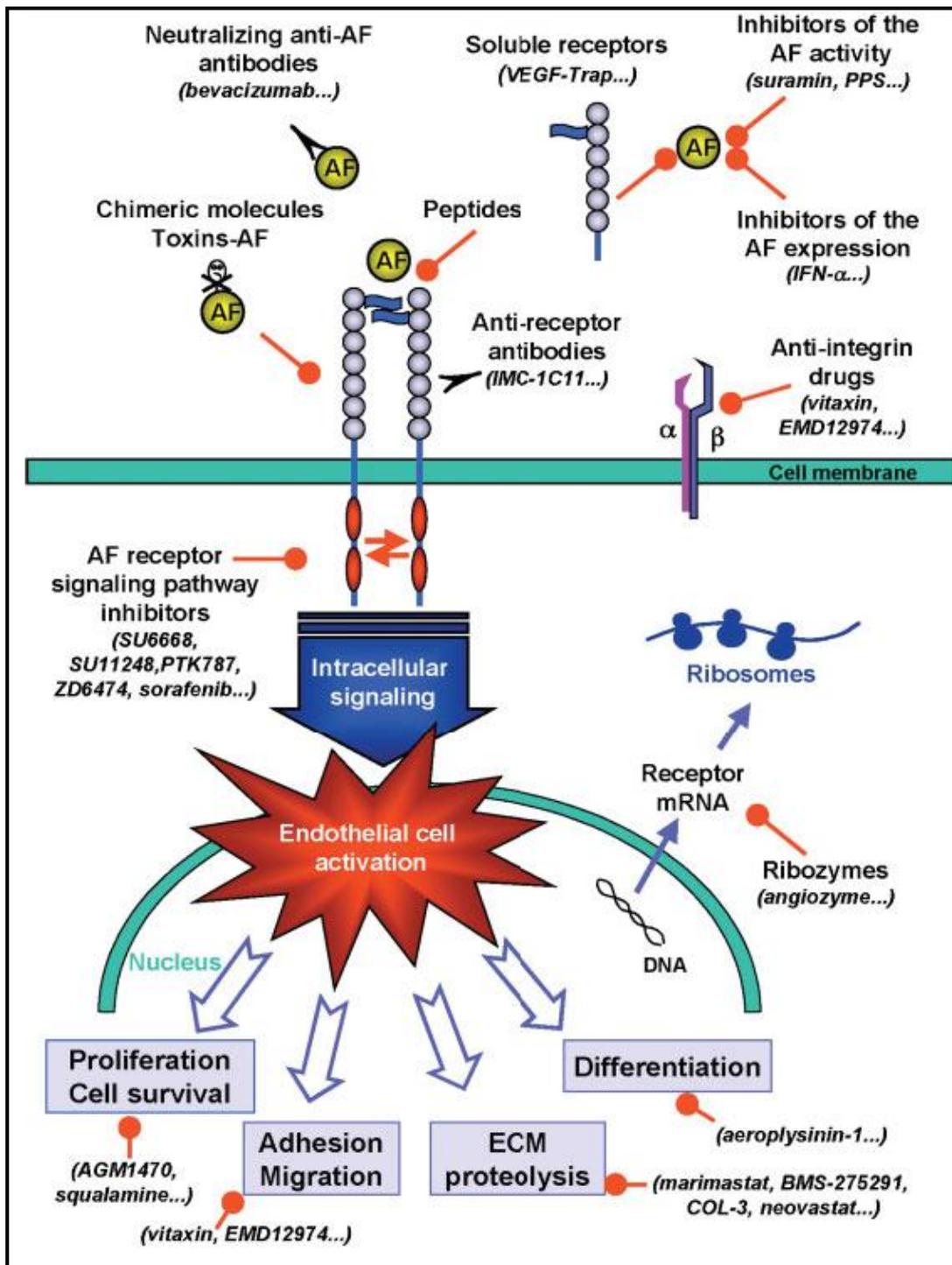


Figure 16 : Différentes stratégies d'inhibition de l'angiogénèse[62].

Plant species	Compound	Mechanism	Refs
Angiogenic compounds			
<i>Aloe vera</i>	β -Sitosterol	Stimulates HUVEC motility; enhances expression of von Willebrand factor, VEGF, VEGF receptor Flk-1 and laminin	[64,65]
<i>Vitis</i> spp. (grape)	Resveratrol	Upregulates VEGF and Flk-1	[38]
<i>Panax ginseng</i> (ginseng)	Ginsenoside Rg1	Upregulates eNOS expression, which activates the PI3K-Akt pathway	[42]
<i>P. ginseng</i>	Ginsenoside Re	Stimulates EC proliferation, migration and tube formation	[43]
<i>Astragalus membranaceus</i> (huangqi)	Unknown	Unknown	[46-49]
<i>Angelica sinensis</i> (danggui)	Unknown	Unknown	[46-49]
<i>Salvia miltiorrhiza</i> (danshen)	Salvianolic acid B	Upregulates the genes encoding MMP-2, VEGF, VEGF receptor 2 and Tie-1	[50]
Antiangiogenic compounds			
<i>Glycine max</i> (soybean)	Genistein	Suppresses VEGF and FGF-2 expression; inhibits receptor tyrosine kinase; inhibits activation of NF- κ B and Akt signalling pathways	[26-30]
<i>Camellia sinensis</i> (green tea)	EGCG	Abrogates VEGF signalling by interfering with formation of VEGF receptor 2 complex	[31-34]
<i>Vitis</i> spp. (grape)	Resveratrol	Disrupts Src-dependent VE cadherin tyrosine phosphorylation	[35,36]
<i>Taxus brevifolia</i> (Pacific yew tree)	Taxol [®]	Disrupts microtubule cytoskeleton; inhibits VEGF production; inhibits HIF-1 α protein	[8-14]
<i>Vinca rosea</i> (periwinkle)	Vincristine	Disrupts microtubule cytoskeleton; inhibits VEGF production	[10-12]
<i>Camptotheca acuminata</i>	Camptothecin	Blocks topoisomerase I; inhibits EC proliferation and tube formation; decreases HIF-1 α and VEGF expression	[15-18]
<i>Combretum cafrum</i> (African bush willow tree)	Combretastatin	Inhibits tubulin assembly	[20-23]
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> (liquorice)	Isoliquiritin	Inhibits tube formation	[66,67]
<i>P. ginseng</i>	Ginsenosides Rb1, Rb2 and Rg3	Inhibit VEGF production by tumour cells	[41,44,45]
<i>S. miltiorrhiza</i> (danshen)	TIIA	G ₁ -G ₀ arrest of ECs	[51,52]
	Cryptotanshinone	Apoptosis of ECs	
<i>Sinomenium acutum</i>	Sinomenine	G ₁ -G ₀ arrest of ECs	[53,54]
<i>Tripterygium wilfordii</i> Hook.f.	Triptolide	Inhibits VEGF expression and secretion from ECs; inhibits COX-1, COX-2 and 5-lipoxygenase; decreases transcription of the gene encoding inducible nitric oxide synthase	[53,55-58]
<i>Cordyceps militaris</i>	Unknown	Inhibits FGF-2 expression in ECs and MMP-2 expression in tumour cells	[68]
<i>Ganoderma lucidum</i>	Polysaccharide peptide	Causes EC apoptosis by reducing Bcl-2 expression and increasing Bax expression; decreases VEGF secretion from tumour cells	[69]

Tableau 4 : Composés végétaux pro- et antiangiogéniques[63].

Cependant, il faut noter que quelques modèles expérimentaux ont montré des résultats contradictoires. En effet, les résultats des quelques essais cliniques, phase III (Prinomastat+carboplatine et BMS-275291+carboplatine) se sont avérés décevants en augmentant la toxicité du traitement sans amélioration de la survie des patients atteints de cancers du poumon non à petites cellules. Etant donné la diversité des phénomènes biologiques impliquant les MMPs et les TIMPS : invasion, angiogenèse, prolifération, survie cellulaire et apoptose, nos connaissances semblent aujourd'hui insuffisantes pour permettre des applications cliniques efficaces.

Jusqu'à maintenant, la majorité des traitements ciblés a visé la voie du VEGF selon différentes approches moléculaires.

Le Bevacizumab (Avastin®) est un anticorps monoclonal recombinant bloquant l'accès du VEGF-A à son récepteur. C'est un des seuls agents antiangiogéniques disponible en clinique associé aux chimiothérapies à base de fluorouracile. Après des résultats prometteurs des essais cliniques de phase II, des études de phase III ont démontré l'efficacité supérieure de la combinaison Bevacizumab/chimiothérapie sur la chimiothérapie seule avec cependant un risque accru d'hémoptysie due à la dégradation de la molécule par la tumeur.

Une autre stratégie consiste à inhiber, non pas le VEGF lui-même, mais ses récepteurs. Plusieurs composés sont en essais cliniques de phase I et II tels que ZD6474, AZD2171, SU5416, BAY43-9006 et PTK796 [64]. Ces molécules sont principalement des inhibiteurs du VEGFR-2, mais elles présentent aussi des propriétés anti-VEGFR-1, anti-EGFR (ZD6474), associées à une diminution de la sécrétion de bFGF et de TGF- α , et anti-PDGFR- β (AZD2171, SU5416, BAY43-9006 et PTK796).

Malgré les résultats encourageants obtenus avec ces thérapies ciblées (Figure 17), il semble que l'avenir réside dans la combinaison optimale de plusieurs traitements ciblés alliés aux chimiothérapies, dans la mesure où l'inhibition d'une seule voie de signal angiogénique ne permet pas de stopper radicalement la progression tumorale. La principale limite sera constituée par le rapport efficacité/toxicité du traitement.

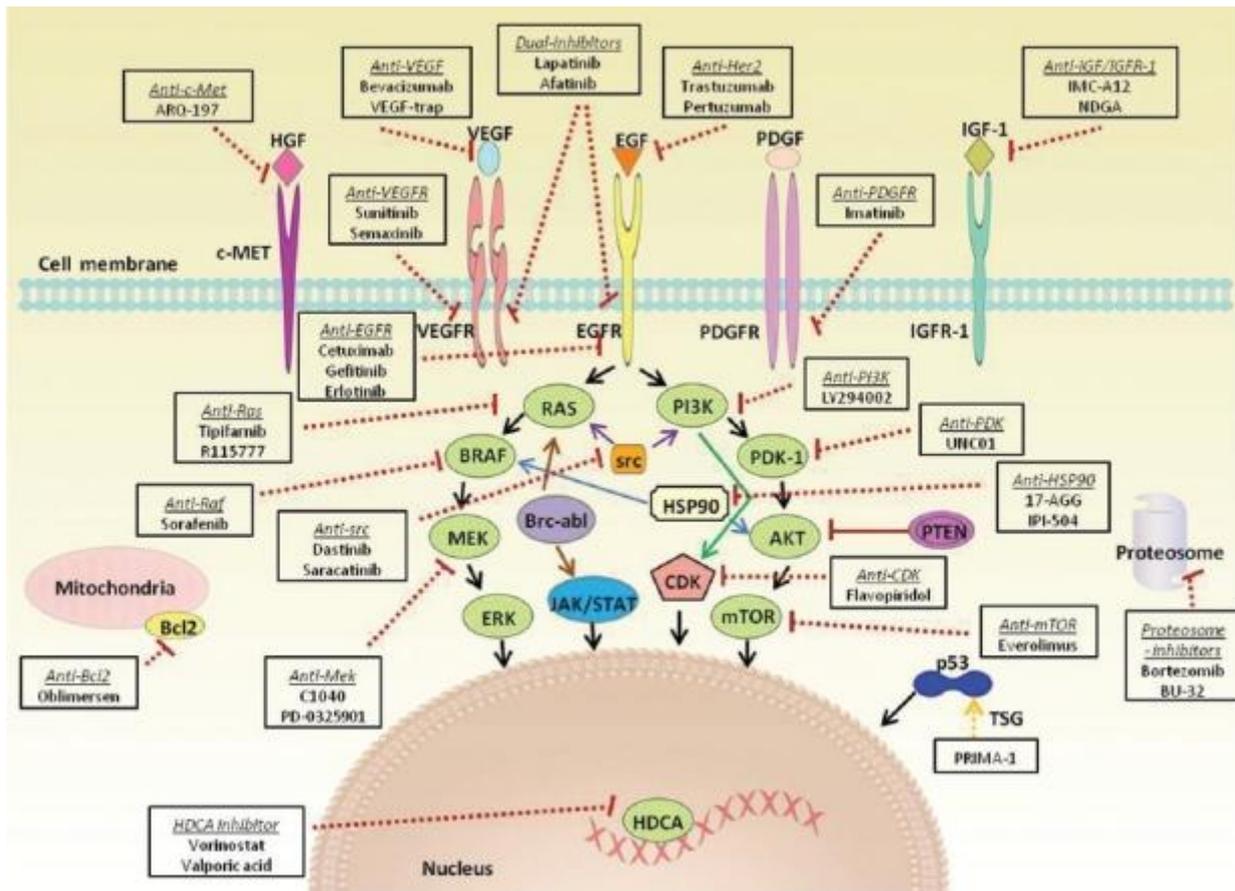


Figure 17 : Exemples d'agents anti-vasculaires en développement pour le traitement de cancer du sein [65].

1.2.6. Cibles thérapeutiques

Les nouveaux enjeux de la thérapie antiangiogénique du cancer consistent à atteindre de nouvelles cibles cellulaires. En effet les molécules décrites précédemment, vont principalement agir sur la phase « précoce » de l'angiogenèse. Ces mécanismes sont presque continuellement activés afin d'irriguer les nouveaux territoires colonisés et adapter la vascularisation à la taille et à la forme de la tumeur. Cette adaptation induit principalement la dégradation de la MEC et la prolifération/migration des cellules endothéliales. Toutefois, lorsque la tumeur a établi une vascularisation « stable » (artériogénèse), la paroi n'est plus seulement constituée de cellules endothéliales mais aussi de cellules musculaires. C'est le cas de la plupart des tumeurs qui ne sont pas détectées à un stade précoce. Dans ce cas, l'échappement au traitement apparaît quasi inévitable puisque les traitements actuels ne

permettent que très peu d'agir sur une paroi vasculaire mature. Ainsi, la tumeur, partiellement irriguée, peut survivre à l'état latent. Les péricytes et les CMLS n'étant pas sensibles aux mêmes stimuli que les cellules endothéliales, il semble donc fondamental de trouver de nouvelles combinaisons de molécules ainsi que des vecteurs permettant de les acheminer de manière spécifique afin d'atteindre ces cellules.

Le SU6668 a été produit dans ce sens. C'est un inhibiteur de Flk-1/KDR (VEGFR), PDGFR- β et FGFR1 [66, 67]. L'action simultanée sur ces trois voies du signal angiogénique a permis d'obtenir des résultats significatifs *in vitro* avec une diminution de 37 % de la densité vasculaire et de 53 % de la taille de la tumeur sur un modèle de chondrosarcome chez la souris [68]. Mais les conclusions de l'essai clinique de phase I le concernant ont stoppé net les espoirs qu'il suscitait [69]. Sa faible biodisponibilité et sa toxicité ont mis fin à son utilisation en clinique humaine. Un composé voisin, le sunitinib malate (SU11248) doué de propriétés inhibitrices comparables et des qualités pharmacologiques supérieures [70] a obtenu une AMM pour le traitement de tumeurs stromales gastro-intestinales et de néphrocarcinomes.

On constate donc qu'actuellement peu de molécules sont à même de cibler les cellules de la media vasculaire.

1.3. Les traitements en cancérologie

Les différentes classes de molécules utilisées dans le traitement des tumeurs solides ne seront pas abordées ici de manière exhaustive. L'essentiel du travail expérimental ayant été réalisé sur un modèle de cancer du sein chez le rat, nous nous attacherons principalement dans ce chapitre à décrire les traitements de ce type de cancer. Toutefois l'approche thérapeutique utilisée dans le traitement des cancers du sein est comparable à celle utilisée pour les tumeurs d'autres organes et les combinaisons de différentes classes

de molécules semblent appelées à se généraliser pour de nombreux cancers afin d'augmenter l'efficacité thérapeutique et de diminuer les chimiorésistance.

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. Les agents de chimiothérapies sont actifs dans 90 % des tumeurs primaires mais seulement dans 50 % des métastases [71]. 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 [72].

1.3.1. Chimiothérapies cytotoxiques

Les différentes classes d'agents anticancéreux cytotoxiques et leur mode d'action sont résumés dans le Tableau 6.

CLASSE	DCI	Nom de spécialité	MODE D'ACTION
Antimétabolites	5 Fluoro-uracile Capécitabine	Fluoro-uracile® Xéroda®	Inhibition de la synthèse des acides nucléiques, première étape nécessaire à toute synthèse d'ARN ou ADN
Poisons du fuseau	Vincristine Vinblastine Vinorelbine Paclitaxel Docetaxel	Oncovin® Velbé® Navelbine® Taxol® Taxotère®	Action sur le cytosquelette de la cellule en bloquant l'équilibre dynamique (polymérisation/dépolymérisation) des microtubules lors de la mitose
Intercalants	Doxorubicine Epirubicine	Adriblastine® Farmorubicine®	Intercalant de l'ADN Inhibition des topoisomérases Production de radicaux libres
Alkylants	Cyclophosphamide Ifosfamide	Endoxan® Holoxan®	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

Tableau 5 : Les différentes classes d'agents anticancéreux indiqués dans le cancer du sein classés par mode d'action.

Ces différentes molécules sont utilisées avec des fréquences variables pour le traitement des cancers du sein.

1.3.2. Thérapies 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 [73]. 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 [74].

1.3.2.1. L'hormonothérapie

L'hormonothérapie est utilisée depuis de nombreuses années pour traiter les patientes présentant une tumeur exprimant les récepteurs hormonaux (aux estrogènes et à la progestérone) [75]. Environ 60 % des tumeurs mammaires expriment ces types de récepteurs, elles 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 [76], néanmoins d'autres molécules peuvent être utilisées (Table 7). 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	DCI	Nom de Spécialité	Mode d'action
Anti-estrogènes	Tamoxifène	Nolvadex®	Agoniste-antagoniste des récepteurs aux estrogènes 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
	Fulvestrant	Faslodex®	Anti-estrogènes purs. Entre en compétition avec les estrogènes aux niveaux de leurs récepteurs spécifiques
Antiaromatases	Exemestane Anastrozole Letrozole	Aromasine® Arimidex® Femara®	Inhibe l'activité de l'aromatase. L'aromatase est un système

			enzymatique qui permet la conversion des androgènes en estrogènes
Progestatif	Médroxyprogestérone Megestrol	Depo-prodasone® Megace®	Action par inhibition de l'axe hypothalamo-ovarien, ils diminuent le taux d'estradiol
Agonistes de la LH-RH	Goséréline Leuproréline	Zoladex® Enantone®	Suppression de l'axe hypothalamo-ovarien, ils diminuent le taux d'estradiol

Tableau 6 : Différentes stratégies d'hormonothérapies utilisées pour le traitement du cancer du sein.

1.3.2.2. 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. Ces récepteurs possèdent un domaine extracellulaire, une région transmembranaire et un domaine intracellulaire possédant une activité tyrosine kinase [77] (à l'exception d'HER3) (Figure 18). Ils interviennent dans la régulation de la croissance cellulaire, la différenciation et la survie.

