



Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila

Institut des Sciences et de la Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire préparé en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Thème :

Etude de l'effet antiangiogénique des petites molécules.

Présenté par :

- GUEBLA Zakia.
- GUELLOUT Sara.

evant le jury composé de :

*Président : ZOUAGHI Mohammed(MAA).

*Examinatrice : AMARI Salima(MAA).

*Promoteur : MOUSSAOUI Bilal(MAA).

Année Universitaire: 2018/2019



Remerciement

Tous d'abord nous tenons à remercier le bon **Dieu** tout puissant et miséricordieux de nous avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail.

Nous exprimons nos profondes gratitude et respectueuses reconnaissances à notre encadrant Monsieur **Bilal MOUSSAOUI** pour son encadrement, conseils et sacrifices afin de donner le meilleur et pour son suivi durant la période de préparation de notre mémoire de fin d'étude.

Nos remerciements vont aux membres du jury **M^r ZOUAGHI Mohammed** et **M^{me} AMARI Salima** qui nous fait l'honneur d'accepter de jurer notre travail.

Nous adressons nos sincère remerciements à tous les professeurs qui par leurs conseils et leurs efforts durant tous les années passées nous sommes là, vraiment un grand remerciement pour la qualité d'enseignement qui nous a été dispensée.

Zakia & Sara





Dédicace



En témoignage d'amour et d'affection, je dédie ce modeste travail avec une grande fierté à tous ceux qui me sont chers :

Ma très chère mère **Zaineb, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie.*

** Mon très cher père **AbdElmoumen**, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie.*

***Que Dieu vous protège et que la réussite soit toujours à ma portée pour que je suis puisse vous combler de bonheur.*

Mon chère frère **Yassin et mes belles sœurs **Meriem** et **Roumaissa** puisse Dieu vous donne santé, bonheur et réussite.*

Mon chère oncle **Khaled mon modèle merci pour tous ce que tu me donne.*

** Ma cher binôme **Sara**.*

Mes chères amies **Nedjla, Manel, Assala et **Roba** pour leurs sympathies et leur solidarité envers moi.*

Zakia



Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mes plus chers êtres au monde :

*À mes chères parents : ma mère **Nazifa** et mon père **Tahar** pour leur amour, leur tendresse, et pour leur soutien durant toutes les étapes de ma vie. J'espère qu'un jour, je pourrai leur rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour moi, que Dieu leur prête tout le bonheur.*

*À mon chère frère **Salah adin** et mes belles sœurs **Noussaiba, Maroua, Mariem**. Pour leurs encouragements et pour leur soutien moral et physique.*

*À mes yeux : **BARAA, LINA** que Dieu leur prête tout le bonheur.*

*À mon chère et belle binôme : **Manar**.*

*À mon très cher marié : **Abdassalam**.*

À tous ce qui ont enseigné moi au long de ma vie scolaire .Pour tout leur amour, leur soutien, leur encouragement, leur assistance et leur présence dans ma vie.

*À toute mes chères ami (e)s : **RADIA, AMINA, RIMA, KANZA, CHAHRA, KADIJA**.*

Merci de votre présence, soutien et de m'avoir encouragée à aller plus loin.

À tous les autres que je n'ai pas cités mais à qui je pense aussi.

À toute ma famille.

SARRA



Résumé

Récemment, des progrès incontestables ont été accomplis dans la prise en charge de la pathologie tumorale. Ainsi, l'utilisation des agents antiangiogéniques a été considérée comme une stratégie prometteuse qui permettra de bloquer la progression tumorale et d'améliorer l'efficacité des médicaments.

Cette étude explore, *in ovo*, l'effet inhibiteur des médicaments Amoxypen et Daflon en plus de la décoction de la plante *Rosmarinusofficinalis* vis-à-vis la vascularisation de la membrane chorioallantoïdienne (CAM).

A des doses de saturation, l'extrait aqueux de *Rosmarinusofficinalis* diminue 60% de la vascularisation de la CAM ; le Daflon l'augmente de 80% et l'amoxypene ne traduit aucune interaction avec les vaisseaux. Les trois traitements n'exercent aucune influence sur le poids relative des embryons.

Ces données laissent croire que le Daflon possède un effet pro-angiogénique, la décoction du romarin affiche des tendances antiangiogéniques, alors que l'Amoxypen semble être inerte. Donc, le romarin mérite une exploration approfondie de son potentiel angiostatique dans le cadre d'une approche thérapeutique.

Les mots clés : cancer, angiogenese, la membrane chorioallantoïdienne, Daflon, Amoxypen*Rosmarinusofficinalis*,

Abstract

In the last few years, undeniable progress has been made in the management of tumor pathology. Thus, the use of antiangiogenic agents has been considered as a promising strategy that can block tumor progression and improve the effect of drugs.

Herein, we explored, *in ovo*, the inhibitory effect of Amoxypen, an antibiotic drug; and Daflon, a vasoprotectiveflavonoids mixture and *Rosmarinus officinalis* plant decoction against the vascularization of the chorioallantoic membrane (CAM).

Our findings suggest an angiostatic effect of *Rosmarinus officinalis* aqueous extract estimated to be approximately 60% of the CAM vasculature. Whoever, Daflon increased the vasculature density of the CAM by almost 80%. Finally, Amoxypen, seems to not interfere with the CAM vessels.

These data evoke a proangiogenic effect of Daflon; anti-angiogenic potential of *Rosmarinus officinalis*, where Amoxypen exhibit no activity toward the CAM vasculature. Hence, *Rosmarinus officinalis* may be proposed for anticancer clinical studies.

Key words:Cancer, angiogenesis, the chorioallantoic membrane, Daflon, Amoxypen,*Rosmarinus officinalis*.

الملخص

في السنوات القليلة الماضية، تم إحراز تقدماً لا يمكن إنكاره في قابلية التحكم في الأمراض الخبيثة وبالتالي، تم اعتبار استخدام العوامل المضادة لتكوين الأوعية الدموية استراتيجية واعدة يمكن أن تمنع تطور الورم وتحسين تأثير الأدوية عليه.

من خلال هذا العمل تم استكشاف التأثير المثبط للجزيئات الصغيرة بما في ذلك أدوية مثل Amoxypen, Daflon ومستخلص نبات *Rosmarinus officinalis* في مواجهة الأوعية الدموية للغشاء المشيمي (CAM).

تُظهر النتائج تأثيراً محفزاً لـ Daflon يقارب 80%، ومضاداً يقدر 60% في المستخلص المائي لـ *Rosmarinus officinalis* وغياب التأثير في ما يتعلق بـ Amoxypen بالجرعات المركزة جداً.

مما سبق يظهر أن الإكليل يمكن أن يرشح لدراسات معمقة قصد استعماله كعلاج مضاد لتخليق الأوعية الدموية لدى مرضى السرطان.

الكلمات المفتاحية: السرطان، تخليق الأوعية الدموية، *Rosmarinus officinalis* ، Daflon ، Amoxypen .

Table des matières

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Cancer

I. Biologie du cancer.....	4
I.1. Qu'est-ce qu'un cancer	4
I.2. Caractéristiques des cellules cancéreuses	4
I.3. Causes du cancer.....	5
I.4. Facteurs de risque pour les adultes en Algérie.....	6
I.5. Mécanisme du cancer.....	7
I.6. Les étapes du processus de cancérogenèse	7
I.6.1. L'initiation	7
I.6.2. La promotion	7
I.6.3. La progression	8
I.7. Les gènes impliqués dans la cancérogenèse	8
I.7.1. Proto-oncogène.....	8
I.7.2. Anti-oncogènes ou gènes suppresseurs des tumeurs	9
I.8. Durée du processus cancérogenèse	9
I.9. Traitement	9

Chapitre II : Angiogenèse

II. La genèse vasculaire : vasculogenèse, angiogenèse et lymphangiogenèse.....	11
II.1. La vasculogenèse	11
II.2. L'angiogenèse physiologique	11

II.3. Les étapes de l'angiogenèse	12
II.3.1. La déstabilisation (désassemblage)	12
II.3.2. La sélection.....	12
II.3.3. La migration	13
II.3.4. La fusion et la formation de la lumière.....	13
II.3.5. La maturation et le flux sanguin	14
II.4. Médiateurs de l'angiogenèse.....	14
II.4.1. Les activateurs de l'angiogenèse	14
II.4.2. Les inhibiteurs de l'angiogenèse	15
II.5. L'angiogenèse pathologique	16
II.5.1. L'angiogenèse tumorale	16
II.5.2. Les étapes de l'angiogenèse tumorale	16
II.5.3. Rôle du "Switch angiogénique" dans la sortie de dormance tumorale	17
II.6. Le microenvironnement tumoral.....	18
II.7. Structure et caractéristiques des vaisseaux tumoraux	19
II.8. Rôle de l'angiogenèse dans la progression tumoral et la métastase	20
II.9. La lymphangiogenèse	21
II.10. Thérapie anti-angiogénique	22
II.10.1. Bevacizumab	22
II.10.2. Sunitinib.....	22
II.10.3. Sorafenib.....	22
II.11. Efficacité clinique des antiangiogéniques.....	23
II.12. Résistance aux traitements anti-angiogéniques	23
II.13. Toxicité des anti-angiogéniques	23
II.14. Reprofilage des médicaments dans la thérapie anti-angiogénique	24

Partie 2: Etude expérimentale

Chapitre III : Matériel et méthodes

III. Matériel et méthodes	26
III.1. Collecte des œufs et incubation	26
III.2. Préparation des membranes chorioallantoïdiennes	27
III.3. Préparation des substances testées	28
III.3.1. Origine de l'Amoxypen® 1g et préparation de solution	28
III.3.2. Origine du daflon® 500mg et préparation de la suspension :	28
III.3.3. Origine du Matériel biologique (Végétal) et préparation de l'extrait aqueux de la <i>Rosmarinus officinalis</i>	29
III.4. Déroulement du test CAM	30
IV. Analyse statistique :	32

Chapitre IV : Résultats et discussions

IV.1 Evaluation qualitative.....	33
IV.2. Evaluation quantitative.....	36
Conclusion et perspectives	
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des Abréviations

Ang 1	Angiopoietin 1
ADN	AcideDésoxyribonucléique
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
CAM	Chorioallantoic membrane
CE	Cellule Endothéliale
DLL4	Delta-Like Ligand 4
ERO	Espéceréactifd'oxygène
FGF	Fibroblast Growth Factor
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF-1	HypoxiaInducible Factor1
HTA	Hyper Tension Artérielle
HPV	HumanPapilloma Virus
EPC	Cellules progénitrices endothéliales
VEGF	Vascular endothelial growth factor
PDGF-BB	Platelet-derived growth factor
TGF-β1	Transforming growth factor
PD-ECGF	Facteur de croissance des cellules endothéliales dérivé des plaquettes
aFGF	Facteur de croissance acide
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
EGF	Facteur de croissance épidermal
IGF-1	Facteur de croissance de type insuline-1
KGF	Facteur de croissance des kératinocytes
TGF-β	Facteur transformant-β
TNFα	Facteur de nécrose tumoral
PLGF	Facteur de croissance placentaire
NO	Monoxyde d'azote

SG	Survie globale
CSC	Cellules tumorales à caractère souche
MMP	Matrix métalloprotéinase