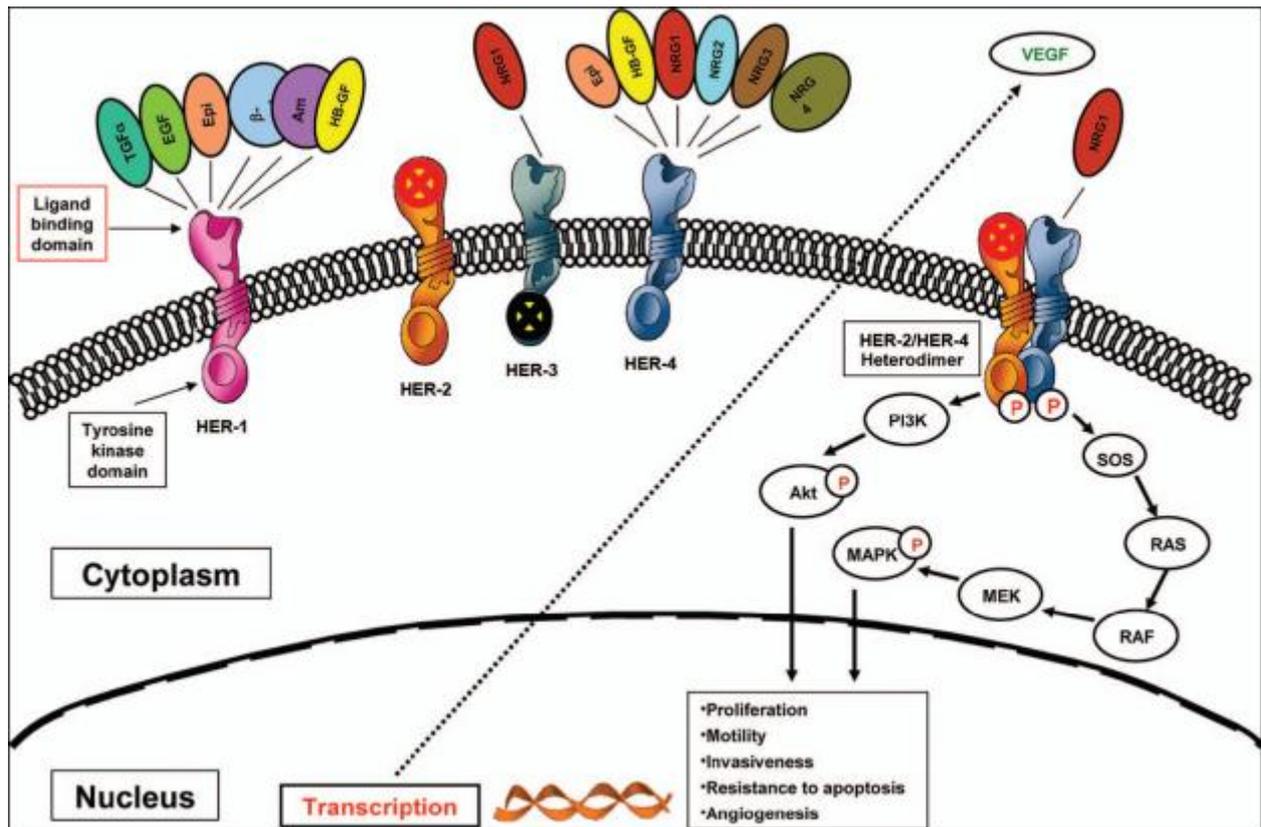


Figure 18 : La famille des récepteurs HER.

Cette illustration permet de visualiser les inter-relations 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. [78]

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. 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. Cependant, un grand nombre de facteurs de croissance (tels que l'EGF, le TGF, l'amphiréguline, 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 HER [79-81].

L'amplification du gène HER2 et/ou la surexpression de la protéine a été identifiée dans 25 à 30 % des cancers du sein [80]. 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 [82]. Ces caractéristiques sont responsables d'un phénotype tumoral très agressif et corrélé à de faibles chances de survie pour ce type de patientes [83]. En conséquence, l'intérêt pour le développement de thérapies anti-HER2 a été particulièrement important. 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 [84]. 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 [85]. Le Trastuzumab montre un taux de réponse élevé chez les patientes atteintes de cancer du sein métastatiques HER-2 positifs [86], que ce soit en combinaison et/ou après une chimiothérapie standard adjuvante [87]. Ce succès a ouvert la porte à d'autres stratégies thérapeutiques ciblées contre HER2 qui sont résumées dans le Tableau 8.

DCI (Nom de spécialité)	Cible	Type	Mécanisme d'action
Trastuzumab (Herceptin®)	Anti-HER2	Anticorps monoclonaux humanisés	Liaison à HER2 bloquant les voies de signalisation en aval Favorise la dégradation par endocytose d'HER2

Pertuzumab (Omnitarg®)	Anti-HER2	Anticorps monoclonaux humanisés	Liaison à HER2 et inhibition de sa dimérisation
Trastuzumab (DMI)	Anti-HER2	Immunoconjugué	Libération directe de l'agent de chimiothérapie dans le tissu cancéreux
Lapatinib (Tyverb®)	Anti HER2 /EGFR	Inhibiteur de tyrosine kinase	Inhibe l'autophosphorylation des tyrosines kinases Bloque la transduction du signal intracellulaire d'EGFR et HER2
Gefitinib (Iressa®)	Anti HER2 /EGFR	Inhibiteur de tyrosine kinase	Inhibe l'autophosphorylation des tyrosines kinases Bloque la transduction du signal intracellulaire d'EGFR et HER2
Neratinib	Anti HER2 /EGFR	Pan-erb inhibiteur de tyrosine kinase	Inhibe de manière irréversible l'autophosphorylation des tyrosines kinases et la transmission intracellulaire

Tableau 7: Nouvelles thérapeutiques ciblant HER2.

Celles indiquées dans le cadre du cancer du sein sont le Trastuzumab, le Lapatinib et le Gefitinib [78].

1.3.2.3. 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 [88].

L'angiogenèse est un processus multi-étapes : chacune de ses étapes fait intervenir différents facteurs plus ou moins importants. 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).

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 [89]. 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 [90]. 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 totalement avasculaires et à une diminution des métastases [91]. 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 essai clinique de phase II pour le cancer du sein et le cancer colorectal [92].

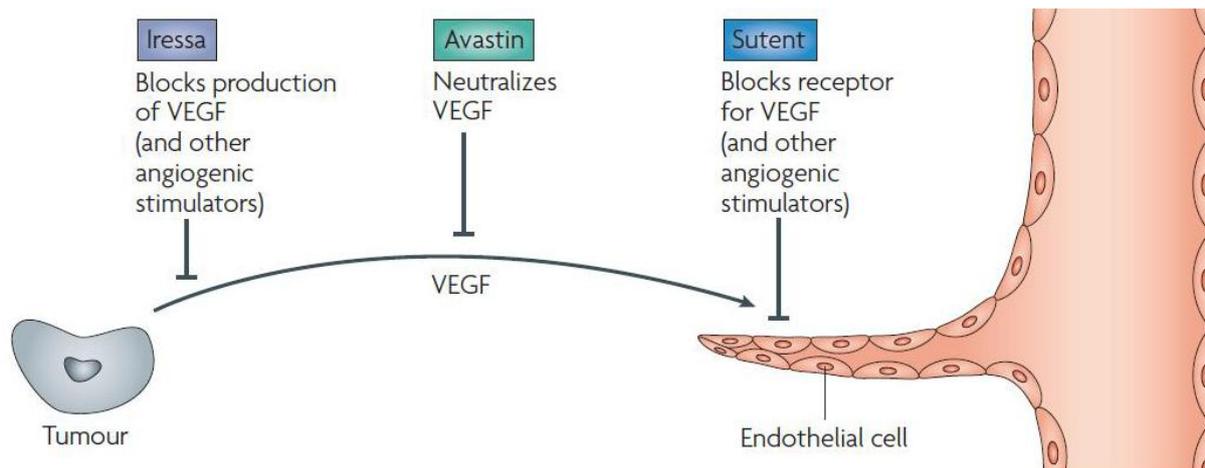


Figure 19 : Les trois mécanismes des inhibiteurs de l'angiogénèse ciblant le VEGF actuellement approuvés par la FDA. [93].

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 [94]. 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 [95].

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 [96]. 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 [97]. Actuellement, de nombreuses études cliniques démontrent son efficacité dans le cadre du cancer du sein [98]. Pour des raisons que nous exposerons plus loin, nous avons été amenés à utiliser cette molécule.

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 α , PDGFR β , Kit, FLT3 (fms-related tyrosine kinase) et CSF1 (Colony stimulating factor) [99] (Figure 20).

Le SU a été identifié au cours d'un screening de molécules visant à identifier des molécules inhibitrices de VEGFRs et PDGFRs, qui ont un rôle important au cours de l'angiogenèse tumorale [100].

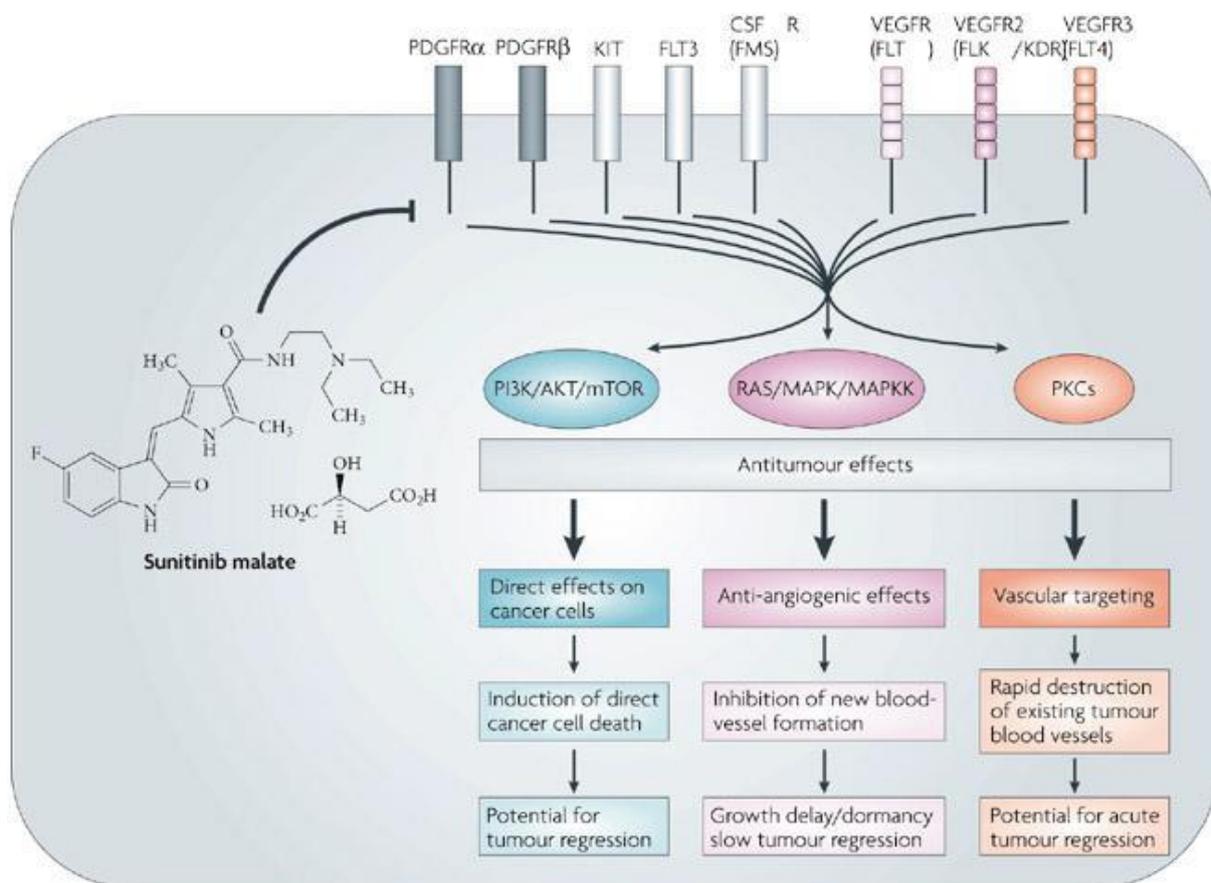


Figure 20 : Propriétés du Sunitinib malate.

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 [100].

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 chimiothérapies conventionnelles tels que le Paclitaxel ou le Docetaxel par rapport au traitement anti-angiogénique seul [101, 102].

1.3.3. L'avenir thérapeutique : du profilage des tumeurs aux combinaisons de traitements

Face au constat d'échec thérapeutique devant un nombre de cas encore important, l'avenir des traitements oncologiques semble se tourner vers une approche encore plus ciblée. Toute la filière oncologique, des laboratoires pharmaceutiques aux professionnels de santé, doit tout d'abord faire face à l'inefficacité des traitements en fonction du type de tumeur à traiter et du cas particulier que constitue chaque patient. Compte tenu des contraintes techniques et légales, environ dix ans pour passer de la découverte d'une molécule à son application thérapeutique, il semble illusoire d'attendre un développement rapide et en grand nombre de nouvelles thérapeutiques afin de répondre aux besoins. Ensuite, l'expérience de plusieurs dizaines d'années d'utilisation de certaines chimiothérapies montre que les phénomènes de résistance sont en grande partie liés à la variabilité génétique des cellules cancéreuses ainsi qu'aux spécificités métaboliques de chaque patient.

Par conséquent, de nombreux chercheurs et cliniciens visent à optimiser les résultats thérapeutiques par la détermination de profils génétiques des cellules tumorales et des profils métaboliques des patients afin d'évaluer le niveau d'agressivité des tumeurs et d'obtenir des facteurs prédictifs de réponse aux traitements. Ceci permet de choisir le traitement le plus efficace et le mieux toléré. Cette approche a permis, dans le cas du cancer du sein, d'identifier par exemple le gène HER2 comme un marqueur de l'agressivité tumorale et de développer des traitements. Toutefois, si l'on considère de manière globale l'ensemble des types tumoraux, dont la variabilité est grande, et l'ensemble des patients, avec leurs spécificités, cette approche n'en est encore qu'à ses débuts. En effet, ces outils diagnostiques requièrent une généralisation des techniques de biologie moléculaire à haut débit afin d'accélérer à la fois la découverte de nouveaux marqueurs ainsi que leurs recherches en routine pour le diagnostic. Ces techniques sont pour l'instant faiblement disponibles dans les laboratoires de biologie médicale car elles nécessitent une mise en

œuvre par un personnel hautement spécialisé, sur une durée plus longue que les techniques de biologie médicale courantes et un équipement coûteux.

Par ailleurs, les contraintes économiques étant de plus en plus prégnantes dans le domaine médical, de nouveaux protocoles thérapeutiques sont envisagés à partir des molécules existantes. Parmi ces nouvelles stratégies, on trouve la chimiothérapie métronomique. Son principe consiste à administrer, à des doses très largement inférieures aux posologies habituelles mais à une fréquence élevée, un agent cytotoxique déjà largement utilisé et dont les effets sont bien caractérisés. Cette approche, étudiée depuis une dizaine d'années, a montré qu'à dose réduite ces molécules telles que le méthotrexate ou la capécitabine exercent une action anti-angiogénique et anti-proliférative sur la tumeur tout en réduisant leurs effets toxiques.

Enfin, l'étude et l'utilisation de combinaisons de traitements semble se généraliser pour la plupart des types de tumeurs. Cette stratégie permet d'allier différentes classes de molécules, par exemple cytotoxique et anti-angiogénique, afin d'optimiser la réponse au traitement. Certaines combinaisons ont été testées en deuxième intention face à l'échec du traitement de première ligne, d'autres ont été administrées de manière séquentielle pour limiter les chimiorésistances induites.

Aujourd'hui, fort des informations concernant les profils des tumeurs et des patients ainsi que de l'expérience acquise de l'utilisation des combinaisons de traitements, l'alliance de ces différents moyens semble constituer l'avenir des thérapeutiques oncologiques.

C'est donc dans cette dynamique et compte tenu des informations dont nous disposons sur les effets anti-cancéreux et anti-angiogénique du sunitinib malate et du fingolimod que nous avons choisi d'étudier le potentiel thérapeutique de la combinaison Sutent®/Gilenya® sur un modèle *in vitro* de cellules vasculaires ainsi que sur un modèle de cancer mammaire chez le rat.

2.1. Réactifs

Le PDGF-B provient de R&D Systems (Lille, France), la sphingosine-1-phosphate de Sigma-Aldrich (Lyon, France), la tyrphostine AG1296 de Calbiochem (Darmstadt, Allemagne), le VPC-23019 de Avanti Polar (Alabaster, AL, USA), le sunitinib malate (SU11248) et le fingolimod (FTY720) de LC Laboratories (Woburn, MA, USA).

2.2. Cultures cellulaires

Les cellules Walker 256 ont été obtenues auprès de Cell Lines Service (Eppelheim, Allemagne). Ces cellules ont été cultivées selon les recommandations du fournisseur. Les cellules musculaires lisses vasculaires (Vascular Smooth Muscle cells; VSMCs) et les cellules endothéliales d'aorte (Rat Aortic Endothelial cells; RAECs) ont été obtenues à partir d'explants d'aorte thoracique de rats mâles Sprague-Dawley âgés de 3 à 5 semaines. Les techniques utilisées pour obtenir ces cellules sont respectivement des versions modifiées des méthodes décrites par *Sachinidis et al.* [103] et *Kwan et al.* [56]. Après 4 passages, les cellules endothéliales et musculaires lisses ont été caractérisées par immunocytochimie grâce à des anticorps dirigés contre l' α -actine des muscles lisses et contre le facteur de Von Willebrand. Les cultures primaires de cellules endothéliales ont été utilisées entre les passages 3 et 10 et les cellules musculaires lisses entre les passages 5 et 15. Les RAECs ont été cultivées dans du RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contenant 10% de sérum de veau foetal (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) et les VSMCs dans du DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) complémenté avec 10% de sérum de veau foetal. Ces différentes cultures cellulaires ont été maintenues dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ à 37°C.

2.3. Croissance cellulaire

Les VSMCs ont étéensemencées à une densité de $3 \cdot 10^5$ cellules dans des flasques de 25 cm². Ces cellules ont été stimulées avec 10 % de sérum de veau foetal (SVF), 25

ng/ml de PDGF-B, 1 μ M de S1P et un mélange de 25 ng/ml de PDGF-B et de 1 μ M de S1P pendant 1 à 8 jours. Une fois la durée de stimulation atteinte, le milieu est éliminé et le tapis cellulaire est lavé par un tampon phosphate stérile (PBS 1X : NaCl 140 mM, KCl 27 mM, Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, pH 7,4). Les cellules sont détachées de leur support par incubation de 5 minutes à 37°C avec une solution de trypsine-EDTA (0,05 %) (Life Technologies). L'action de la trypsine est inhibée par addition de milieu de culture complet. Les cellules sont ensuite comptées sur lame de Malassez par exclusion au bleu trypan ou à l'aide du compteur Scepter Cell Counter (Millipore, France).

2.4. Migration cellulaire en gel d'agarose

Nous avons utilisé une méthode développée dans le laboratoire et publiée en 2007 [104].

2.4.1. Composition du gel d'agarose

Un gel est réalisé en diluant 1 % d'agarose dans un milieu composé de 50 % de PBS et 50 % de DMEM 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 de type II (Sigma) 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-DMEM sont ajoutés au mélange agarose/PBS. La solution ainsi produite est coulée autour des formes en verres permettant d'obtenir la forme des puits (Figure 21). Après 20 à 30 min. le gel est humidifié avec 5 mL de DMEM et les formes de verres sont retirées. Avant d'ensemencer les cellules, 5 mL de DMEM (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.

2.4.2. Différentes configurations de puits

Nous avons développé différentes configurations de puits adaptées au type de cellule et au type de migration étudiées. Deux configurations de puits ont été retenues.

2.4.2.1. Puits rapprochés

Dans la première configuration, 3 puits de 12 mm de diamètre séparés par 1 mm d'agarose sont formés dans le gel (Fig. 21A et B).

Pour les puits de 12 mm de diamètre, les cellules sontensemencées à 80.10^3 cellules par puits. Après 24 heures de culture dans un milieu standard (DMEM-10 % SVF), le milieu est retiré et remplacé par du DMEM contenant seulement 1 % de SVF.

Etude d'un seul gradient de concentration de facteurs de croissances :

Les cellules sontensemencées dans le puits central du gel d'agarose. Après 24 heures, le facteur chimio-attractif est placé dans un des puits latéraux. Il diffuse progressivement au travers de la paroi du gel qui le sépare des cellules. Les cellules sont alors logiquement attirées dans une seule direction, vers la source de facteur de croissance. Le troisième puits reste vide et sert de contrôle négatif afin d'évaluer les mouvements aléatoires des cellules (chimiokinésie) (Fig. 21A).

Etude de deux gradients de concentrations :

24 heures après l'ensemencement des cellules dans le puits central, les facteurs sont placés dans les deux puits latéraux simultanément afin d'exercer deux stimuli opposés envers les cellules (Fig. 21B).