Liste des figures

Figure 1 : Les six altération commune à tous les cellules cancéreuse et l'origine à leur prolifération incontrôlée (Hanahan and Weinberg 2011).	5
Figure 2 : Profil de mortalité par cancer en Algérie (Organisation mondiale de la Santé - profils des pays pour le cancer, 2014).	6
Figure 3 : Les mécanismes moléculaires de sélection de la cellule de front (Treps et Gavard, 2015).....	13
Figure 4 : Etapes de l'angiogenèse normale (Treps et Gavard, 2015).....	14
Figure 5 : Représentation schématique des médiateurs moléculaires et cellulaires du switch angiogénique.	17
Figure 6 : Vérification de la fécondité des œufs.	26
Figure 7 : Stérilisation et incubation des œufs.	27
Figure 8 : Préparation et révélation de la membrane chorioallantoïdienne.....	27
Figure 9 : Préparation de l'Amoxypen® (Amoxicilline1g).	28
Figure 10 : Préparation du Daflon® 500mg.....	29
Figure 11 : Préparation de l'extrait aqueux de <i>Rosmarinus officinalis</i>	29
Figure 12 : Application des carrés de papier filtre imbibés dans les solutions préparées sur la CAM.....	30
Figure 13 : Observations de la CAM sous stéréomicroscope.	31
Figure 14 : Observations de la CAMtraité par le Daflon sous stéréomicroscope.	32
Figure 15 : Observations de la CAMtraité par l'extrait aqueux du <i>Rosmarinus officinalis</i> sous stéréomicroscope.....	32
Figure 16 : Révélation des œufs au deuxième et troisième jour d'incubation.	33
Figure 17 : La membrane chorioallantoïdienne.	33
Figure 18 : Vascularisation du CAM en « Y ».....	34
Figure 19 : Effet de <i>Rosmarinus officinalis</i> sur la CAM.....	34
Figure 20 : Effet du Daflon sur la CAM.	35
Figure 21 : Attaques infectieuses.	35

Figure 22 : Effet de l'Amoxypen.	36
Figure 23 : Effet des traitements sur le poids de l'embryon.	36
Figure 24 : Action des traitements sur le nombre des capillaires.....	37
Figure 25 : Inhibition relative des vaisseaux sanguins.....	38
Figure 26 : Inhibition relative des vaisseaux sanguins.....	Error! Bookmark not defined.

Introduction



Introduction

Selon le Centre international de Recherche sur le Cancer (CIRC), les estimations du nombre des nouveaux cas atteint 18,1 millions et environ 9,6 millions de décès en 2018. A l'échelle mondiale, le nombre total de personnes vivant avec un cancer dans les cinq ans suivant le diagnostic, appelé prévalence à cinq ans, est estimé à 43,8 millions (Organisation Mondiale de la santé, 2018).

Le cancer est la deuxième cause de décès derrière les maladies cardiovasculaires dans le monde développé et la troisième cause après les maladies infectieuses et parasitaires dans les pays en développement (Bièche, 2004). En Algérie, le nombre de décès s'élève à 29453 sur 53076 cas enregistrés (Goblotant, 2018).

La progression et les métastases des tumeurs dépendent d'événements et d'échanges biologiques nutritionnels et respiratoires assurés par le sang et la lymphe. La prolifération tumorale est associée à un accroissement des réseaux vasculaires soit à proximité de la tumeur, soit en intra-tumoral. Les tissus tumoraux sont capables d'augmenter leurs approvisionnements, en fonction de leurs besoins au sein de l'organisme, en orientant et en optimisant le développement des vaisseaux péri-tumoraux (Leclers et *al*, 2005).

L'angiogenèse joue un rôle important dans plusieurs processus physiologique tels que le développement embryonnaire (Chung et Ferrara, 2011), le cycle menstruel (Plendl, 2000; Gargett and Rogers, 2001), la régénération tissulaire et la cicatrisation des plaies (Ranzer and DiPietro, 2010). D'autre part, plusieurs situations pathologiques reposent sur ce mécanisme pour progresser (Folkman, 2001). Ainsi, la **progression tumorale** figure parmi les pathologies les plus dépendantes de l'arbre vasculaire et de son développement (Folkman, et *al*. 1966 ; Folkman 1974 ; Folkman et Haudenschild, 1982 ; Folkman, 2002).

Toute augmentation de la population cellulaire tumorale exige une augmentation préalable de la densité capillaire tumorale (Folkman 2003). De la même façon, l'apparition de métastases nécessite une néovascularisation préalable (Risau, 1987 ; Bielenberg et Zetter, 2015), et une angiogenèse faible se traduit par une diminution des métastases (Liotta, et *al*. 1974).

Depuis plus de trois décennies, on a proposé de cibler l'angiogenèse pour bloquer la croissance tumorale et, bien sûr, sa progression pour donner des métastases (Folkman, 1971 ; Figg et Folkman, 2008). Il est possible de neutraliser le facteur de croissance lui-même, c'est le cas du bevacizumab/Avastin, un anticorps monoclonal anti-VEGF autorisé dans le traitement de plusieurs cancers (Ferrara, et *al*., 2005 ; Pietrantonio, et *al*., 2015).

D'autre part sorafenib (Davoudi et al., 2014 ; Ferrari et al., 2015), le sunitinib (Porta et al. 2014), le pazopanib (McLachlan et Banerjee 2015) , l'axitinib (Albiges et al., 2015) bloquent la transduction du signal bien que le VEGF se fixe sur son récepteur spécifique (Paesler et al. 2010 ; Tugues et al., 2011; Daimon et al., 2012).

Les thérapeutiques antiangiogéniques sont des avancées scientifiques prometteuses et porteuses d'espoir dans le traitement de la maladie cancéreuse. Ces médicaments sont globalement bien tolérés, mais la cardiotoxicité de certaines molécules a été récemment mise en évidence. (El Mesbahi et al, 2011).

L'avènement de la thérapie anti-angiogénique a suscité beaucoup d'espoir voir d'exagération, certains zélés sont allés jusqu'à annoncer la victoire finale contre le cancer (Lowy et Markel, 2001). Cependant, l'utilisation à grand échelle de cette catégorie thérapeutique commence à révéler ses limites ainsi que les risques inhérents (Abdel-Rahman et Fouad, 2014). Sans oublier le fardeau économique qu'exerce le recours à des médicaments de référence, princeps (Coon et al., 2010).

D'autre part, le développement de novo de médicaments est un processus long et coûteux. De plus en plus, les développeurs de médicaments cherchent à mettre en œuvre des stratégies rentables et à moindre risque pour le développement de produits pharmaceutiques. Le processus de trouver de nouveaux usages pour des médicaments existants en dehors de l'indication initiale pour laquelle ils ont été initialement approuvé le reprofilage (Mucke, 2015 ; Stoddard et al., 2016; Ishida et al., 2016). Ainsi, l'Artesunate (ART) un anti-malarial bien connue réputé faiblement toxique, montre une action anticancéreuse sélective et anti-angiogénique contre le carcinome cellulaire du rein (Jeong et al., 2015).

Par ailleurs, l'Amoxypen est un agent antibactérien indiqué chez les nourrissons, les enfants et les adultes dans le traitement des infections causées par des micro-organismes sensibles à l'Amoxypen : Infections ORL, Infections uro-génitales et respiratoire (SAIDAL, 2010). D'après la documentation disponible, cette molécule n'a fait l'objet d'aucune étude visant son interaction avec l'angiogenèse. C'est la première fois qu'on recourt au modèle expérimental *in vivo*, le test CAM, pour explorer son effet anti-angiogénique.

Ainsi, cette étude se décline en :

- Une synthèse bibliographique des connaissances actuelles dans le domaine de la biologie des cancers, l'angiogenèse et les traitements anti-angiogéniques.

- Une exploration, *in vivo*, du pouvoir inhibiteur du processus angiogénique du médicament largement utilisé pour le traitement des infections à germes sensibles à l'Amoxypen®, du daflon® et de l'extrait aqueux (décoction) du romarin.

Synthèse bibliographique



I. Biologie du cancer

I.1. Qu'est-ce qu'un cancer

Le cancer est une pathologie des organismes complexes (Calmels, 2004). En effet, seuls les organismes complexes possèdent des tissus renouvelables, expliquant ainsi leur susceptibilité aux cancers. Ces tissus sont le siège d'une prolifération cellulaire qui permet le renouvellement des cellules qui meurent ou se différencient. Cependant, ce phénomène présente l'inconvénient majeur d'entraîner des mutations au sein du génome, conférant à la cellule un phénotype malin. Le cancer peut donc être défini comme une « maladie des gènes » (Calmels, 2004).

Outre , le cancer est une maladie multifactorielle ; elle résulte d'altérations génétique et épigénétique de la cellule perturbant son bon fonctionnement (Cheeseman, 2016), ce qui cause une croissance anormale de cellules provoquée par de multiples changements dans l'expression des gènes conduisant à un déséquilibre de la prolifération cellulaire et la mort cellulaire (Cheeseman, 2016).

L'environnement et le patrimoine génétique jouent également un rôle important dans la prédisposition au développement de la maladie. Le cancer représente un gigantesque défi pour la médecine mondiale.

I.2. Caractéristiques des cellules cancéreuses

La cellule cancéreuse acquiert des caractéristiques d'indépendance à la signalisation de l'homéostasie tissulaire externe, une indépendance à l'ancrage cellulaire et une perte de polarisation (Martin, 2010). Elles miment ainsi les cellules endothéliales et peuvent former des vaisseaux fonctionnels (Azzi et Gavard, 2014). Ce phénomène, appelé mimétisme vasculaire, a été rapporté pour la première fois dans les mélanomes (Azzi et Gavard, 2014).

Le phénotype tumoral généralement se caractérise par un ensemble de propriétés : perte du contrôle de la division cellulaire, inhibition de l'apoptose, instabilité génétique favorisant la survenue d'altérations génétiques supplémentaires, apparition d'un phénotype migratoire et invasif des cellules, formation d'une néoangiogenèse (Sanson, 2004). En outre, les cellules tumorales à caractère souche (CSC) ont la capacité de s'autorenouveler et de reconstituer la tumeur d'origine dans des modèles de xénogreffes (Azzi et Gavard, 2014).

La prolifération chronique et incontrôlée des cellules cancéreuses n'est pas le résultat unique d'une dérégulation du contrôle moléculaire de la prolifération cellulaire, mais correspond

aussi à une adaptation du métabolisme énergétique à cette nouvelle demande (Puyraimond-Zemmour, Vignot, 2013).

Plus récemment, il a été montré que les cellules cancéreuses échappent au système immunitaire (Faure, 2015) (Figure 1).