2.4.2.2. Puits distants

Dans la deuxième configuration, les 3 puits de 10 mm de diamètre formés dans le gel sont séparés par un canal de 10 mm de long et 1 mm de large fermé à chaque extrémité par une paroi d'agarose de 1 mm d'épaisseur (Fig. 21C et D). Les cellules sontensemencées à

60.10^3 par puits lorsqu'elles sont adhérentes et à 100.10^3 par puits pour des cellules en suspension.

Etude d'un seul gradient de concentration de facteurs de croissances :

Les cellules sontensemencées dans le puits central du gel d'agarose. Après 24 heures, le facteur chimio-attractif est placé dans un des puits latéraux. Les parois d'agarose, qui bloquent l'accès des cellules aux canaux conduisant aux puits latéraux, sont découpées avec un scalpel (Fig. 21C).

Etude de la migration induite par une autre population cellulaire :

Les cellules, dont on veut étudier la migration, sontensemencées dans le puits central du gel d'agarose. Les cellules susceptibles d'exercer une attraction (par la sécrétion de cytokines) sontensemencées dans un puits latéral. Les parois d'agarose, isolant le puits central des canaux latéraux, sont découpées avec un scalpel après 24 heures (Fig. 21D).

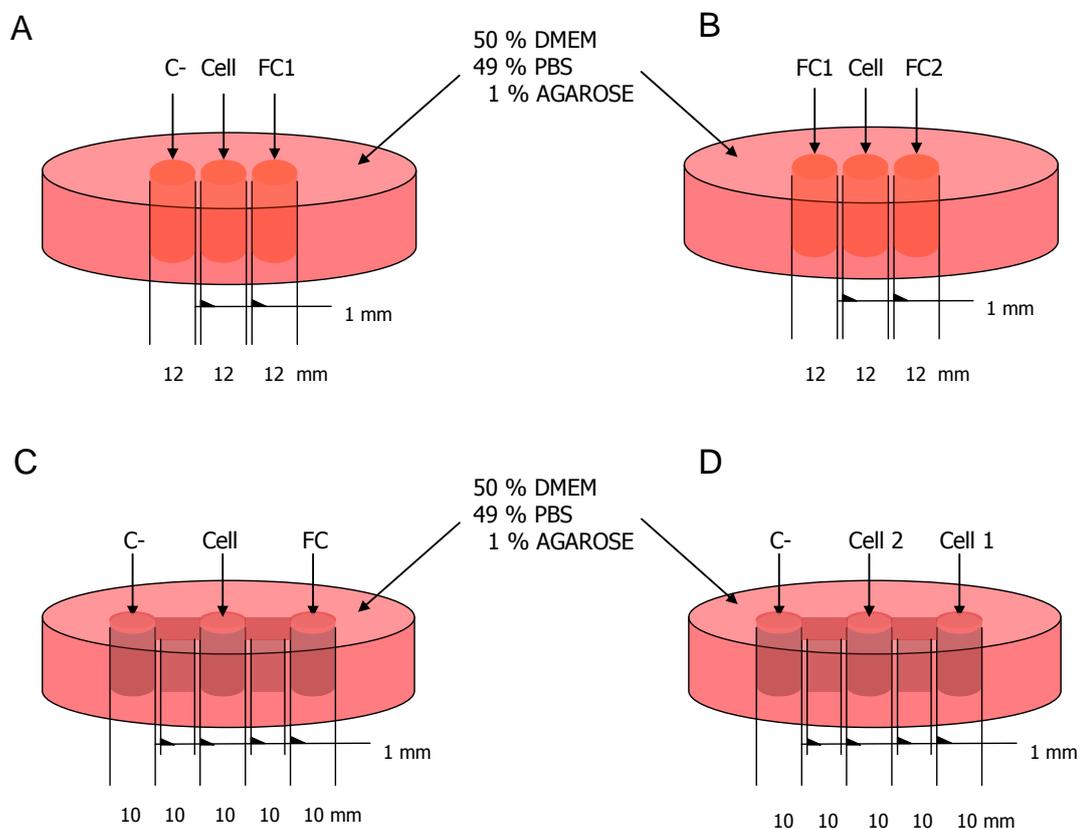


Figure 21 : Configuration des puits dans le gel d'agarose et modalités d'étude du comportement migratoire

(C- : contrôle négatif, puits contenant du DMEM pur ; Cell : cellules étudiées ; FC : facteur de croissance) (A) Etude d'un gradient de concentration envers des cellules adhérentes. (B) Etude de deux gradients simultanés envers des cellules adhérentes. (C) Etude d'un gradient de concentration envers des cellules en suspension. (D) Etude des interactions entre deux populations cellulaires.

Pour l'analyse des données de migration cellulaire, nous avons utilisé un microscope Leica DM IRB couplé à une caméra CCD et le logiciel NIS-AR software (Nikon Instruments, Melville, NY, USA). Trente minutes avant la capture d'image, un marquage nucléaire a été réalisé avec 50 ng/ml de Hoechst 33258 (Sigma) selon la méthode décrite par Li *et al.* [105].

2.5. Interférence ARN

2.5.1. Sélection des siRNAs

Les siRNAs Stealth™ ont été conçus selon la méthode décrite par Tuschl et Elbashir [106, 107], à l'aide du logiciel Invitrogen Block It™ RNAi Designer disponible en ligne. Pour chaque cible moléculaire, nous avons testé 3 siRNAs. Les séquences des siRNAs que nous avons sélectionnés pour inhiber l'expression des récepteurs PDGFR- β , S1P2 et S1P3 sont présentées dans le tableau 9:

Cible	Sequence (5'- 3')
PDGFR- β	CAGGUGCAUCGUGAUGGGCAAUGAU
PDGFR- β	AUCAUUGCCCAUCACGAUGCACCUUG
S1P2	AAUAAUGGGCUUUGUAGAGGACAGG
S1P2	CCUGUCCUCUACAAAGCCCAUUAUU
S1P3	CAACAUUCUGAUGUCCGGUAGGAAG
S1P3	CUUCCUACCGGACAUCAGAAUGUUG

Tableau 8 : Séquences des siRNA pour chaque cible.

Les séquences des siRNAs contrôles contenant un fort et un faible taux en GC sont les suivantes :

5'-GGGAGAUUGUGCUCCAACACCCUUU-3'(sense),

5'-AAAGGGUGUUGGAGCACAUCUCCC-3'(antisense),

5'-CAAUUCUGAUGUCCGGUAGGCAAAG-3'(sense),

5'-CUUUGCCUACCGGACAUCAGAAUUG-3'(antisense), respectively.

Les siRNAs ciblant S1PR1, Rn_Edg1_3; SI01508437, ont été obtenu de Qiagen (Valencia, CA, USA).

2.5.2. Transfection avec la Lipofectamine™ 2000

Les VSMCs ont étéensemencées à raison de $40 \cdot 10^3$ par puits pour des plaques 24 puits et $60 \cdot 10^3$ par puits pour les tests de migration en gel d'agarose. Après 24 heures de culture, le milieu a été renouvelé. D'une part, 100 à 150 pmol de siRNA ont été dilués dans 50 μ l de milieu Opti-MEM I Reduced Serum (Invitrogen). D'autre part, 1 μ l de Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) a été dilué dans 50 μ l de milieu Opti-MEM I Reduced Serum et incubé 15 min. à température ambiante. Les deux solutions ont ensuite été mélangées et incubées à nouveau 15 min à température ambiante. Le mélange siRNA/Lipofectamine ainsi obtenu a été ajouté au milieu de culture cellulaire et incubé 24 à 48 h.

Afin de contrôler l'efficacité de la transfection, un oligomère fluorescent (BLOCK-IT Fluorescent Oligo, Invitrogen) a été ajouté à la solution de siRNA-Opti-MEM à une concentration de 20 nM. Cet oligo-nucléotide ne présente pas d'activité catalytique mais se comporte comme les siRNA en se complexant avec la Lipofectamine. Il permet, par sa fluorescence verte, la localisation intracellulaire des siRNA après transfection en microscopie à fluorescence.

2.6. Culture cellulaire en 3 dimensions

Nous avons adapté à l'étude de l'angiogenèse *in vitro* une technique décrite par Kaiparettu *et al.* [108].

Brièvement, 300 µl de blanc d'œuf ont été déposés dans chaque puits d'une plaque de culture cellulaire de 24 puits et mis à chauffer à 65°C pendant 30 minutes dans un four à hybridation. Lorsque le blanc d'œuf avait été rendu semi solide par le chauffage, les cellules ont étéensemencées dans 500 µL de DMEM complémenté avec 10 % de SVF. Les cellules ont été traitées 24 heures plus tard.

Pour la capture d'image, nous avons utilisé un microscope Leica DM IRB couplé à une caméra CCD et le logiciel NIS-AR software (Nikon Instruments, Melville, NY, USA). Soixante minutes avant la capture d'image, un marquage nucléaire a été réalisé avec 100 ng/ml de Hoechst 33258 (Sigma). L'analyse des données concernant l'organisation tridimensionnelle des cellules a été réalisée par deux investigateurs indépendants.

2.7. Modèle animal de cancer du sein

Le protocole expérimental suivi au cours de ces expériences a été validé par le comité d'éthique sur l'expérimentation animale de l'Université de Limoges.

Quarante rates Sprague-Dawley (200–230 g) âgées de 8 semaines ont été achetées auprès de l'élevage Depré (France). Chaque groupe d'animaux était constitué de 5 à 10 individus nourris *ad libitum*. La greffe consistait à injecter 1×10^4 cellules Walker 256 en suspension au niveau de la glande mammaire inguinale de chaque rate. L'injection a été réalisée sous anesthésie générale (2 % isoflurane, Baxter, Maurepas, France).

Pour les groupes traités, les rates ont reçu par gavage du sunitinib malate (30 mg/kg) et/ou du fingolimod (5 mg/kg) dilués dans de l'huile d'olive.

Une observation macroscopique, une palpation et une pesée quotidienne des rates greffées nous a permis de nous assurer de la prise de greffe et de leur état de santé. Le temps de latence avant la détection par palpation a pu varier entre 5 et 7 jours. Tout au long du traitement, la progression de la surface tumorale a été appréciée par mesure de la tumeur selon deux axes perpendiculaires et le volume a été 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 des animaux a duré tout au long de l'expérimentation jusqu'à l'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 ne devant pas dépasser 10 % du poids initial,
- une ulcération/infection à l'emplacement de la tumeur,
- la charge tumorale ne devant 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 ont été euthanasiées par une injection intracardiaque d'uréthane à 24 % dans du PBS sous anesthésie gazeuse, puis les tumeurs ont été disséquées, et pesées. Les tumeurs ont été placées dans du formol à 10 % afin de permettre une analyse histologique.

2.8. Immunomarquages

2.8.1. Immunocytochimie

2.8.1.1. Immunomarquage

Les VSMCs ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de $30 \cdot 10^3$ cellules par puits dans du DMEM-10 % SVF. Après 24 à 48 heures d'incubation avec le traitement, les cellules ont été fixées à l'aide de méthanol glacial. Le milieu de culture a été retiré et les cellules ont été rincées 3 fois avec du PBS 1X. Les cellules ont ensuite été fixées sur leur support de culture (boite de petri/plaques multipuits) avec du méthanol glacial pendant 5 min puis rincées 3 fois 5 min avec du PBS 1X. Les sites non spécifiques de liaison aux anticorps ont été saturés par une solution de PBS dans lequel est dissout 10 % de BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma). Cette solution a été mise à incuber avec les cellules, sous agitation, pendant 1 h à température ambiante. Les cellules ont finalement été rincées 3 fois 5 min avec du PBS 1X.

Les différents anticorps primaires et secondaires ont été dilués dans une solution de PBS contenant 3 % de BSA (Tableau 10). Les cellules ont été mises à incuber une nuit à 4°C sous agitation avec la solution d'anticorps primaires. Les cellules ont été rincées 3 fois 5 min avec du PBS 1X. La solution d'anticorps secondaires (fluorescents) était mise à incuber dans l'obscurité, 1 h 30 min. à température ambiante sous agitation. Après un nouveau rinçage au PBS 1X, 3 fois 5 min, le noyau des cellules a été marqué à l'aide d'un intercalant d'ADN (DAPI). Le DAPI apporte une fluorescence bleue. Les anticorps secondaires, conjugués à la FITC ou à l'Alexa-488, donnent tous une fluorescence verte. Ainsi, pour chaque type de protéine marquée, on a pu comparer le marquage de l'anticorps (vert) et celui du DAPI (bleu) afin de précisément localiser la structure cellulaire où était située la protéine d'intérêt.

Pour chaque condition expérimentale, deux contrôles ont été réalisés. Le premier consistait à effectuer un marquage complet sur des cellules n'ayant subi aucun traitement

(contrôle positif, C+). Le deuxième consistait à effectuer un marquage n'employant que l'anticorps secondaire afin de s'assurer de sa spécificité d'hybridation à l'anticorps primaire.

	Cible	Origine	Fournisseur (référence)	Dilution
Anticorps Primaires	α-actine	souris	Sigma (A2547)	1/500
	S1PR1	lapin	Santa Cruz (sc-4771)	1/500
	S1PR2	souris	Sigma (E4892)	1/100
	S1PR3	chèvre	Santa Cruz (sc-22214)	1/50
	PDGFR-β	lapin	Santa Cruz (sc-432)	1/50
Anticorps Secondaires	souris	chèvre	Molecular Probes (A-11001)	1/1000
	chèvre	singe	Santa Cruz (sc-2024)	1/100
	lapin	chèvre	Santa Cruz (sc-2012)	1/100

Tableau 9 : Anticorps utilisés pour les marquages immunohistochimiques.

2.8.1.2. .Quantification du signal fluorescent

A l'aide d'un microscope inversé Leica DM IRB relié à un capteur CCD (DS5-MC, Nikon), plusieurs champs microscopiques ont été photographiés aussi bien dans les longueurs d'ondes émises par le DAPI que celles émises par les anticorps. Grâce au logiciel NIS-AR, le nombre de cellules par champ photographié a pu être calculé ainsi que la luminance totale du champ (intensité lumineuse émise par les anticorps fluorescents).

Finalement, la luminance moyenne par cellule a été calculée pour trois champs pris de manière aléatoire pour chaque condition expérimentale.

2.8.2. Immunohistochimie

Les tumeurs extraites des rates ont été fixées dans du formol à 10 % et incluse en paraffine. Les coupes de 5 μm ont ensuite été déparaffinées dans du toluène 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, le cytoplasme est rose, les hématies sont rouges clairs à jaunes et les fibres de collagène sont roses-orangées. Les coupes ont été marquées avec un anticorps anti- α -actine à une dilution de 1/1000 (Dako, Glostrup, Danemark), révélé par un second anticorps fluorescent couplé à une Alexa 488. Pour chaque condition expérimentale, 60 à 100 % de l'ensemble de la coupe a été photographié et analysé avec le logiciel NIS-AR. Deux investigateurs indépendants ont quantifié la surface de nécrose, la densité vasculaire et l'épaisseur de la média.

2.9. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel StatView® 5.0 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, U.S.A.). La comparaison des moyennes a été faite en utilisant le test non paramétrique de Kruskal-Wallis (KW) pour 3 paramètres ou plus. Lorsque ce test indiquait une différence significative (i.e. $p < 0.05$), le test non paramétrique de Mann-Witney a ensuite été réalisé pour la comparaison de moyenne entre 2 paramètres.

3. Résultats / Discussion:

Les résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet de deux publications en 2012 dans des revues internationales à comité de lecture. Les résultats présentés et commentés dans les chapitres 3.1 à 3.6 ont été publiés dans *Breast Cancer Research and Treatment* [109].

3.1. Rôles des récepteurs de la S1P sur la migration des VSMCs induite par le PDGF-B

La vitesse de migration des VSMCs a été évaluée par une méthode en gel d'agarose (Fig. 22). La migration induite par le PDGF-B a été bloquée par la tyrphostine AG1296 (inhibiteur de PDGF-R) ou par le sunitinib malate. Le signal induit par la S1P passant par S1PR1 ou S1PR3 a été inhibé par le VPC-23019 ou par le fingolimod. Par rapport aux témoins, la vitesse de migration des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs) vers une source de PDGF-B était de 90% inférieure en présence d'AG1296 (Fig. 22A). Traitées par le VPC-23019, la vitesse de migration des VSMCs a diminué de 40% en présence de d'une source de PDGF-B et de 90% en présence de d'une source de S1P (Fig. 22B). L'inhibition simultanée de PDGFR- β et S1PR1/S1PR3 avec AG1296 + VPC-23019 a totalement bloqué la migration des VSMCs induite par le PDGF-B ou la S1P. Des résultats comparables ont été obtenus avec le sunitinib malate et/ou le fingolimod (Fig. 22C et 22D).

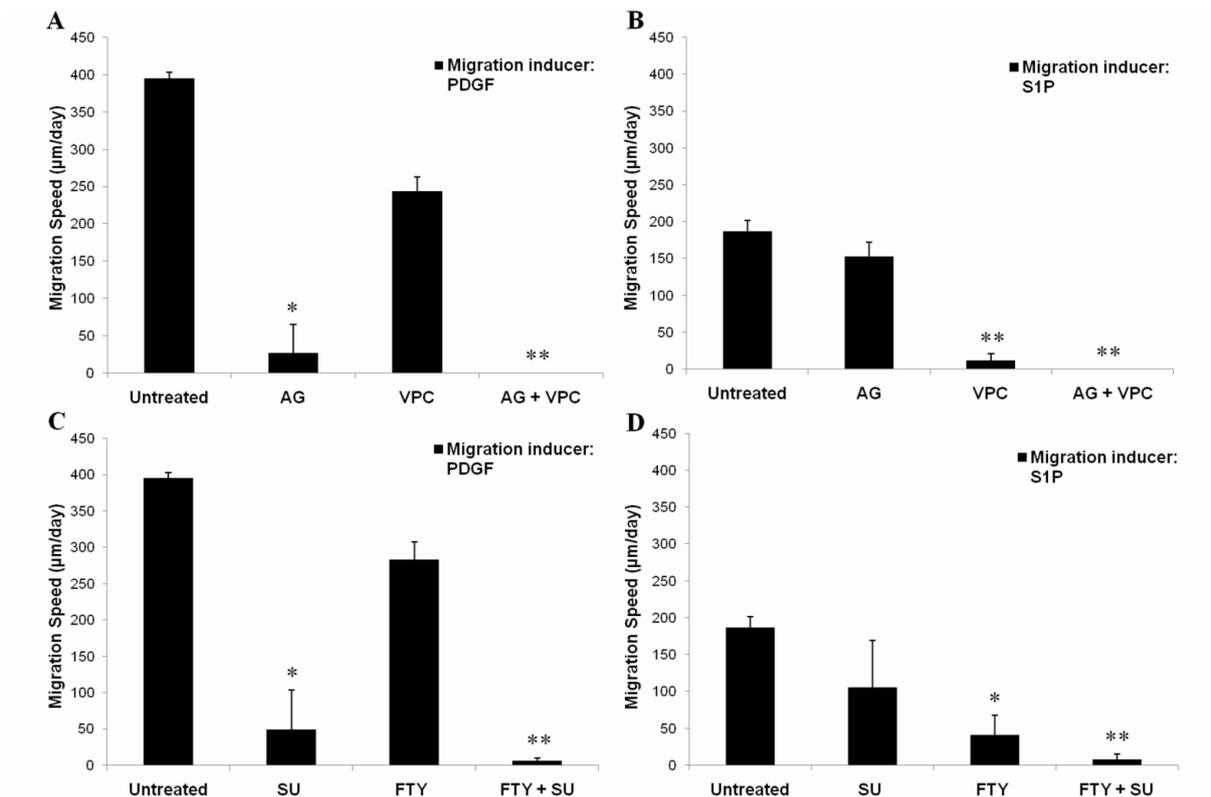


Figure 22 : Effet de l'inhibition de PDGFR et S1P1/3 sur la migration des VSMCs [109].

Vitesse de migration des VSMCs stimulées avec (A) PDGF-B (25 ng / ml) ou (B) S1P (1 µM) en présence de AG1296 (AG; 1 µM), VPC-23019 (VPC, 1 µM) ou les deux (AG+VPC). Vitesse de migration des VSMCs stimulées avec (C) PDGF-B (25 ng / ml) ou (D) S1P (1 µM) en présence de sunitinib malate (SU; 1 µM), de fingolimod (FTY; 100 nM) ou les deux (SU+FTY). La migration cellulaire a été mesurée après sept jours de traitement avec un test en gel d'agarose et analysé avec le logiciel NIS-AR. Les données représentent la moyenne (SEM) de trois expériences distinctes (*p <0,05 vs cellules non traitées; ** p <0,01 vs cellules non traitées).

3.2. Rôle des voies de signalisation de la S1P et du PDGF-B sur le recrutement des VSMCs par les cellules endothéliales ou tumorales

Nous avons déjà décrit l'utilisation d'une méthode pour étudier la migration et le recrutement des VSMCs par les cellules endothéliales (EJG) [28]. Dans des conditions expérimentales similaires, et après six jours de traitement ciblant les récepteurs PDGFR-β et S1PR1/S1PR3 avec AG1296 et VPC-23019, la migration des VSMCs induite par les cellules endothéliales (RAECs) a été totalement bloquée (Fig. 23A). Le même traitement a réduit la migration des VSMCs induite par les cellules de tumeur mammaire Walker 256 de 65% (Fig.

23B). Les résultats pour les inhibiteurs spécifiques de ces récepteurs ont ensuite été comparés à ceux du sunitinib malate de du fingolimod. Le traitement combinant sunitinib malate et fingolimod a eu un effet cumulatif pour lequel la vitesse de migration des VSMCs induite par les RAECs a diminué de 80% (Fig. 23C). Dans les mêmes conditions, la migration induite par les cellules Walker 256 a été abolie (Fig. 23D).

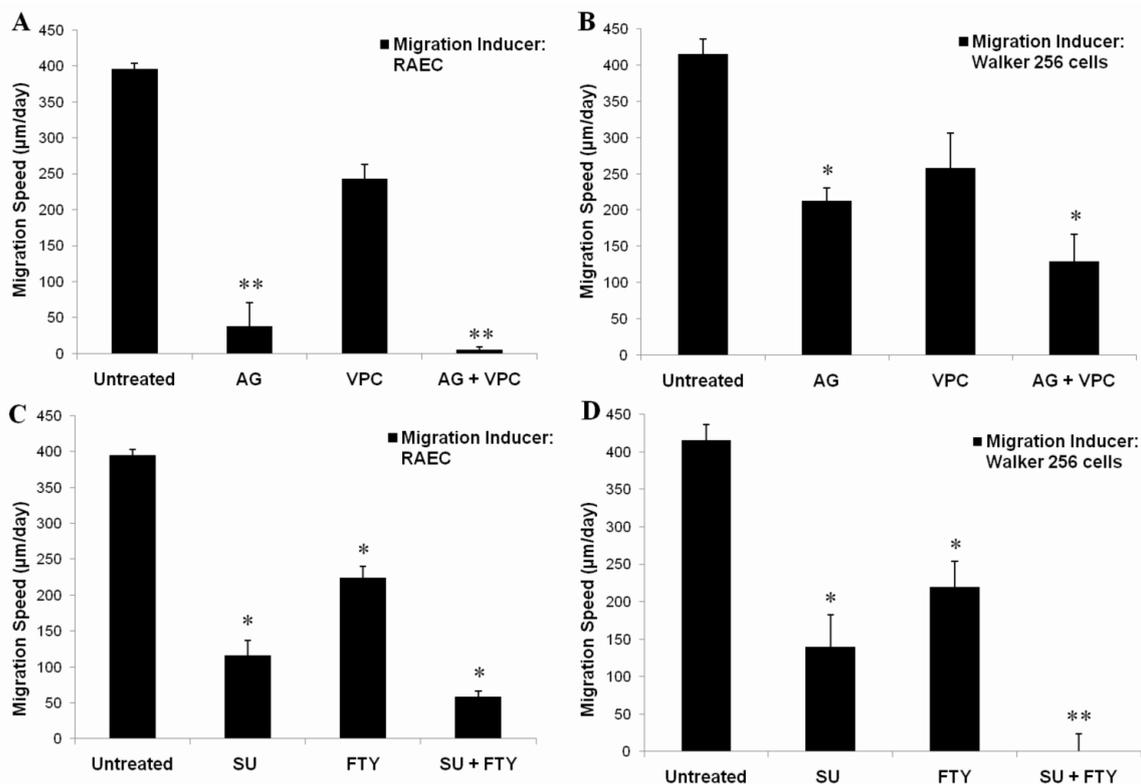


Figure 23 : Inhibition du recrutement des VSMCs induit par des cellules endothéliales (RAECs) ou des cellules tumorales (cellules Walker 256) [109].

Vitesse de migration des VSMCs traitées avec AG1296 (AG; 1 M), VPC-23019 (VPC, 1 M) ou les deux (AG+VPC) et dont la migration a été orientée par les cytokines sécrétées par (A) des cellules endothéliales d'aorte de rat (RAECs) ou (B) des cellules de cancer du sein (Walker 256). Vitesse de migration des VSMCs traitées avec sunitinib malate (SU; 1 μM), fingolimod (FTY; 100 nM) ou les deux (SU + FTY) et dont la migration a été orientée par les cytokines sécrétées par (C) des RAECs ou (D) des cellules Walker 256. La vitesse de migration a été calculée après huit jours de traitement. Les données correspondent aux moyennes (SEM) de trois expériences distinctes (* $p < 0,05$ vs cellules non traitée; ** $p < 0,01$ vs cellules non traitées).

3.3. Le blocage de la voie du signal PDGF-B/S1P perturbe l'organisation spatiale des VSMCs

L'utilisation du blanc d'œuf comme matrice de culture cellulaire tridimensionnelle similaire au Matrigel™ a été initialement décrite par Kaiparettu *et al.* (25). Dans une telle matrice, les VSMCs forment un réseau similaire à celui formé par les cellules endothéliales imitant le développement précoce de néovaisseaux (26-29). Dans la première rangée d'images de la figure 24A, un réseau cellulaire de grande envergure (développé sur plusieurs mm²) peut être observé sous une lumière visible ou en fluorescence avec un très faible grossissement (x 25). Les détails visualisés à plus fort grossissement (x 200) montrent l'organisation des cellules sous forme de fibres cylindriques évoquant des néo-capillaires. Ce réseau cellulaires est dense, formé de larges nœuds, liés par de multiples interconnexions. Les rangées d'images suivantes (2 et 3) de la figure 24A montrent des VSMCs traitées avec un ou deux inhibiteurs simultanément. Les VSMCs traitées par le VPC-23019 ou le fingolimod parviennent à former un réseau tridimensionnel comparable aux cellules non traitées. L'analyse des images a confirmé que le nombre de nœuds (Fig. 24B) et les liens entre eux n'étaient pas significativement différents de ceux formés par les cellules témoins non traitées (Fig. 24C). Les cellules traitées avec AG1296 ou sunitinib malate ne sont parvenues à former que quelques nœuds cellulaires avec de rares extensions ou ont survécu sous forme de monocouches à l'image des cultures standards. Lorsque les récepteurs PDGFR-β et S1PR1/S1PR3 ont été inhibés avec AG1296 et VPC-23019 ou sunitinib malate et fingolimod simultanément, les cellules ont été incapables de s'organiser en réseau. Dans ces conditions de traitement, les nœuds cellulaires étaient difficiles à détecter en lumière visible et les prolongements cellulaires étaient presque inexistantes.

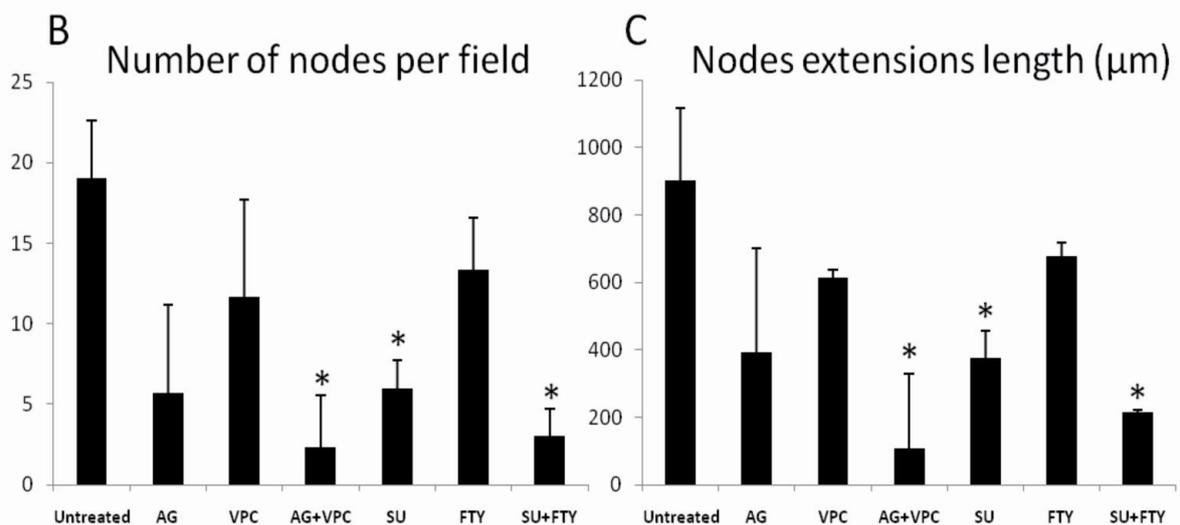
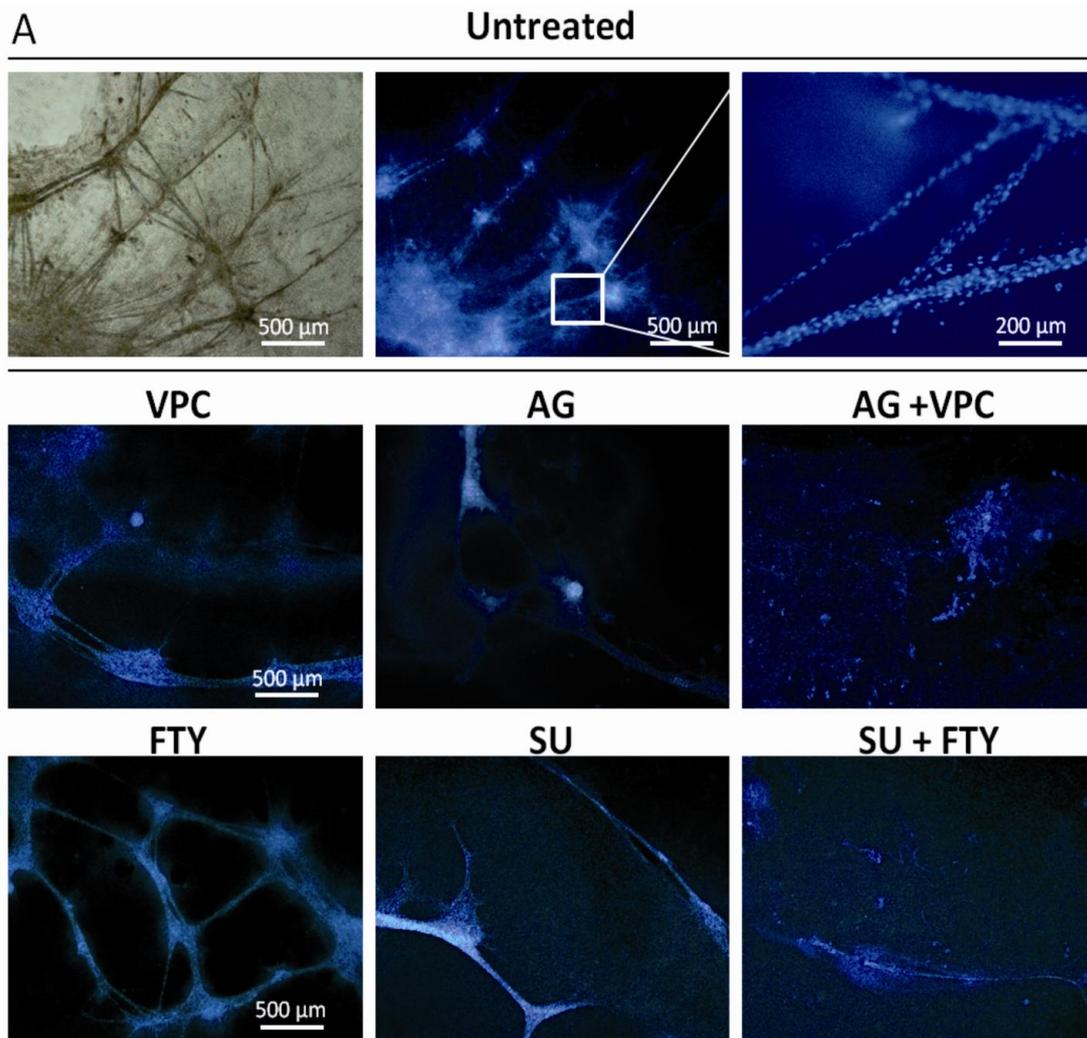


Figure 24: Inhibition de la croissance et de l'organisation en 3 dimensions des VSMCs dans une matrice de blanc d'œuf [109].

Les VSMCs ont été observés tout au long de leur croissance et de leur migration dans le blanc d'œuf grâce à un marquage fluorescent des noyaux cellulaires avec le Hoechst 33258 (100 ng / ml). **(A)** Les photographies des réseaux cellulaires ont été prises après quatre jours

de culture avec ou sans traitements inhibiteurs. Pour chaque condition de traitement, l'analyse d'image a été réalisée sur trois champs microscopiques différents (x25) pour quantifier **(B)** le nombre de nœuds cellulaires par champ et **(C)** la longueur des extensions entre ces nœuds. Les données correspondent aux moyennes (SEM) de trois expériences distinctes (*p <0,05 vs cellules non traitée).

3.4. Synergie du sunitinib malate et du fingolimod pour inhiber la croissance des tumeurs mammaires et leurs disséminations métastatiques

Les effets du sunitinib malate et du fingolimod ont été évalués sur des tumeurs mammaires induites chez des rates Sprague-Dawley par la greffe de 1.10^4 cellules Walker 256. Deux stratégies thérapeutiques ont été testées. Dans la première, les rates ont reçu le traitement cinq jours après la greffe, avant que les tumeurs ne soient détectables en vue de prévenir le développement tumoral. Dans le second, les rates ont reçu le traitement sept jours après la greffe, lorsque les tumeurs étaient déjà détectables par palpation, dans le but de ralentir la progression tumorale. Lorsque le traitement a débuté cinq jours après la greffe, 80 % des rats non traités ont développé des tumeurs avec un volume moyen de 16 cm³ au jour 21, alors que seulement 20 % des rats traités par sunitinib malate ont développé des tumeurs, avec un volume moyen d'environ 0,5 cm³ au même temps (Fig. 25A). L'incidence des tumeurs dans le groupe traité par le fingolimod était semblable à celle du groupe traité par sunitinib malate, mais l'effet produit sur la croissance tumorale par le fingolimod était plus faible. Dans ce groupe, le développement tumoral a été retardé par rapport aux témoins, mais la vitesse de croissance des tumeurs était similaire à celle du groupe témoin. Le fingolimod est apparu moins toxique que le sunitinib malate pour les animaux, comme le suggère le faible niveau de variation du poids moyen des animaux traités par le fingolimod. En revanche, les rats traités par sunitinib malate ont perdu jusqu'à 20 % de leur poids initial. Dans le groupe traité à la fois par sunitinib malate et fingolimod, aucun rat n'a développé de tumeur détectable ni de métastases et leur perte moyenne de poids était intermédiaire entre celles des groupes traités par sunitinib malate ou fingolimod.

Lorsque le traitement a commencé sept jours après la greffe (Fig. 25B), il était nécessaire d'euthanasier les rats non traités après 14 jours en raison de leurs grands volumes de tumeur. Les volumes moyens des tumeurs chez les rats traités avec le sunitinib malate ou sunitinib+fingolimod ne représentaient respectivement que de 6 % et 4 % du volume tumoral moyen des rats non traités. La vitesse de croissance moyenne des tumeurs traitées par fingolimod seul se situait à un niveau intermédiaire entre celles des rats traités avec sunitinib+fingolimod et celles des contrôles non traités. Ces animaux ont été euthanasiés au jour 18. Au jour 25, le volume moyen des tumeurs des rats traités par sunitinib malate seul était de 7,4 cm³. En outre, les tumeurs des rats traités par sunitinib+fingolimod étaient de 40 % inférieures à celles des rats traités avec le sunitinib seul. Cependant, bien que les durées de vie des animaux de ces deux groupes ont été plus longues que celles des animaux des autres groupes, les pertes de poids observées dans les groupes sunitinib et sunitinib+fingolimod nous ont conduit à mettre fin à l'expérimentation conformément aux directives éthiques.

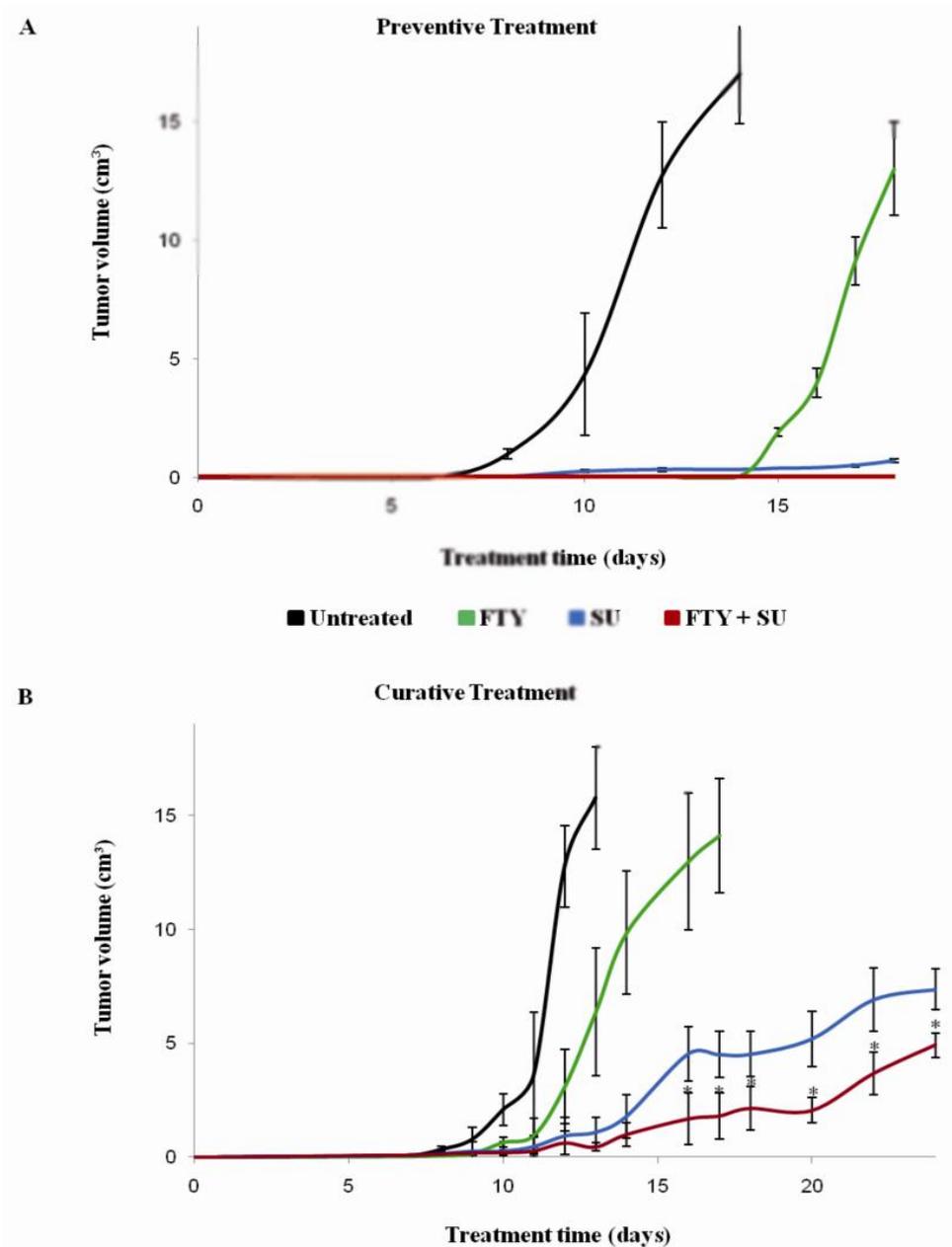


Figure 25 : Effets combinés du sunitinib malate et du fingolimod sur la croissance de tumeur mammaires in vivo [109].