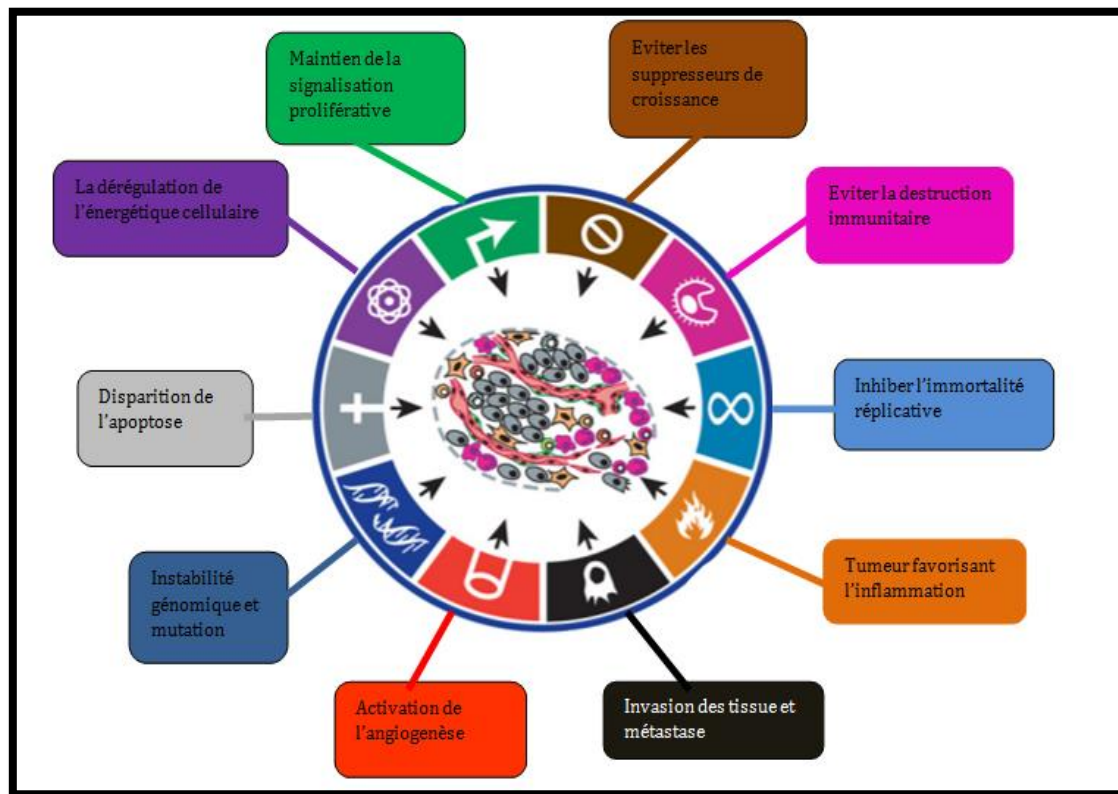


Figure 1 : Les six altérations communes à toutes les cellules cancéreuses et l'origine à leur prolifération incontrôlée (Hanahan and Weinberg, 2011).

I.3. Causes du cancer

La plupart des cancers sont causés par des agents environnementaux appelés carcinogènes. Les cancérigènes comprennent des agents physiques (rayons ultraviolets solaires, rayonnements ionisants) et des produits chimiques qui peuvent être d'origine endogène, formés au cours du métabolisme cellulaire ou exogène, apportés dans l'organisme par l'air respiré ou les aliments, tels que le goudron des cigarettes, les nitrites et de nombreux produits chimiques industriels, des virus (Stéhelin, 1984). Tous ces agents sont mutagènes c'est-à-dire qu'ils provoquent des mutations ou changements dans l'acide désoxyribonucléique (ADN) et la structure des chromosomes, qui à leur tour entraînent une division cellulaire incontrôlée (Kahn, 1987).

Il y a aussi les phénomènes épigénétiques qui sont, d'une part, les méthylations de dinucléotides de l'ADN et, d'autre part, des méthylations et des acétylations des histones des nucléosomes autour desquelles s'enroule l'ADN pour constituer la chromatine (Monier et Tubiana, 2008). Ce genre de réaction ne modifie pas la séquence des bases, mais peut changer l'expression des gènes (Monier et Tubiana, 2008).

I.4. Facteurs de risque pour les adultes en Algérie

	Hommes	Femmes	Total
Tabagisme (2011)	28.2%	1.7%	15%
Consommation totale d'alcool par habitant, en litres d'alcool pur (2010)	1.6%	0.4%	1.0%
Activité physique insuffisante (2010)	25.8%	39.4%	32.5%
Obésité (2014)	18.0%	29.3%	23.6%
Utilisation de combustibles solides à l'intérieur des habitations (2012)	–	–	0.0%

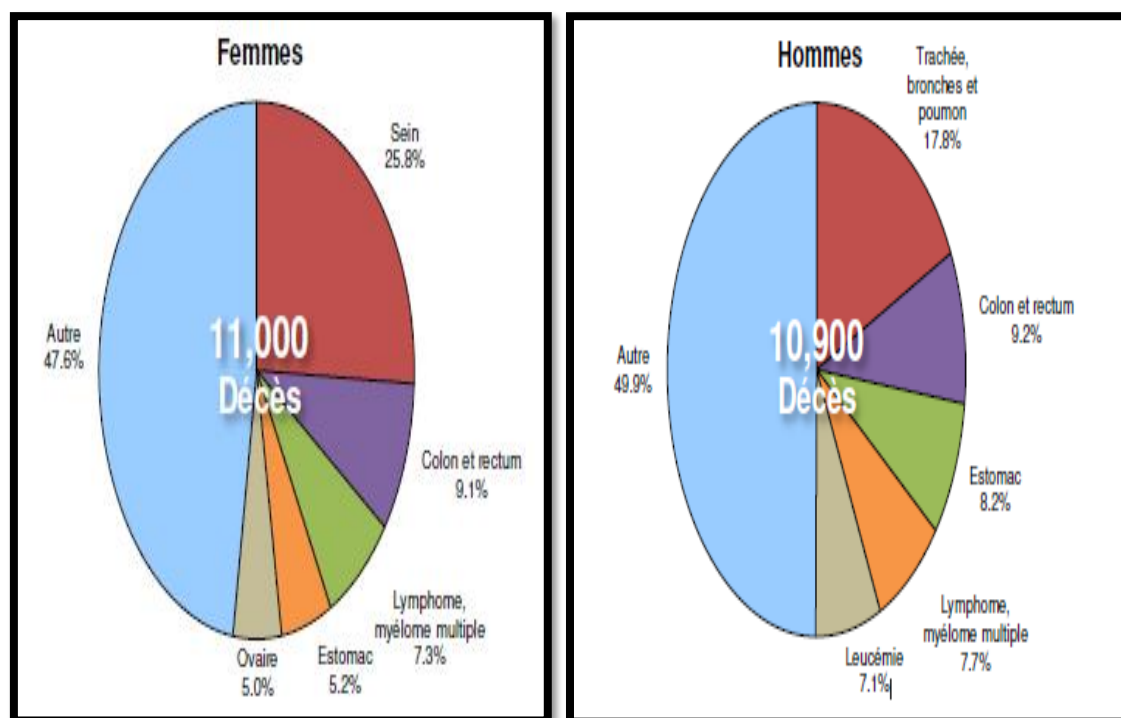


Figure 2 : Profil de mortalité par cancer en Algérie (Organisation mondiale de la Santé - profils des pays pour le cancer, 2014).