Des groupes de cinq à dix rats ont reçu une injection de 1.10^4 cellules Walker 256 dans la glande mammaire abdominale gauche. La croissance tumorale a été mesurée quotidiennement. Dans chaque groupe, les rats ont été traités quotidiennement avec du sunitinib malate (SU; 40 mg / kg), ou du fingolimod (FTY; 5 mg / kg), ou une combinaison des deux (SU+FTY). Le groupe témoin était composé de rats porteurs de tumeurs qui n'ont pas été traités. **(A)** Les traitements ont commencé deux jours avant que les tumeurs ne puissent être détectées par palpation, ce qui correspond à cinq jours après la greffe des cellules Walker 256. Cette stratégie thérapeutique a été appelée «traitement préventif». **(B)** Les traitements ont commencé après que les tumeurs aient été détectables, soit sept jours après la greffe de cellules Walker 256. Cette stratégie a été appelée «traitement curatif». La croissance de la tumeur du groupe SU+FTY a été comparée à celle du groupe SU (*: $p < 0,05$).

3.5. Le fingolimod induit une normalisation de la vascularisation des tumeurs

L'analyse immunohistochimique de la vascularisation des tumeurs avec un anticorps dirigé contre l' α -actine a révélé une vascularisation tumorale riche et anarchique chez les rats non traités (Fig. 26A). Ayant eues une croissance très rapide, ces tumeurs présentaient de grandes zones nécrotiques (Fig. 26E) et une densité vasculaire périphérique très élevée corrélée à une forte activité métabolique (Fig. 26F). Les tumeurs des rats traités par sunitinib malate ont eu une croissance beaucoup plus faible que celles des rats non traités, et ces tumeurs présentaient de petites zones de nécrose et une densité vasculaire inférieure. Dans ce groupe, la paroi vasculaire était principalement composée d'un endothélium entouré d'une couche de cellules musculaires (Fig. 26B). La densité vasculaire intra-tumorale des tumeurs traitées par fingolimod seul n'était pas significativement différente de celle des animaux témoins. Cependant, la distribution vasculaire de ces tumeurs était plus régulière et la paroi vasculaire, plus matures, clairement composée de plusieurs couches de VSMCs pour les plus gros vaisseaux (Fig. 26C). Les tumeurs des rats traités par sunitinib+fingolimod étaient largement nécrotiques (80 % de la superficie totale) et présentaient une très faible densité vasculaire intra-tumorale. Avec cette combinaison de traitements, la paroi des gros vaisseaux était nettement plus structurée qu'avec les autres traitements, et présentait une épaisse média, composée de plusieurs couches de cellules musculaires lisses (Fig. 26D).

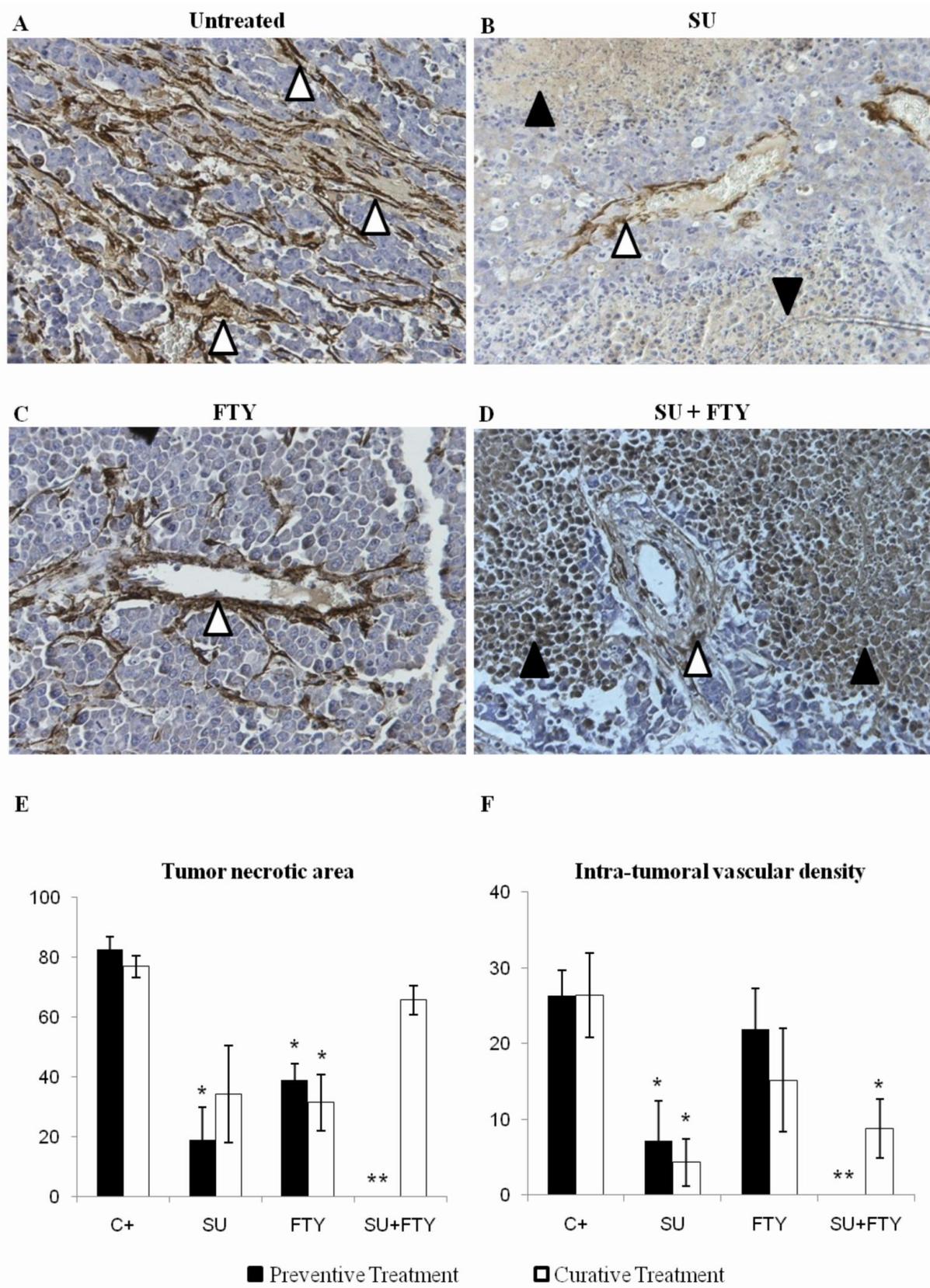


Figure 26 : Le fingolimod induit une normalisation de la vascularisation des tumeurs mammaires de rat sein [109].

Les coupes paraffinées de tumeurs mammaires de rat ont été marquées avec un anticorps anti- α -actine pour identifier les cellules murales vasculaires intra-tumorales. **(A, B, C, D)** Structure de la paroi vasculaire des tumeurs mammaires induites par la greffe de cellules Walker 256 et traités avec sunitinib malate (SU; 30 mg / kg), fingolimod (FTY; 5 mg / kg) ou les deux (SU+FTY). Les flèches noires indiquent les zones de nécrose et les flèches blanches indiquent les parois des vaisseaux. Pour les mêmes sections, les zones nécrotiques intra-tumorales **(E)** et la densité vasculaire intra-tumorale **(F)** ont été mesurées sur dix champs microscopiques différents par deux expérimentateurs indépendants. Les données représentent la moyenne (SEM) des dix champs analysés avec le logiciel NIS-AR (* $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ vs non traités).

3.6. Discussion

Considérant que la plupart des thérapies anti-angiogéniques ont pour objectif principal de bloquer la croissance et la migration des cellules endothéliales, nous avons étudié des traitements inhibant à la fois ces cellules et les cellules murales afin d'optimiser les résultats cliniques obtenus avec ces thérapies ciblées. Des études antérieures ayant montré que le PDGF et la S1P jouent un rôle essentiel dans le recrutement des cellules murales au cours de l'angiogenèse [53, 57, 110-113], nous avons testé des inhibiteurs de ces deux voies de signalisation. Les inhibiteurs spécifiques, tels qu'AG1296 pour le PDGFR et VPC-23019 pour les récepteurs S1PR1 et S1PR3, peuvent diminuer la migration des VSMCs voire l'arrêter totalement lorsque ces molécules sont présentes simultanément. De même, des inhibiteurs moins spécifiques tels que le sunitinib malate pour le PDGFR et le fingolimod pour S1PR1 et S1PR3, peuvent aussi diminuer significativement la migration des VSMCs. A notre connaissance, ces résultats montrent pour la première fois que le fingolimod inhibe la migration des VSMCs bien que des résultats comparables aient été décrits pour le fingolimod combiné à des inhibiteurs de VEGFR sur des cellules endothéliales humaines [26]. Comme S1PR3 est principalement exprimé par les VSMCs de rat adulte [55], nos résultats suggèrent que le fingolimod régule négativement le signal de la S1P médié par S1PR3 d'une manière comparable à celle observée pour S1PR1 [5]. Notre hypothèse est donc que le PDGFR pourrait participer à une plate-forme de signalisation impliquant S1PR1 et S1PR3. Dans ce cas, la durée et l'intensité du signal définirait une réponse chimiotactique ou une prolifération cellulaire comme suggéré par Pyne *et al.* [114]. De plus, des résultats

similaires ont été obtenus en utilisant soit un inducteur spécifique (PDGF-B ou S1P) soit l'un des milieux produits par les cellules endothéliales de rat (RAECs) ou les cellules tumorales mammaires (Walker 256). Considérant que les voies de signalisation activée par le PDGF et la S1P ne sont pas les seules mises en jeu au cours de l'angiogenèse, ces résultats soit confirment que ces signaux sont les principaux inducteurs de la croissance et de la migration des cellules murales vasculaires soit que les molécules utilisées peuvent bloquer d'autres voies de signalisation cellulaire.

Le blanc d'œuf a été récemment proposé comme une alternative au Matrigel® pour la culture cellulaire en trois dimensions [108]. Après l'avoir adapté aux cellules vasculaires pour tester des molécules anti-angiogéniques, nous avons trouvé ce modèle plus fiable, et moins cher que le Matrigel® d'autant qu'il est facile à mettre en œuvre. La culture des VSMCs dans cette matrice, nous a permis de montrer par l'inhibition de ces récepteurs que le signal induit par PDGFR- β /S1PR1-3 était nécessaire à l'organisation spatiale des VSMCs. L'inhibition de la voie de la S1P par le VPC-23019 ou le fingolimod n'a que faiblement altéré l'organisation spatiale des VSMCs, suggérant que cette voie ne peut avoir qu'un rôle secondaire dans ce processus. Au contraire, l'inhibition de la voie du PDGF réduit considérablement la formation de réseau cellulaire. Mais seule l'inhibition combinée de PDGFR et S1PR1/3 permet de totalement abolir les capacités des VSMCs à former un réseau pré-vasculaire. Nos résultats suggèrent que le contrôle voire le blocage de la communication entre les voies de signalisation de la S1P et du PDGF-B pourrait être particulièrement utile dans constituer un atout majeur des futurs traitements anti-angiogéniques.

Le modèle de cancer du sein induit chez le rat par les cellules Walker 256 présente plusieurs avantages [115]. C'est un modèle orthotopique richement vascularisé d'une tumeur superficielle qui se développe chez des animaux immunocompétents. Son inconvénient majeur réside dans l'agressivité des tumeurs. Lorsque les tumeurs sont détectables, la durée de vie des rates est seulement de sept jours, après quoi le volume de la tumeur peut dépasser 15 cm³ ce qui implique l'euthanasie des animaux pour des raisons éthiques.

Compte tenu de l'agressivité des cellules Walker 256, nous avons utilisé ce modèle dans deux situations différentes: en «traitement préventif», où le traitement a commencé cinq jours après la greffe, avant que les tumeurs ne soient détectables à la palpation, et en «traitement curatif», où le traitement a commencé sept jours après la greffe, lorsque les tumeurs étaient déjà détectable. Avec le «traitement préventif», aucune tumeur ne s'est développée chez les animaux traités par sunitinib malate et fingolimod. Cette association médicamenteuse s'est également avérée très efficace au cours du «traitement curatif» même si dans ce cas la croissance tumorale n'a été que retardée. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que le sunitinib malate et le fingolimod sont particulièrement actifs au cours des étapes précoces de l'angiogenèse lorsque les cellules endothéliales et les VSMCs commencent à migrer vers la tumeur pour former de nouveaux capillaires. Cependant, nous avons pu remarquer que le «traitement curatif» par SU+FTY induit une nécrose tumorale comparable à celles des non traités. Cet effet pourrait être lié à l'inhibition de la SK1 par le fingolimod ce qui conduit à une augmentation de l'apoptose des cellules tumorales [24]. Le sunitinib malate est un inhibiteur de VEGFR, PDGFR et FGFR. Il est d'ores et déjà utilisé pour traiter des carcinomes avancés des cellules rénales et des tumeurs stromales gastro-intestinales. Le fingolimod, malgré ces propriétés anti-angiogéniques et anti-tumorales [17, 22], n'a, à notre connaissance (vérifié dans www.clinicaltrials.gov), encore aucune indication en cancérologie [116-118]. Nos résultats *in vivo* montrent que le fingolimod potentialise les effets du sunitinib malate. Ces résultats sont cohérents avec nos observations *in vitro*, même si le sunitinib malate et le fingolimod ne sont pas des inhibiteurs hautement spécifiques. En outre, le fingolimod administré seul ou en combinaison, est apparu comme un modulateur de la structure de la paroi vasculaire, ce qui est cohérent avec la modulation du phénotype cellulaire décrit par Wamhoff *et al.* [119]. Cette observation semble d'un grand intérêt potentiel, car la normalisation vasculaire constitue une des clés de la diffusion intra-tumorales des chimiothérapies pour en augmenter l'efficacité [120-122]. Seulement utilisé actuellement comme immunomodulateur dans le traitement de la sclérose en plaques [6], le fingolimod pourrait rapidement passer en essais cliniques. Ces essais permettraient

d'évaluer les bénéfices qu'il induit en synergie avec d'autres traitements ciblant les voies du VEGF et du PDGF sur la régulation de l'angiogenèse tumorale. En outre, les rats traités avec le sunitinib malate et le fingolimod ont connu une perte de poids moins importante que ceux traités avec le sunitinib malate seul, ce qui suggère une toxicité inférieure du traitement combiné (données non présentées). Ainsi, l'utilisation du fingolimod en combinaison avec d'autres traitements anti-angiogéniques permet d'envisager une diminution des doses avec une efficacité clinique comparable, et une potentielle réduction des effets secondaires.

Les résultats présentés et commentés dans les chapitres 3.7 à 4.3 ont été publiés dans la revue Biochimie [123]. Compte tenu des résultats précédents concernant les effets *in vitro* et *in vivo* du fingolimod sur les cellules tumorales et musculaires vasculaires, notre travail a consisté à mieux caractériser les mécanismes mis en jeu par cette molécule sur la voie de signalisation de la S1P. Nous avons essentiellement cherché à répondre à trois questions :

- A l'instar des lymphocytes T, le fingolimod est-il capable d'inhiber l'expression des récepteurs de la S1P des VSMCs ?
- Le fingolimod exerce-t-il un effet agoniste ou antagoniste de la S1P sur les VSMCs ?
- Quels sont les récepteurs de la S1P activés ou inhibés par le fingolimod sur les VSMCs ?

3.7. La S1P régule négativement la prolifération et la migration des VSMCs induites par le PDGF-B

L'évaluation de la croissance et de la migration des VSMCs en présence de 25 ng/ml de PDGF-B ou de 10% de SVF a donné des résultats similaires (Fig. 27A et 27B), confirmant que le PDGF-B est un facteur de croissance puissant pour ces cellules. A une dose de 1 μ M,

la S1P induit une réaction cellulaire beaucoup plus faible que le SVF ou le PDGF-B. Après 8 jours de stimulation par la S1P, la prolifération et la migration des VSMCs étaient respectivement de 30% et 50% inférieure à celle induite par le PDGF-B. Une concentration de 10 μ M de S1P n'a produit une croissance et une migration des VSMCs que légèrement supérieure sans être significativement différente de celle obtenue avec 1 μ M (données non présentées). La co-stimulation des VSMCs par le PDGF et la S1P a induit une réponse intermédiaire. Si ces deux voies de signalisation communiquent par le biais d'interactions entre leurs récepteurs, ces résultats confirment l'effet antagoniste du signal de la S1P sur celui du PDGF-B chez les VSMCs [18, 30, 31].

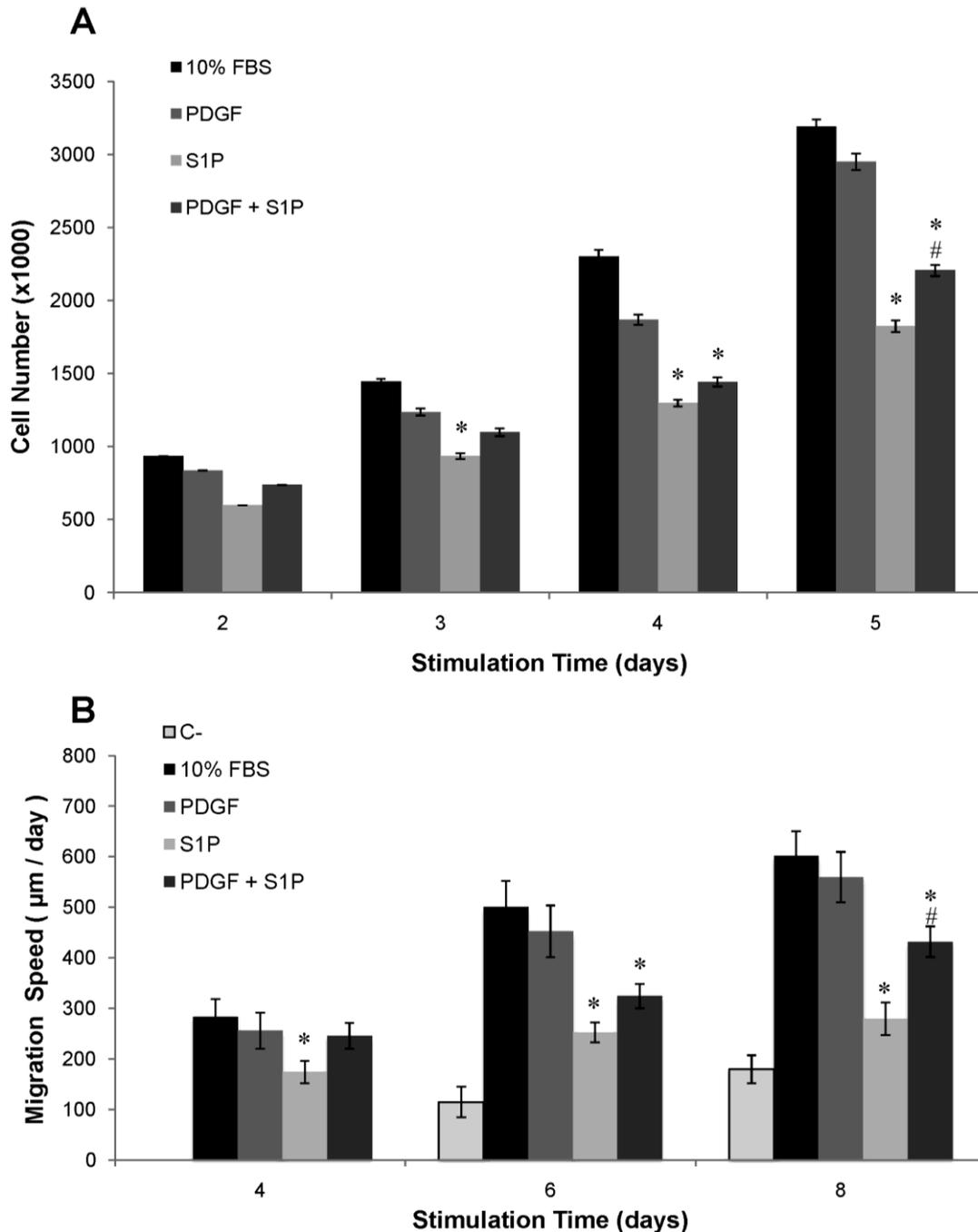


Figure 27 : Croissance et migration des VSMCs induites par le PDGF et la S1P [123].

(A) Les VSMCs ont été stimulées avec SVF (10%), PDGF-B (25 ng / ml), S1P (1 µM) et un mélange (1:1) de PDGF-B et de S1P durant 1 à 8 jours. Les cellules ont ensuite été traitées avec de la trypsine et comptées. **(B)** La vitesse de migration des VSMCs a été mesurée en utilisant un test en gel d'agarose, un microscope à fluorescence (Leica DMIRB) et le logiciel NIS-AR. Les cellules ont été exposées au SVF (10%), au PDGF-B (25 ng / ml), à la S1P (1 µM) et au mélange PDGF-B+S1P. Le contrôle négatif (C-) correspond à du DMEM sans sérum. Les données représentent la moyenne (SEM) de trois expériences distinctes. (* P <0,05 pour l'échantillon vs cellules traitées avec 10% SVF et # p <0,05 pour l'échantillon par rapport aux cellules témoins (C-)).

3.8. Rôle des récepteurs de la S1P sur la migration des VSMCs induite par la S1P ou le PDGF-B

L'inhibition de l'expression du récepteur PDGFR- β par des siRNA a réduit la vitesse de migration, induite par le PDGF-B, des cellules transfectées de 55 % par rapport aux cellules non transfectées (Fig. 28.) La transfection simultanée avec des siRNA ciblant PDGFR- β /S1PR1 ou PDGFR- β /S1PR3 ont exercé un effet additif, en diminuant la vitesse de migration d'environ 80 %. En revanche, l'inhibition de S1PR2 (seul ou combinée à l'inhibition de PDGFR- β) n'a eu aucun effet notable sur la migration cellulaire induite la PDGF-B. L'inhibition de S1PR1 ou S1PR3 a diminué la vitesse de migration des VSMCs induite par la S1P de près de 75 %, tandis que celle de S1PR2 n'a eu aucun effet significatif. L'inhibition de PDGFR- β n'a pas affecté la migration des VSMC induite par la S1P.

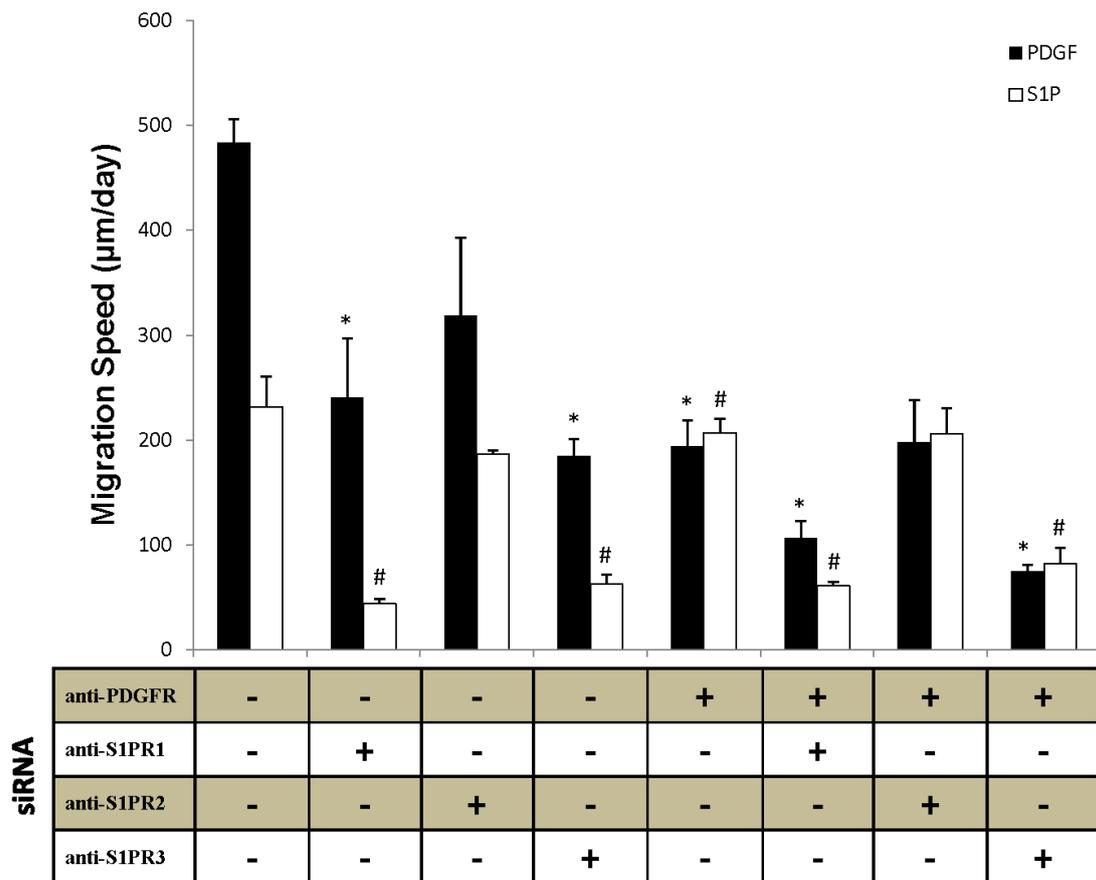


Figure 28 : Inhibition de la migration des VSMCs par des siRNA [123].

Vitesse de migration des VSMCs traitées par des siRNA et exposées au PDGF-B (25 ng / ml) ou à la S1P (1 μ M). Les cellules ont été transfectées avec 100 pM de siRNA tous les 2 jours. La vitesse de migration a été calculé après 6 jours de stimulation grâce à un test en gel d'agarose. Les données représentent la moyenne (SEM) de trois expériences distinctes (* p <0,05 vs. cellules non traitées avec PDGF-B; # p <0,05 vs. cellules non traitées avec S1P).

3.9. Régulation de l'expression des récepteurs de la S1P par le fingolimod

Nous avons d'abord évalué le niveau d'expression des différents isoformes de récepteurs de la S1P exprimées par les VSMC. S1PR1 et S1PR3 sont simultanément exprimé par ces cellules à un niveau comparable alors que l'expression de S1PR2 est plus faible (figure 29A). Après 24 h de traitement avec 100 nM de fingolimod, les niveaux d'expression de PDGFR- β et S1PR2 sont restés stables alors que ceux de S1PR1 et S1PR3 ont été respectivement réduits de 30 et 55 %. L'expression de PDGFR- β , S1PR1, S1PR2 et S1PR3 par les VSMCs a ensuite été inhibée par des siRNA spécifiques. Les siRNA choisis ont été validées par western blot et immunomarquage des récepteurs (figure 29B et 29C). Nous avons ensuite comparé l'effet des siRNA et du fingolimod sur ces récepteurs. La fluorescence cytoplasmique observée lors de la transfection des deux siRNA contrôles (non catalytiques) a montré un taux de transfection élevé pour tous les siRNA testés. Les siRNA contrôles n'ont eu aucun effet significatif sur les niveaux d'expression des récepteurs (données non présentées). Aucun des siRNA choisis n'a produit d'inhibition non spécifique supérieure à 5% du niveau du contrôle. Ces tests d'immunofluorescence ont également montré que les combinaisons de multiples siRNA pour l'inhibition de la même cible n'ont pas permis d'obtenir un niveau d'inhibition supérieur à l'utilisation d'un seul siRNA par cible (données non présentées). L'expression de PDGFR- β , S1PR1, S1PR2 et S1PR3 était à peine détectable par un examen visuel des VSMCs fluorescence 24 h après la transfection des siRNA. Par conséquent, nous avons déterminé les niveaux d'expression des récepteurs en évaluant la luminance des anticorps spécifiques de chaque cible grâce au logiciel NIS-AR (figure 29C). L'analyse des images nous a permis dévaluer une diminution de 66% du niveau d'expression pour PDGFR- β , de 80 % pour S1PR1 et de 73 % pour S1PR3. Comme S1PR2

n'a pas été significativement affectée par le traitement avec le fingolimod, l'analyse des données concernant son expression n'a pas été présentée pour simplifier la compréhension des résultats. Le traitement combinant un siRNA anti-PDGFR- β ou anti-S1PR1 avec le fingolimod n'a pas présenté d'effet cumulatif. Le fingolimod + siRNA anti-S1PR3, a lui induit une diminution supplémentaire de 25 % de l'expression de S1PR3 par rapport au traitement avec le siRNA seul. Enfin, nous avons remarqué que le marquage de S1PR1 était nettement augmenté dans les régions nucléaires et péri-nucléaires alors que celui de S1PR3 était clairement cytoplasmique.

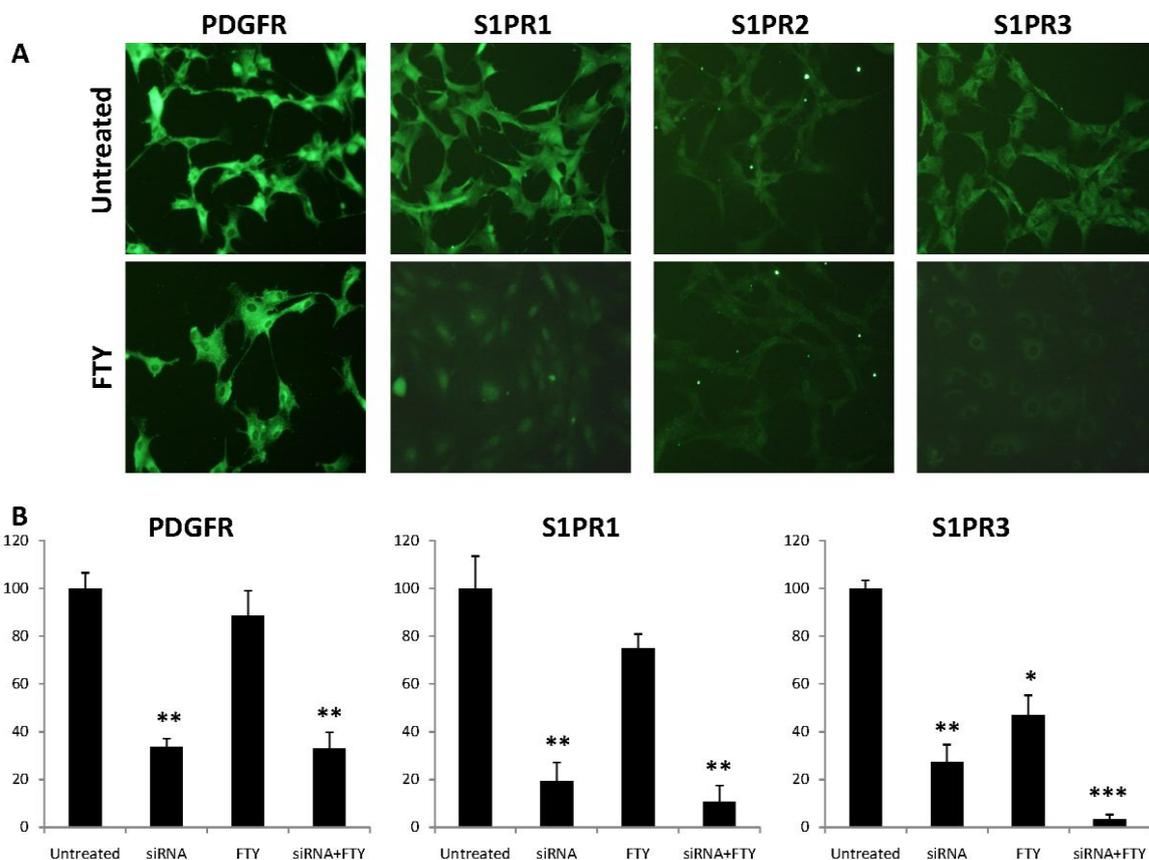


Figure 29 : Régulation négative de PDGFR- β et S1PR1-3 induite par le fingolimod et/ou des siRNA [123].

(A) Marquage par immunocytochimie de PDGFR- β , S1PR1, S1PR2 et S1PR3 sur des VSMCs traitées avec 100 nM de fingolimod (FTY) pendant 48 heures par rapport aux cellules non traitées. (B) Quantification de l'expression des récepteurs par analyse d'image de VSMC marquées. La fluorescence des anticorps a été mesurée en utilisant le logiciel NIS-AR. Les valeurs de luminance obtenues pour les cellules traitées par des siRNA ont été comparées à celles des cellules non traitées. Les cellules ont été marquées 48 heures après traitement. Les données représentent la moyenne (SEM) de trois expériences distinctes. (* $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs cellules non traitées).

3.10. Effet du fingolimod sur la croissance des VSMCs induite par le PDGF-B

Après 48 h de traitement avec 100 nM fingolimod, la croissance des VSMCs, en présence de 25 ng / ml de PDGF-B, a été réduite de 45 % par rapport aux cellules non traitées (Fig.30). Dans les mêmes conditions, les VSMCs, traitées avec un inhibiteur de la sphingosine kinase 1 à 1 nM, présentaient une croissance similaire aux cellules non traitées. Lorsque les cellules ont été traitées simultanément avec un siRNA anti-PDGFR- β ou anti-S1PR1 et le fingolimod (100 nM), une réduction de 80% dans la croissance cellulaire a été observée ($p < 0,01$). La combinaison de siRNA anti-S1PR2 ou anti-S1PR3 avec le fingolimod n'a pas produit de changement significatif par rapport au traitement avec le fingolimod seul. Enfin, le triple traitement par fingolimod, et deux siRNA anti-PDGFR- β et anti-S1PR1 a entraîné une réduction de 93 % ($p < 0,001$) de la croissance des VSMCs. Dans des conditions de culture standard (10 % de SVF), ni les siRNA ni le fingolimod n'ont induit de réduction significative de la croissance des VSMCs.

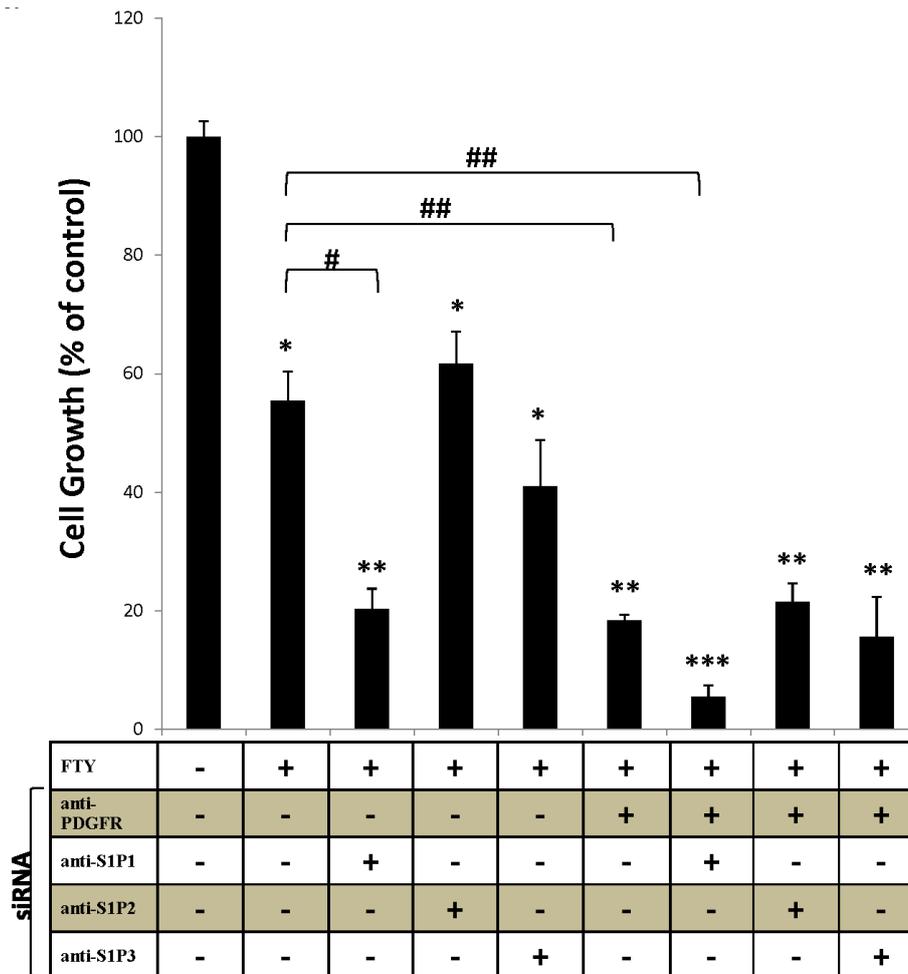


Figure 30 : Inhibition de la croissance des VSMCs induite par le fingolimod et/ou des siRNA [123].

Les cellules, exposés au PDGF-B (25 ng / ml), ont été traités avec 100 nM de fingolimod (FTY) et transfectées avec 100 pM de siRNA 24 heures après l'ensemencement. La croissance cellulaire a été mesurée après 4 jours de traitement. Les données représentent la moyenne (SEM) de trois expériences distinctes. (* P <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 vs cellules non traitées; # p <0,05, # # p <0,01, # # # p <0,001 vs cellules traitées avec FTY uniquement).

3.11. Effet du fingolimod sur la migration des VSMCs induite par le PDGF-B

Stimulée par 25 ng/mL de PDGF-B, la vitesse de migration de cellules musculaires lisses vasculaires a été d'environ 20 % inférieure en présence de 100 nM fingolimod comparé aux cellules non traitées (Fig. 31). L'inhibiteur de la sphingosine kinase (1 nM) n'a que faiblement réduit la vitesse de migration des VSMCs sous la même stimulation. Le fingolimod combiné à un seul siRNA anti-PDGFR- β ou anti-S1PR3 a respectivement induit

une réduction de la vitesse de migration des VSMCs de 80 % et 67 % ($p < 0,01$). Le traitement fingolimod + anti-S1PR1 a réduit la vitesse des VSMCs de 48 % et le siRNA anti-S1PR2 n'a pas produit d'effet additif avec le fingolimod. Le triple traitement par fingolimod, et deux siRNA anti-PDGFR- β et anti-S1PR1 a entraîné une réduction de 87 % de la vitesse de migration des VSMCs et celui combinant fingolimod, anti-PDGFR- β et anti-S1PR3 a pratiquement aboli la mobilité des VSMCs (2 %, $p < 0001$). Dans des conditions de culture standard (10 % de SVF), ni les siRNA ni le fingolimod n'ont induit de réduction significative de la migration des VSMCs.

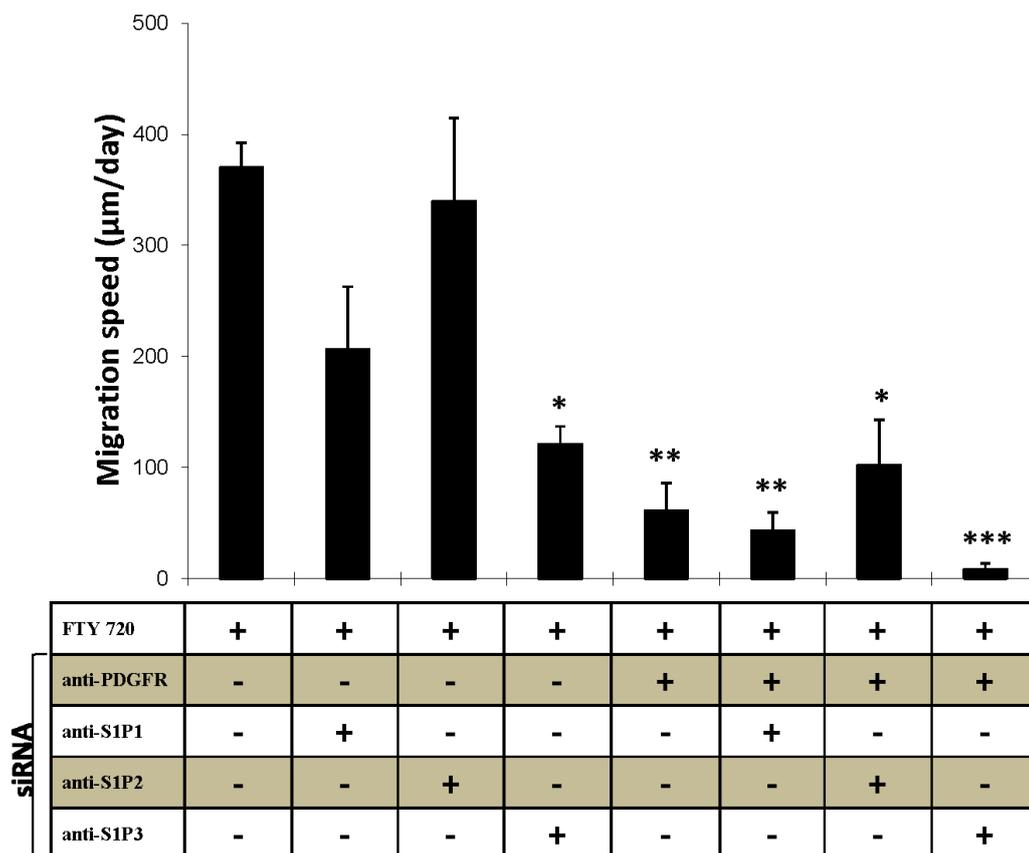


Figure 31: Inhibition de la migration des VSMCs induite par le fingolimod et/ou des siRNA [123].