I.5. Mécanisme du cancer

De nos jours, la cancérogenèse apparaît comme un processus beaucoup plus complexe que ce que l'on croyait voici une décennie. L'étude du génome des cellules tumorales humaines a révélé un nombre de modifications génétiques et épigénétiques beaucoup plus grand que celui auquel on s'attendait. Au cours de la cancérogenèse, les cellules tumorales peuvent se différencier du fait de phénomènes épigénétiques (Monier et Tubiana, 2008).

Les cancers se développent par étapes successives résultant de la croissance excessive de clones cellulaires dans certains tissus. Des gènes responsables de modifications conduisant à l'apparition de ces clones et à leur prolifération anarchique ont été identifiés (Bièche, 2004).

I.6. Les étapes du processus de cancérogenèse

I.6.1. L'initiation

L'initiation est due à l'altération du génome rendant les cellules capables de se diviser en l'absence d'une incitation venue du tissu. Il résulte d'altérations génétiques et épigénétiques de la cellule perturbant son bon fonctionnement (Cheeseman et al, 2016)

Les initiateurs de tumeurs provoquent des mutations génétiques qui peuvent toucher des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs (Ségala, 2012). A l'échelle expérimentale, l'initiation peut être provoquée par l'application sur la peau d'un rongeur d'un agent chimique mutagène, par exemple le DMBA (diméthylbenzanthracène). Ces modifications du génome n'ont pas de conséquence détectable et peuvent rester inapparentes jusqu'au décès de l'animal, sauf s'il y aurait une phase de promotion (Tubiana, 2008).

I.6.2. La promotion

Les promoteurs tumoraux accélèrent la progression tumorale sans provoquer directement de mutations sur l'ADN. Souvent, ils sont des stimulateurs de la prolifération cellulaire. L'action d'un promoteur tumoral seul sur des cellules saines est totalement nulle sur l'initiation de l'oncogenèse. Son effet de promotion tumorale n'a lieu que sur des cellules qui ont déjà initié l'oncogenèse (Abel et al, 2009).

Certains promoteurs tumoraux sont produits par notre organisme comme les hormones sexuelles qui stimulent la prolifération des cellules des organes sexuels (Ségala, 2012), et l'inflammation chronique qui est un promoteur tumoral fort (Balkwill et Coussens, 2004).

I.6.3. La progression

Au cours de la progression, les cellules devenues autonomes acquièrent la capacité d'envahir les tissus voisins et de migrer (Struhl, 2007).

La progression tumorale est facilitée par l'instabilité génétique, elle-même favorisée par la perte de certains gènes (notamment p53) au stade initial de la tumorigenèse, permettant l'accumulation d'anomalies génétiques et leur sélection clonale (Sanson et Taillibert, 2004) et le Switch angiogénique (Folkman, 2002).

I.7. Les gènes impliqués dans la cancérogenèse

Une cellule devient cancéreuse suite à une altération de son ADN. Il existe deux types de modifications génétiques conduisant à la formation d'une cellule cancéreuse : les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. L'oncogène est une forme mutée d'un soi-disant proto-oncogène (Blanchard, 2003).

Le proto-oncogène stimule la division cellulaire en produisant des protéines qui réparent, renouvellent les tissus et permettent de dépasser l'état embryonnaire. L'anti-oncogène, au contraire, inhibe la division cellulaire (Filder, 2003).

I.7.1. Proto-oncogène

Les travaux effectués ont montré qu'il existe dans une cellule saine au moins 350 gènes qui, à la suite d'une mutation ou d'une recombinaison avec un rétrovirus, peuvent devenir des oncogènes. Le premier protooncogène, le gène c.src, a été identifié grâce à la découverte par Rous en 1911 d'un virus sarcomatogène chez les poulets (Monier et Tubiana, 2008).

Le proto-oncogène est un gène qui provoque normalement des taux élevés de division cellulaire par la production des protéines où il est nécessaire, pour la réparation et le renouvellement des tissus ou le dépassement de l'état embryonnaire dans le fœtus (Jayr et Jane, 2010). Alors que l'expression des proto-oncogènes est gouvernée par les signaux que ceux-ci reçoivent, les oncogènes (Apparus à la suite de modifications génétiques ou épigénétiques) sont prêts à participer en permanence à la cancérogenèse (Monier et Tubiana, 2008).

I.7.2. Anti-oncogènes ou gènes suppresseurs des tumeurs

Les gènes suppresseurs de cancer qui sont constitués par un plus petit nombre d'exemples ont été découverts plus récemment. Le concept de gène suppresseur de cancer avait été suggéré dès les années 1970, par des expériences de génétique somatique in vitro, montrant que le phénotype « normal » est dominant sur le phénotype « transformé » dans des hybrides somatiques formés à partir de cellules normales et de cellules cancéreuses. Ces gènes paraissent agir de façon récessive, leur inactivation nécessitant l'altération des deux allèles (perte de fonction) (Bièche, 2004).

Certains gènes, en particulier le p53, jouent un rôle important dans ces phénomènes. Ce gène peut interrompre la progression de la cellule agressée dans le cycle cellulaire de façon à augmenter le temps disponible pour la réparation de l'ADN. Il joue aussi un rôle important pour déclencher l'apoptose. Le gène p53, localisé sur le chromosome 17p13.1 (Sanson et Taillibert, 2004). Est à ce jour le plus important des gènes suppresseur du cancer puisqu'il est muté dans la moitié des tumeurs humaines ; il code pour une protéine de 53 kDa impliquée à la fois dans le contrôle du cycle cellulaire, la stabilité du génome et l'induction de l'apoptose (Sanson et Taillibert, 2004).

I.8. Durée du processus cancérologène

Le délai entre l'exposition à l'agent cancérologène et l'émergence clinique varie selon le type de cancer et les individus. Par exemple, l'étude des survivants des explosions atomiques d'Hiroshima et de Nagasaki a montré que le délai varie pour les leucémies entre 4 et 15 ans et pour les tumeurs solides de 10 à 60 ans pour les cancers n'apparaissant normalement qu'à un âge avancé. De même, les expositions intenses au soleil pendant la jeunesse entraînent des cancers de la peau pendant la vieillesse. Or chez les sujets devenus chauves entre 50 et 75 ans, les cancers du cuir chevelu apparaissent au même âge (Monier et Tubiana, 2008). Donc, la durée du processus cancérologène varie avec le type de cancer et le moment où s'exerce la promotion ainsi que son intensité et sa durée (Monier1 et Tubiana, 2008).

I.9. Traitement

Le traitement du cancer est l'un des domaines dans lesquels les anticorps monoclonaux thérapeutiques ont contribué aux progrès les plus spectaculaires (Cézé, 2009).

Les traitements les plus courants contre le cancer sont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie.

- **La chirurgie** : est souvent nécessaire pour le diagnostic initial nécessitant une simple biopsie ou une exérèse plus ou moins élargie et complète. La chirurgie peut aussi être nécessaire pour les reconstructions et dans les phases palliatives (Jayr et Muret, 2010).
- **La chimiothérapie** : consiste à utiliser des médicaments pour tuer les cellules cancéreuses ou du moins ralentir leur croissance. Certains traitements de chimio sont administrés par voie intraveineuse, tandis que d'autres sont administrés par la bouche sous forme de comprimés. Étant donné que les médicaments de chimio circulent dans presque toutes les parties du corps, ils sont utiles pour lutter contre les cancers qui se sont propagés. (Copyright American Cancer Society, 2016).
- **La radiothérapie** est également utilisée pour tuer ou ralentir la croissance des cellules cancéreuses. Ce traitement peut être utilisé seul, ou avec une chirurgie ou une chimiothérapie. La radiothérapie est similaire à passer une radio. Parfois, ce traitement est aussi administré en plaçant une « graine » dans le cancer, qui produira le rayonnement (Copyright American Cancer Society, 2016).
- **Les thérapies ciblées** : à la différence des chimiothérapies classiques qui interrompent le cycle cellulaire et ne sont pas spécifiques, les thérapies ciblées inhibent une voie métabolique nécessaire à la survie et la prolifération des cellules tumorales (Rougier et Mitry, 2009). En général, l'activation de ces voies métaboliques est élevée dans les cancers. L'effet inhibiteur des nouvelles molécules sera donc plus important sur les tissus cancéreux que sur les tissus normaux. En pratique, les thérapies ciblées ont un effet plutôt cytostatique et réduisent la prolifération sans détruire les tumeurs. Elles sont donc souvent associées à une chimiothérapie cytotoxique, elles potentialisent leurs effets en limitant la toxicité (Jayr et Muret, 2010).

II. La genèse vasculaire : vasculogenèse, angiogenèse et lymphangiogenèse

Au début, l'oxygène et les nutriments nécessaires à la croissance diffusent librement que ce soit dans les tissus sains ou dans les tissus néoplasiques (Pezzella et *al*, 2015). Puis, durant le développement embryonnaire, et au fur et à mesure que les besoins du fœtus augmentent, la diffusion n'est plus suffisante et un réseau vasculaire primitif se met en place par un processus appelé vasculogenèse (Swift et *al*, 2009), qui consiste en la formation d'un plexus vasculaire primitif à partir de progénitures angioblastiques, suivie d'une phase angiogénique, qui permet l'extension et la ramification de ce plexus primitif (Garrido-Urbani et *al*, 2014).

II.1. La vasculogenèse

La vasculogenèse traduit l'émergence *de novo* de cellules progénitrices endothéliales (EPC) ou angioblastes, à partir de tissus non vasculaires (Risau et Flamme, 1995). C'est un processus essentiellement développemental au cours duquel un vaisseau s'établit par différenciation de précurseurs endothéliales dérivés du mésoderme et leur association en un réseau vasculaire primitif (Azzi et Gavard, 2014) ; Participant dans une certaine mesure à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins chez l'adulte (Monge et *al*. 2011) mais également dans le cadre pathologique à l'angiogenèse tumorale (Patenaude, Parker et *al*. 2010) et à la néovascularisation après infarctus du myocarde (Vrijssen et *al*. 2016), ou ischémie critique des membres inférieurs (Zhao et *al*. 2016).

Durant toute l'embryogenèse, le développement de la vascularisation à partir d'îlots cellulaires précurseurs peut être observé. Ce phénomène est sous la totale dépendance du VEGF (Martin et Ouafi, 2012).