Les cellules, exposés au PDGF-B (25 ng / ml), ont été traités avec 100 nM fingolimod (FTY) et transfectées avec 100 pM de siRNA 24 heures après l'ensemencement. La vitesse de migration cellulaire a été calculée après 6 jours de migration en gel d'agarose. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs cellules traitées avec FTY seul).

3.12. Discussion

Comme de précédentes études ont montré que les voies de signalisation du PDGF-B et de la S1P interagissent l'une avec l'autre [53, 57, 124, 125], nous avons étudié les interactions entre les récepteurs de ces facteurs de croissance sur les VSMCs de rat. Nos résultats ont montré que la S1P régule négativement à la fois la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses vasculaires induite par le PDGF-B, confirmant ceux de Goparaju et al. obtenus sur des fibroblastes embryonnaires de souris [126]. Cependant, l'effet physiologique de la transactivation de PDGFR- β par les récepteurs de la S1P reste controversé et dépend du type cellulaire étudié, de l'isoforme de récepteur impliqué, et de l'environnement cellulaire. Tanimoto *et al.* ont montré que la prolifération des VSMCs induite par la S1P était secondaire à la transactivation de PDGFR- β [124]. Afin d'améliorer la conception thérapeutique de médicaments ciblant la voie commune PDGF/S1P, il semble nécessaire de répondre à deux questions: quels isoformes des récepteurs de la S1P sont impliqués dans la transactivation de PDGFR? Et quels sont les effets résultant de cette transactivation? Des études antérieures ont décrit la régulation négative du signal du PDGF par la S1P, et ce médié par le récepteur S1PR2. Nous avons récemment rapporté que l'inhibition de la voie PDGF/S1P par le sunitinib malate peut être potentialisée par le fingolimod et conduit à une forte réduction de la croissance et de la migration des VSMCs et des cellules tumorales mammaire chez le rat. Alors que le fingolimod est décrit comme un agoniste des récepteurs S1PR1 et S1PR3, sans effet sur S1PR2, ces résultats suggèrent que le fingolimod peut exercer une action différente de celle d'un agoniste de ces récepteurs sur les cellules musculaires lisses vasculaires. Les cellules de notre culture primaire de VSMC, réalisée à partir de rats de 6 semaines, expriment des niveaux similaires de S1PR1 et S1PR3 et à un degré moindre S1PR2. Avec un traitement utilisant un ou plusieurs siRNA simultanément, nous avons montré que les deux récepteurs, S1PR1 et S1PR3, sont fortement impliqués dans la migration des VSMCs induite par la S1P ou le PDGF-B alors que l'inhibition de S1PR2 n'a induit que des effets mineurs. Ces résultats suggèrent une

certaine redondance entre S1PR1 et S1PR3. L'implication de S1PR1 dans les voies de signalisation activées par PDGFR, VEGFR ou EGFR a déjà été décrite [124]. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle S1PR1 et S1PR3 pourrait intégrer les signaux de différents facteurs de croissance dans une voie commune permettant ainsi une forme de hiérarchisation du signal dans un environnement complexe comportant plusieurs facteurs de croissance. Nous avons également montré que l'inhibition simultanée de l'expression de S1PR3 et PDGFR- β réduit la vitesse de migration des VSMCs vers une source de PDGF-B de 85%. Cet effet était de 25% supérieur à celui d'un traitement ciblant uniquement le PDGFR- β . Par conséquent, S1PR3 semble particulièrement impliquée dans la migration des VSMCs en réponse au PDGF-B et participe potentiellement à une plate-forme PDGFR/S1PR3 comme cela a été décrit pour PDGFR/S1PR1 [125]. Ensuite, nous avons cherché à caractériser l'effet du fingolimod sur S1PR1 et S1PR3 respectivement. Nous avons montré qu'un traitement de 24 heures avec 100 nM de fingolimod pouvait induire une diminution de 25% et 50% du niveau d'expression de S1PR1 et S1PR3. Nous avons également observé l'additivité des effets du fingolimod et des siRNA sur la régulation négative de ces récepteurs. En présence d'inhibiteurs de la sphingosine kinase, les VSMCs ont eu une croissance et une chimiotaxie comparable aux cellules contrôles (non traitées) ce qui exclue une potentielle inhibition de SK1 par le fingolimod sur notre modèle. Ensemble, nos résultats consolident l'hypothèse précédente suggérant que le fingolimod pourrait induire une dégradation par le protéasome de ces récepteurs en augmentant leur durée de vie sous une forme activée, comme décrit précédemment pour les lymphocytes [5] et les HUVECs [127]. En outre, la S1P et le fingolimod-phosphate ne semblent pas se lier et stabiliser la même conformation de S1PR1 [128]. Un équilibre de la réaction de transformation des récepteurs de la S1P permet la co-existence de leurs différents états conformationnels. Lorsqu'il est lié à S1PR1, le fingolimod-phosphate augmente par action de masse la concentration d'une conformation spécifique et provoque finalement sa dégradation [114]. Le fingolimod-phosphate pourrait donc agir comme un «agoniste biaisé» en se liant exclusivement à la conformation S1PR3-Gi qui permettrait de réduire la concentration de la

conformation du récepteur S1PR3-Gq par action de masse et ainsi inhiber la signalisation S1PR3-Gq. Cette inhibition différentielle du signal pourrait également expliquer l'inhibition de la croissance et de la migration des cellules musculaires lisses vasculaires induite par le fingolimod et passant par S1PR3. L'activation ou l'inhibition de S1PR1 et S1PR3 induisent des effets comparables sur les VSMCs. Par ailleurs, l'expression de S1PR3 a été plus inhibée que celle de S1PR1 par le traitement associant le fingolimod et leurs siRNA respectifs (figure 3B). Cependant, une forte inhibition de S1PR3, a quasiment aboli les capacités de migration des VSMCs, sans majorer l'inhibition de leur croissance par rapport au traitement composé de fingolimod et de siRNA anti-PDGFR (Fig. 4 et 5). Ceci suggère que S1PR3 n'est pas ou faiblement impliqué dans la croissance de ces cellules en réponse au PDGF. Dans les mêmes conditions, une inhibition incomplète de S1PR1 (~ 70% contre 90% pour S1PR3) a particulièrement impacté la croissance des VSMCs. Par conséquent, nous pensons qu'au-delà de leur apparente redondance, ces deux récepteurs pourraient être capables d'induire des réponses plus spécifiques en fonction de la stimulation cellulaire. Cette hypothèse semble cohérente avec notre observation de la localisation sub-cellulaire des récepteurs montrant S1PR1 clairement identifiés dans le compartiment péri-nucléaire alors que S1PR3 est réparti entre la membrane et le cytoplasme. S1PR1 pourrait donc activer des facteurs mitogéniques intra-nucléaires par la voie des MAP kinases par exemple. S1PR3, quant à lui, pourrait principalement activer une signalisation « pro-chimiotactiques » par la voie PI3K-Akt. La modeste différence observée sur la croissance ou la migration cellulaire entre les traitements inhibant S1PR1 et S1PR3 pourrait être liée à l'utilisation de multiples siRNA. Au-delà de la spécificité de ces inhibiteurs, il a déjà été démontré que la transfection simultanée de plusieurs siRNA n'amélioré pas leur efficacité envers leur cible en raison d'une intégration sélective des siRNA dans le complexe RISC [128, 129]. Ceci montre à quel point il est essentiel pour des applications cliniques ou de recherche que des inhibiteurs spécifiques des récepteurs de la S1P soient développés. Le PDGF-B est considéré comme un facteur de croissance pro-angiogénique car il est le principal acteur de la couverture des capillaires nouvellement formés par les péricytes. Ce processus stabilise et

protège les cellules endothéliales. Cependant, McCarty *et al.* ont démontré que les tumeurs surexprimant le PDGF-B induisent une augmentation de la croissance des péricytes qui inhibe la prolifération des cellules endothéliales [130]. En conséquence, une stimulation excessive des cellules murales par le PDGF-B pourrait inhiber l'angiogenèse tumorale. Dans ce contexte, la compréhension précise des interactions liant les voies du signal de la S1P et du PDGF-B pourrait fournir de nouveaux moyens d'adaptation des traitements anti-angiogéniques. Dans ce but, le fingolimod pourrait être un outil décisif, capable de moduler les voies du PDGF ainsi que celles d'autres protéines kinases. Cependant, sa pharmacologie, très complexe doit encore faire l'objet d'études afin de permettre son utilisation optimale.

Conclusion

Qu'attendre de l'association sunitinib malate-fingolimod ?

Si les effets secondaires du traitement par fingolimod doivent être sérieusement pris en compte, particulièrement en ce qui concerne les lignées lymphocytaires, notre travail montre que cette association pourrait être testée en clinique humaine sur des patientes atteintes de cancer du sein. Cette combinaison de traitements permet d'envisager une limitation de la dissémination métastatique, une réduction de la croissance tumorale et une augmentation de l'espérance de vie supérieures au traitement avec une seule molécule. Aucune de ces deux molécules n'ayant d'indication dans le traitement du cancer du sein, on peut, en outre, espérer que ce traitement apporte une réponse pour certains cas présentant une chimiorésistance aux traitements actuellement utilisés. Par ailleurs, ce traitement visant à inhiber à la fois la croissance des cellules tumorales et celle des cellules vasculaires, son efficacité pourrait aussi être évaluée sur d'autres types de tumeurs solides comme les cancers colorectaux. Certains travaux montrent d'ailleurs la forte implication de la voie de signalisation de la S1P dans ces types de cancers [17, 131].

Quelle route suivre ?

Nos résultats, bien que préliminaires, semblent montrer une toxicité inférieure de l'association sunitinib malate-fingolimod par rapport au sunitinib malate seul. Une étude comparable à celle-ci effectuée sur un autre modèle de tumeurs permettrait d'évaluer la spécificité de nos résultats en rapport au modèle utilisé ou au contraire de dégager des propriétés plus générales de cette association moléculaire dans le traitement de la pathologie cancéreuse. Toutefois, les deux traitements ayant chacun reçu leur autorisation de mise sur le marché par les autorités sanitaires, rien ne s'oppose, a priori, à la mise en place rapide d'un essai clinique visant à évaluer le potentiel de cette association chez l'homme.

Enfin, comme nous l'avons évoqué précédemment, la tendance actuelle des thérapies est à l'association d'agents cytotoxiques aux anti-angiogéniques. Il serait probablement intéressant d'évaluer l'effet d'une trithérapie associant des molécules telles que le paclitaxel ou l'epirubicine au sunitinib malate et au fingolimod.

Références bibliographiques

1. Huwiler, A. and J. Pfeilschifter, *New players on the center stage: sphingosine 1-phosphate and its receptors as drug targets*. *Biochem Pharmacol*, 2008. 75(10): p. 1893-900.
2. Liao, J., et al., *Chemistry and biology of sphingolipids*. *Tetrahedron*, 2005. 61(20): p. 4715-4733.
3. Evindar, G., et al., *Exploring amino acids derivatives as potent, selective, and direct agonists of sphingosine-1-phosphate receptor subtype-1*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013. 23(2): p. 472-5.
4. Evindar, G., et al., *Exploration of amino alcohol derivatives as novel, potent, and highly selective sphingosine-1-phosphate receptor subtype-1 agonists*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010. 20(8): p. 2520-4.
5. Graler, M.H. and E.J. Goetzl, *The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors*. *FASEB J*, 2004. 18(3): p. 551-3.
6. Brinkmann, V., et al., *Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis*. *Nat Rev Drug Discov*. 9(11): p. 883-97.
7. van Meeteren, L.A., et al., *Anticancer activity of FTY720: phosphorylated FTY720 inhibits autotaxin, a metastasis-enhancing and angiogenic lysophospholipase D*. *Cancer Lett*, 2008. 266(2): p. 203-8.
8. Payne, S.G., et al., *The immunosuppressant drug FTY720 inhibits cytosolic phospholipase A2 independently of sphingosine-1-phosphate receptors*. *Blood*, 2007. 109(3): p. 1077-85.
9. Bandhuvula, P., et al., *The immune modulator FTY720 inhibits sphingosine-1-phosphate lyase activity*. *J Biol Chem*, 2005. 280(40): p. 33697-700.
10. Vessey, D.A., et al., *Dimethylsphingosine and FTY720 inhibit the SK1 form but activate the SK2 form of sphingosine kinase from rat heart*. *J Biochem Mol Toxicol*, 2007. 21(5): p. 273-9.
11. Berdyshev, E.V., et al., *FTY720 inhibits ceramide synthases and up-regulates dihydrosphingosine 1-phosphate formation in human lung endothelial cells*. *J Biol Chem*, 2009. 284(9): p. 5467-77.
12. Neviani, P., et al., *FTY720, a new alternative for treating blast crisis chronic myelogenous leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia*. *J Clin Invest*, 2007. 117(9): p. 2408-21.
13. Roberts, E., et al., *Sphingosine 1-phosphate receptor agonists: a patent review (2010 - 2012)*. *Expert Opin Ther Pat*, 2013.
14. Yopp, A.C., et al., *Sphingosine 1-phosphate receptor modulators: a new class of immunosuppressants*. *Clin Transplant*, 2006. 20(6): p. 788-95.
15. Kunzendorf, U., E. Ziegler, and D. Kabelitz, *FTY720--the first compound of a new promising class of immunosuppressive drugs*. *Nephrol Dial Transplant*, 2004. 19(7): p. 1677-81.
16. Brinkmann, V. and K.R. Lynch, *FTY720: targeting G-protein-coupled receptors for sphingosine 1-phosphate in transplantation and autoimmunity*. *Curr Opin Immunol*, 2002. 14(5): p. 569-75.
17. Nagaoka, Y., et al., *Effects of phosphorylation of immunomodulatory agent FTY720 (fingolimod) on antiproliferative activity against breast and colon cancer cells*. *Biol Pharm Bull*, 2008. 31(6): p. 1177-81.
18. Hung, J.H., et al., *FTY720 induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells through activation of protein kinase C delta signaling*. *Cancer Res*, 2008. 68(4): p. 1204-12.

19. Takuwa, N., et al., *Tumor-suppressive sphingosine-1-phosphate receptor-2 counteracting tumor-promoting sphingosine-1-phosphate receptor-1 and sphingosine kinase 1 - Jekyll Hidden behind Hyde*. Am J Cancer Res. 1(4): p. 460-81.
20. Wang, J.D., et al., *Early induction of apoptosis in androgen-independent prostate cancer cell line by FTY720 requires caspase-3 activation*. Prostate, 1999. 40(1): p. 50-5.
21. Lee, T.K., et al., *FTY720 induces apoptosis of human hepatoma cell lines through PI3-K-mediated Akt dephosphorylation*. Carcinogenesis, 2004. 25(12): p. 2397-405.
22. Azuma, H., et al., *Marked prevention of tumor growth and metastasis by a novel immunosuppressive agent, FTY720, in mouse breast cancer models*. Cancer Res, 2002. 62(5): p. 1410-9.
23. Ho, J.W., et al., *Effects of a novel immunomodulating agent, FTY720, on tumor growth and angiogenesis in hepatocellular carcinoma*. Mol Cancer Ther, 2005. 4(9): p. 1430-8.
24. Tonelli, F., et al., *FTY720 and (S)-FTY720 vinylphosphonate inhibit sphingosine kinase 1 and promote its proteasomal degradation in human pulmonary artery smooth muscle, breast cancer and androgen-independent prostate cancer cells*. Cell Signal. 22(10): p. 1536-42.
25. Pyne, N.J. and S. Pyne, *Sphingosine 1-phosphate and cancer*. Nat Rev Cancer. 10(7): p. 489-503.
26. LaMontagne, K., et al., *Antagonism of sphingosine-1-phosphate receptors by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization*. Cancer Res, 2006. 66(1): p. 221-31.
27. Lloyd, R.V., et al., *Angiogenesis in normal and neoplastic pituitary tissues*. Microsc Res Tech, 2003. 60(2): p. 244-50.
28. Folkman, J., *What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?* J Natl Cancer Inst, 1990. 82(1): p. 4-6.
29. Folkman, J., *Angiogenesis inhibitors generated by tumors*. Mol Med, 1995. 1(2): p. 120-2.
30. Pugh, C.W. and P.J. Ratcliffe, *Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system*. Nat Med, 2003. 9(6): p. 677-84.
31. Chandel, N.S., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(20): p. 11715-20.
32. Salceda, S., et al., *Complex role of protein phosphorylation in gene activation by hypoxia*. Kidney Int, 1997. 51(2): p. 556-9.
33. Kallio, P.J., et al., *Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha*. Embo J, 1998. 17(22): p. 6573-86.
34. Skoldenberg, E.G., et al., *Angiogenesis and angiogenic growth factors in Wilms tumor*. J Urol, 2001. 165(6 Pt 2): p. 2274-9.
35. Fang, J., et al., *HIF-1alpha-mediated up-regulation of vascular endothelial growth factor, independent of basic fibroblast growth factor, is important in the switch to the angiogenic phenotype during early tumorigenesis*. Cancer Res, 2001. 61(15): p. 5731-5.
36. Iurlaro, M., et al., *Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 correlate with upgrading and myometrial invasion in endometrial carcinoma*. Eur J Clin Invest, 1999. 29(9): p. 793-801.
37. Edwards, J.G., et al., *Tumor necrosis correlates with angiogenesis and is a predictor of poor prognosis in malignant mesothelioma*. Chest, 2003. 124(5): p. 1916-23.
38. de Vries, C., et al., *The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor*. Science, 1992. 255(5047): p. 989-91.
39. Andreassen, A., et al., *p53 abnormalities in different subtypes of human sarcomas*. Cancer Res, 1993. 53(3): p. 468-71.

40. Plate, K.H., et al., *Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms*. *Int J Cancer*, 1994. 59(4): p. 520-9.
41. Viglietto, G., et al., *Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PIGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines*. *Oncogene*, 1995. 11(8): p. 1569-79.
42. Meyer, M., et al., *A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases*. *Embo J*, 1999. 18(2): p. 363-74.
43. Colavitti, R., et al., *Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR*. *J Biol Chem*, 2002. 277(5): p. 3101-8.
44. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. *Nat Med*, 2003. 9(6): p. 669-76.
45. Cross, M.J., et al., *VEGF-receptor signal transduction*. *Trends Biochem Sci*, 2003. 28(9): p. 488-94.
46. Neeli, I., et al., *An essential role of the Jak-2/STAT-3/cytosolic phospholipase A(2) axis in platelet-derived growth factor BB-induced vascular smooth muscle cell motility*. *J Biol Chem*, 2004. 279(44): p. 46122-8.
47. Karp, J.E., et al., *Current status of clinical trials of farnesyltransferase inhibitors*. *Curr Opin Oncol*, 2001. 13(6): p. 470-6.
48. Hillen, F. and A.W. Griffioen, *Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond*. *Cancer Metastasis Rev*, 2007. 26(3-4): p. 489-502.
49. Graves, L.M., J. Han, and H.S. Earp, 3rd, *Transactivation of the EGF Receptor: Is the PDGF Receptor an Unexpected Accomplice?* *Mol Interv*, 2002. 2(4): p. 208-12.
50. Jain, R.K., *Molecular regulation of vessel maturation*. *Nat Med*, 2003. 9(6): p. 685-93.
51. Dome, B., et al., *Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications*. *Am J Pathol*, 2007. 170(1): p. 1-15.
52. Gupta, M.K. and R.Y. Qin, *Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis*. *World J Gastroenterol*, 2003. 9(6): p. 1144-55.
53. Baudhuin, L.M., et al., *S1P3-mediated Akt activation and cross-talk with platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)*. *Faseb J*, 2004. 18(2): p. 341-3.
54. Zhang, L., et al., *Tumor-derived vascular endothelial growth factor up-regulates angiopoietin-2 in host endothelium and destabilizes host vasculature, supporting angiogenesis in ovarian cancer*. *Cancer Res*, 2003. 63(12): p. 3403-12.
55. Hla, T., *Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate*. *Semin Cell Dev Biol*, 2004. 15(5): p. 513-20.
56. Kwan, H.Y., Y. Huang, and X. Yao, *Store-operated calcium entry in vascular endothelial cells is inhibited by cGMP via a protein kinase G-dependent mechanism*. *J Biol Chem*, 2000. 275(10): p. 6758-63.
57. Cho, H., et al., *Pericyte-specific expression of Rgs5: implications for PDGF and EDG receptor signaling during vascular maturation*. *Faseb J*, 2003. 17(3): p. 440-2.
58. Hla, T., *Signaling and biological actions of sphingosine 1-phosphate*. *Pharmacol Res*, 2003. 47(5): p. 401-7.
59. Saba, J.D. and T. Hla, *Point-counterpoint of sphingosine 1-phosphate metabolism*. *Circ Res*, 2004. 94(6): p. 724-34.
60. Chae, S.S., et al., *Requirement for sphingosine 1-phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference*. *J Clin Invest*, 2004. 114(8): p. 1082-9.

61. Sanz, L. and L. Alvarez-Vallina, *The extracellular matrix: a new turn-of-the-screw for anti-angiogenic strategies*. Trends Mol Med, 2003. 9(6): p. 256-62.
62. Quesada, A.R., R. Munoz-Chapuli, and M.A. Medina, *Anti-angiogenic drugs: from bench to clinical trials*. Med Res Rev, 2006. 26(4): p. 483-530.
63. Fan, T.P., et al., *Angiogenesis: from plants to blood vessels*. Trends Pharmacol Sci, 2006. 27(6): p. 297-309.
64. Gridelli, C., A. Rossi, and P. Maione, *New antiangiogenic agents and non-small cell lung cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2006. 60(1): p. 76-86.
65. Munagala, R., F. Aqil, and R.C. Gupta, *Promising molecular targeted therapies in breast cancer*. Indian J Pharmacol, 2011. 43(3): p. 236-45.
66. Laird, A.D., et al., *SU6668 inhibits Flk-1/KDR and PDGFRbeta in vivo, resulting in rapid apoptosis of tumor vasculature and tumor regression in mice*. Faseb J, 2002. 16(7): p. 681-90.
67. Laird, A.D., et al., *SU6668 is a potent antiangiogenic and antitumor agent that induces regression of established tumors*. Cancer Res, 2000. 60(15): p. 4152-60.
68. Abdollahi, A., et al., *SU5416 and SU6668 attenuate the angiogenic effects of radiation-induced tumor cell growth factor production and amplify the direct anti-endothelial action of radiation in vitro*. Cancer Res, 2003. 63(13): p. 3755-63.
69. Sessa, C., et al., *Phase I clinical and pharmacological evaluation of the multi-tyrosine kinase inhibitor SU006668 by chronic oral dosing*. Eur J Cancer, 2006. 42(2): p. 171-8.
70. Chow, L.Q. and S.G. Eckhardt, *Sunitinib: from rational design to clinical efficacy*. J Clin Oncol, 2007. 25(7): p. 884-96.
71. Lau, G.I., W.T. Loo, and L.W. Chow, *Neoadjuvant chemotherapy for breast cancer determined by chemosensitivity assay achieves better tumor response*. Biomed Pharmacother, 2007. 61(9): p. 562-5.
72. Furuya, M., et al., *Pathophysiology of tumor neovascularization*. Vasc Health Risk Manag, 2005. 1(4): p. 277-90.
73. Slamon, D.J., et al., *Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2*. N Engl J Med, 2001. 344(11): p. 783-92.
74. Miller, K., et al., *Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer*. N Engl J Med, 2007. 357(26): p. 2666-76.
75. Di Cosimo, S. and J. Baselga, *Targeted therapies in breast cancer: where are we now?* Eur J Cancer, 2008. 44(18): p. 2781-90.
76. Jakesz, R., 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(9484): p. 455-62.
77. McSherry, E.A., et al., *Molecular basis of invasion in breast cancer*. Cell Mol Life Sci, 2007. 64(24): p. 3201-18.
78. Davoli, A., B.A. Hocevar, and T.L. Brown, *Progression and treatment of HER2-positive breast cancer*. Cancer Chemother Pharmacol, 2010. 65(4): p. 611-23.
79. Chang, J.C., *HER2 inhibition: from discovery to clinical practice*. Clin Cancer Res, 2007. 13(1): p. 1-3.
80. Ross, J.S., et al., *The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine*. Oncologist, 2009. 14(4): p. 320-68.
81. Karunagaran, D., et al., *ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer*. EMBO J, 1996. 15(2): p. 254-64.
82. Moasser, M.M., *The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis*. Oncogene, 2007. 26(45): p. 6469-87.

83. Slamon, D.J., et al., *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science, 1987. 235(4785): p. 177-82.
84. Cobleigh, M.A., 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(9): p. 2639-48.
85. Baselga, J., et al., *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(13): p. 2825-31.
86. Leyland-Jones, B., *Trastuzumab: hopes and realities*. Lancet Oncol, 2002. 3(3): p. 137-44.
87. Jahanzeb, M., *Adjuvant trastuzumab therapy for HER2-positive breast cancer*. Clin Breast Cancer, 2008. 8(4): p. 324-33.
88. Fayette, J., J.C. Soria, and J.P. Armand, [*Targeting angiogenesis in oncology*]. Pathol Biol (Paris), 2006. 54(4): p. 199-205.
89. Hotz, H.G., et al., *VEGF antisense therapy inhibits tumor growth and improves survival in experimental pancreatic cancer*. Surgery, 2005. 137(2): p. 192-9.
90. Shim, W.S., et al., *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(1): p. 6-15.
91. Konner, J. and J. Dupont, *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: p. S81-5.
92. Weng, D.E. and N. Usman, *Angiozyme: a novel angiogenesis inhibitor*. Curr Oncol Rep, 2001. 3(2): p. 141-6.
93. Folkman, J., *Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?* Nat Rev Drug Discov, 2007. 6(4): p. 273-86.
94. Hurwitz, H., et al., *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2004. 350(23): p. 2335-42.
95. Posey, J.A., 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(4): p. 1323-32.
96. Shaheen, R.M., 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(21): p. 5412-6.
97. Goodman, V.L., 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(5): p. 1367-73.
98. Mayer, E.L., 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(12): p. 2370-6.
99. Roskoski, R., Jr., *Sunitinib: a VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. 356(2): p. 323-8.
100. Faivre, S., et al., *Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development*. Nat Rev Drug Discov, 2007. 6(9): p. 734-45.
101. Ortholan, C., 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(16): p. 3022-36.

102. Cobleigh, M.A., et al., *A phase I/II dose-escalation trial of bevacizumab in previously treated metastatic breast cancer*. *Semin Oncol*, 2003. 30(5 Suppl 16): p. 117-24.
103. Sachinidis, A., et al., *Thromboxane A2 and vascular smooth muscle cell proliferation*. *Hypertension*, 1995. 26(5): p. 771-80.
104. Mousseau, Y., et al., *Improved agarose gel assay for quantification of growth factor-induced cell motility*. *Biotechniques*, 2007. 43(4): p. 509-16.
105. Li, M.J., et al., *Inhibition of HIV-1 infection by lentiviral vectors expressing Pol III-promoted anti-HIV RNAs*. *Mol Ther*, 2003. 8(2): p. 196-206.
106. Tuschl, T., et al., *Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro*. *Genes Dev*, 1999. 13(24): p. 3191-7.
107. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. *Nature*, 2001. 411(6836): p. 494-8.
108. Kaiparettu, B.A., et al., *Novel egg white-based 3-D cell culture system*. *Biotechniques*, 2008. 45(2): p. 165-8, 170-1.
109. Mousseau, Y., et al., *Fingolimod potentiates the effects of sunitinib malate in a rat breast cancer model*. *Breast Cancer Res Treat*, 2012. 134(1): p. 31-40.
110. Rajkumar, V.S., 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(6): p. 2254-65.
111. Skoura, A., et al., *Essential role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in pathological angiogenesis of the mouse retina*. *J Clin Invest*, 2007. 117(9): p. 2506-16.
112. Young, N. and J.R. Van Brocklyn, *Roles of sphingosine-1-phosphate (S1P) receptors in malignant behavior of glioma cells. Differential effects of S1P2 on cell migration and invasiveness*. *Exp Cell Res*, 2007. 313(8): p. 1615-27.
113. Bergers, G., et al., *Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors*. *J Clin Invest*, 2003. 111(9): p. 1287-95.
114. Pyne, N.J. and S. Pyne, *Receptor tyrosine kinase-G-protein-coupled receptor signalling platforms: out of the shadow?* *Trends Pharmacol Sci*. 32(8): p. 443-50.
115. Mollard, S., et al., *How can grafted breast cancer models be optimized ?* *Cancer Biology & Therapy*, 2011.
116. Murph, M. and G.B. Mills, *Targeting the lipids LPA and S1P and their signalling pathways to inhibit tumour progression*. *Expert Rev Mol Med*, 2007. 9(28): p. 1-18.
117. Nakayama, S., et al., *TX-2152: a conformationally rigid and electron-rich diyne analogue of FTY720 with in vivo antiangiogenic activity*. *Bioorg Med Chem*, 2008. 16(16): p. 7705-14.
118. Du, W., et al., *S1P(2), the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, negatively regulates tumor angiogenesis and tumor growth in vivo in mice*. *Cancer Res*. 70(2): p. 772-81.
119. Wamhoff, B.R., et al., *Sphingosine-1-phosphate receptor subtypes differentially regulate smooth muscle cell phenotype*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. 28(8): p. 1454-61.
120. Campbell, N.E., et al., *The thrombospondin-1 mimetic ABT-510 increases the uptake and effectiveness of cisplatin and paclitaxel in a mouse model of epithelial ovarian cancer*. *Neoplasia*. 12(3): p. 275-83.
121. Huang, G. and L. Chen, *Recombinant human endostatin improves anti-tumor efficacy of paclitaxel by normalizing tumor vasculature in Lewis lung carcinoma*. *J Cancer Res Clin Oncol*. 136(8): p. 1201-11.
122. McGee, M.C., et al., *Improved intratumoral oxygenation through vascular normalization increases glioma sensitivity to ionizing radiation*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 76(5): p. 1537-45.

123. Mousseau, Y., et al., *Fingolimod inhibits PDGF-B-induced migration of vascular smooth muscle cell by down-regulating the S1PR1/S1PR3 pathway*. *Biochimie*, 2012. 94(12): p. 2523-31.
124. Tanimoto, T., A.O. Lungu, and B.C. Berk, *Sphingosine 1-phosphate transactivates the platelet-derived growth factor beta receptor and epidermal growth factor receptor in vascular smooth muscle cells*. *Circ Res*, 2004. 94(8): p. 1050-8.
125. Waters, C.M., et al., *Cell migration activated by platelet-derived growth factor receptor is blocked by an inverse agonist of the sphingosine 1-phosphate receptor-1*. *Faseb J*, 2006. 20(3): p. 509-11.
126. Goparaju, S.K., et al., *The S1P2 receptor negatively regulates platelet-derived growth factor-induced motility and proliferation*. *Mol Cell Biol*, 2005. 25(10): p. 4237-49.
127. Oo, M.L., et al., *Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor*. *J Biol Chem*, 2007. 282(12): p. 9082-9.
128. Pyne, N.J. and S. Pyne, *Selectivity and specificity of sphingosine 1-phosphate receptor ligands: "off-targets" or complex pharmacology?* *Front Pharmacol*. 2: p. 26.
129. Castanotto, D., et al., *Combinatorial delivery of small interfering RNAs reduces RNAi efficacy by selective incorporation into RISC*. *Nucleic Acids Res*, 2007. 35(15): p. 5154-64.
130. McCarty, M.F., et al., *Overexpression of PDGF-BB decreases colorectal and pancreatic cancer growth by increasing tumor pericyte content*. *J Clin Invest*, 2007. 117(8): p. 2114-22.
131. Liang, J., et al., *Sphingosine-1-phosphate links persistent STAT3 activation, chronic intestinal inflammation, and development of colitis-associated cancer*. *Cancer Cell*, 2013. 23(1): p. 107-20.

Table des illustrations

Figure 1 : Formules chimiques du Fingolimod (FTY 720) et de sa forme active [2].	18
Figure 2: Structure des analogues des récepteurs de la sphingosine-1-phosphate [3].	19
Figure 3: Analogues du FTY-720 en cours de développement [4].	20
Figure 4 : Schéma générale de l'angiogenèse tumorale et rôle des anti-angiogéniques {Griffioen, #310}.	29
Figure 5 : Structure de la paroi vasculaire.	30
Figure 6 : Sécrétion de facteurs de croissance par les cellules tumorales et dégradation de la matrice extracellulaire.	36
Figure 7 : Migration des cellules endothéliales sous l'impulsion des facteurs de croissance.	39
Figure 8 : Vascularisation de la tumeur par un néo-capillaire composé de cellules endothéliales.	41
Figure 9 : Stabilisation et protection des cellules endothéliales par les péricytes.	41
Figure 10 : Implication des cellules cancéreuses dans la vasculogénèse tumorale [48].	45
Figure 11 : Activité et régulation des MMPs (sigmaaldrich.com).	47
Figure 12 : Récepteurs à activité tyrosine kinase et angiogenèse tumorale.	50
Figure 13 : Famille de récepteurs activés par la S1P [25].	51
Figure 14 : Transactivation des facteurs de croissance angiogénique [25].	52
Figure 15 : Cytokines et recrutement des cellules musculaires vasculaires {Armulik, 2005 #29}.	53
Figure 16 : Différentes stratégies d'inhibition de l'angiogenèse[62].	55
Figure 17 : Exemples d'agents anti-vasculaires en développement pour le traitement de cancer du sein [65].	58
Figure 18 : La famille des récepteurs HER.	64
Figure 19 : Les trois mécanismes des inhibiteurs de l'angiogenèse ciblant le VEGF actuellement approuvés par la FDA. [93].	68
Figure 20 : Propriétés du Sunitinib malate.	70
Figure 21 : Configuration des puits dans le gel d'agarose et modalités d'étude du comportement migratoire	77
Figure 22 : Effet de l'inhibition de PDGFR et S1P1/3 sur la migration des VSMCs [109].	85
Figure 23 : Inhibition du recrutement des VSMCs induit par des cellules endothéliales (RAECs) ou des cellules tumorales (cellules Walker 256) [109].	86
Figure 24: Inhibition de la croissance et de l'organisation en 3 dimensions des VSMCs dans une matrice de blanc d'œuf [109].	88
Figure 25 : Effets combinés du sunitinib malate et du fingolimod sur la croissance de tumeur mammaires in vivo [109].	91
Figure 26 : Le fingolimod induit une normalisation de la vascularisation des tumeurs mammaires de rat sein [109].	93
Figure 27 : Croissance et migration des VSMCs induites par le PDGF et la S1P [123].	99
Figure 28 : Inhibition de la migration des VSMCs par des siRNA [123].	100
Figure 29 : Régulation négative de PDGFR-β et S1PR1-3 induite par le fingolimod et/ou des siRNA [123].	102

Figure 30 : Inhibition de la croissance des VSMCs induite par. le fingolimod et/ou des siRNA [123].	104
Figure 31: Inhibition de la migration des VSMCs induite par le fingolimod et/ou des siRNA [123].	105

Table des tableaux

Tableau 1 : Liste des effets indésirables (EMA 2011).	26
Tableau 2 : Incidence des métastases sur différents organes.	46
Tableau 3 : Principaux facteurs endogènes régulant l'angiogenèse tumorale [50-52].	50
Tableau 4 : Composés végétaux pro- et antiangiogéniques[63].	56
Tableau 5 : Les différentes classes d'agents anticancéreux indiqués dans le cancer du sein classés par mode d'action.	61
Tableau 6 : Différentes stratégies d'hormonothérapies utilisées pour le traitement du cancer du sein.	63
Tableau 7: Nouvelles thérapeutiques ciblant HER2.	66
Tableau 8 : Séquences des siRNA pour chaque cible.	77
Tableau 9 : Anticorps utilisés pour les marquages immunohistochimiques.	82

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Bénéfices de la combinaison Fingolimod/Sunitinib malate sur un modèle de cancer du sein chez le rat.

Quel avenir pour le Gilyenia (Fingolimod) en cancérologie ?

Résumé :

La plupart des stratégies anti-angiogéniques utilisés en oncologie ciblent principalement les cellules endothéliales en bloquant la voie de signalisation du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Plusieurs inhibiteurs de protéines kinases peuvent secondairement réduire la stabilisation des vaisseaux par les cellules murales en bloquant l'activité du récepteur du Platelet Derived Growth Factor (PDGFR). Cependant, la sphingosine-1-phosphate (S1P), également impliquée dans le recrutement des cellules murales, n'est pas encore une cible dans la pratique clinique. Nous avons donc étudié l'effet d'un blocage simultané des voies de signalisation du PDGF et de la S1P sur la réponse chimiotactique des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et les effets résultant de ce blocage sur la croissance d'une tumeur mammaire chez le rat. A l'aide d'inhibiteurs spécifiques, nous avons montré que les récepteurs PDGFR- β , S1PR1 et S1PR3, peuvent agir en synergie et que leur inhibition simultanée stoppe à la fois la croissance et la migration des CMLV. Des résultats similaires ont ensuite été obtenus en associant le sunitinib malate (Sutant® ; inhibiteur de VEGFR / PDGFR) et le fingolimod (Gilyenia® ; analogue de la S1P). Le sunitinib malate est cliniquement approuvé pour le traitement de cancers du rein alors que le fingolimod est, pour l'instant, uniquement indiqué dans le traitement de la sclérose en plaques. Administrée par voie orale, la combinaison de ces médicaments diminue fortement la croissance de tumeurs mammaires sur un modèle de cancer syngénique chez le rat (Walker 256). Cette bi-thérapie n'a pas présenté de toxicité cumulative et l'analyse histologique des tumeurs a révélé une normalisation de la vascularisation intra-tumorale. Le blocage simultané de ces voies de signalisation avec le sunitinib malate et le fingolimod pourrait constituer un moyen efficace de réduction de l'angiogénèse et de la croissance tumorale, et ainsi potentialiser l'effet de chimiothérapies cytotoxiques.

Mots-clés : sunitinib malate, fingolimod, angiogénèse tumorale, cancer du sein

Abstract :

Most anti-angiogenic strategies used in oncology mainly target endothelial cells by blocking the signaling pathway of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Several protein kinase inhibitors may secondarily reduce mural cells stabilization of the vessels by blocking the platelet derived growth factor receptor (PDGFR). However, sphingosine-1-phosphate (S1P), also involved in the recruitment of mural cells, is not yet a target in clinical practice. We therefore investigated the effect of simultaneous blockade of PDGF and S1P signaling pathways on the chemotactic response of vascular smooth muscle cell (VSMC) and on the breast tumor growth on a rat model. Using specific inhibitors, we showed that PDGFR- β , S1PR1 and S1PR3 receptors may act in synergy and that their simultaneous inhibition stops both the growth and migration of VSMC. Similar results were obtained by combining sunitinib malate (Sutant®; inhibitor of VEGFR / PDGFR) and fingolimod (Gilyenia®; S1P analogue). Sunitinib malate is clinically approved in treatment of kidney cancer while fingolimod is, for now, only indicated for the treatment of multiple sclerosis. Orally administered, the combination of these drugs greatly reduced the growth of mammary tumors in a syngeneic model of cancer in rats (Walker 256). This dual therapy did not show cumulative toxicity and histological analysis of tumors revealed a normalization of intra-tumoral vasculature. The simultaneous blockade of these signaling pathways with sunitinib malate and fingolimod could provide effective means to reduce angiogenesis and tumor growth, and thus potentiate the effect of cytotoxic chemotherapy.

Keywords : sunitinib malate, fingolimod, tumor angiogenesis, breast cancer