II.2. L'angiogenèse physiologique : Définitions

L'angiogenèse physiologique, quant à elle, correspond au développement de nouveaux capillaires sanguins à partir des capillaires préexistants. Ce processus physiologique existe durant l'embryogenèse en complément à la vasculogenèse ou indépendamment selon les tissus (Martin, Ouafi, 2011) ; Chez l'adulte, l'angiogenèse est réactivée de façon transitoire pour répondre à des besoins physiologiques (Ferrara, 2004) comme lors des phases de croissance et de réparation tissulaires (Nicolas Cézé et *al*, 2009), le cycle menstruel (Plendl, 2000; Gargett et Rogers, 2001)

D'autre part, plusieurs situations pathologiques reposent sur ce mécanisme pour progresser (Folkman, 2001). Ainsi, la progression tumorale figure parmi les pathologies les plus

dépendantes de l'arbre vasculaire et de son développement (Folkman, et *al.*, 1966 ; Folkman, 1974 ; Folkman et Haudenschild, 1982 ; Folkman, 2002).

Ce processus implique le mouvement et la différenciation de cellules endothéliales et non endothéliales (péricytes, cellules musculaires lisses), dont le résultat final est la morphogenèse d'un arbre vasculaire complexe et multifonctionnel (Pepper, 2000).

II.3. Les étapes de l'angiogenèse

II.3.1. La déstabilisation (désassemblage)

Plusieurs étapes séquentielles sont requises pour une angiogenèse efficace. Le premier pas implique l'ouverture des capillaires existant et la dégradation partielle de la matrice extracellulaire (ECM) environnante, qui permet l'infiltration cellulaire (Chung et *al.*, 2010). Les métalloprotéines matricielles (MMP, matrix métalloprotéinase) sont activement impliquées dans la protéolyse de la matrice extracellulaire (Christophe et DeClerck, 2002).

II.3.2. La sélection

La première étape de l'angiogenèse, après la déstabilisation des vaisseaux pré-existants, correspond à l'activation et à la sélection de cellules endothéliales (Treppe et Gavard, 2015). Les signaux pro- et anti-angiogéniques gouvernent le devenir des cellules endothéliales et les répartissent en cellules de front (tip cell) qui bourgeonnent à partir du vaisseau existant, se dirigent vers la source du signal angiogénique et guident le néo-vaisseau ; et en cellules de soutien (stalk cells) qui prolifèrent en arrière, permettant l'allongement du vaisseau. D'un point de vue moléculaire (Azzu et Gavard, 2014). (Voir figure 3).

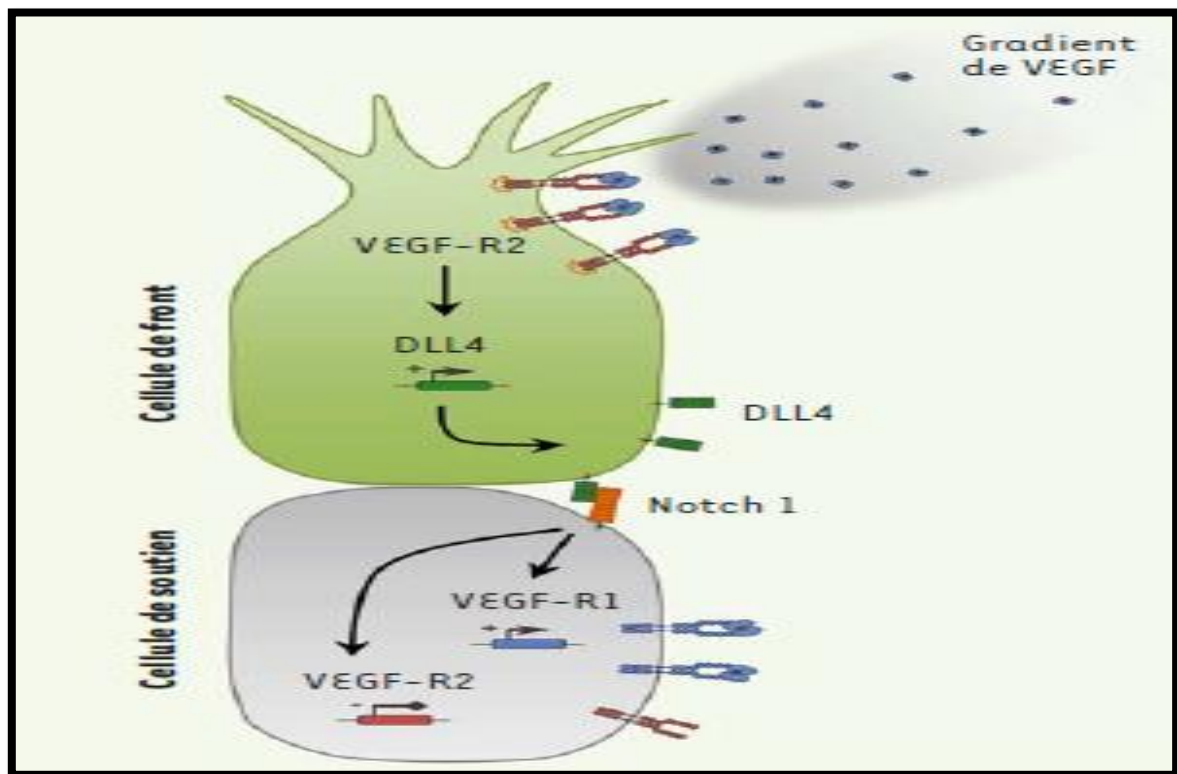


Figure 3 : Les mécanismes moléculaires de sélection de la cellule de front (Treps et Gavard, 2015).

II.3.3. La migration

A la suite de son activation et de sa sélection, la cellule de front bourgeonne à partir du vaisseau et acquiert de nombreuses protrusions membranaires de type filopodes qui sont hautement dynamiques (Azzi et Gavard, 2014). L'acquisition de cette capacité de migration repose sur un affaiblissement des interactions entre les cellules endothéliales et une dégradation de la matrice extracellulaire. L'adhérence cellulaire permet une migration collective en arrière (Azzi et Gavard, 2014). (Voir figure 4).

II.3.4. La fusion et la formation de la lumière

Sous l'impulsion de la prolifération des cellules de soutien, le néovaisseau s'allonge, guidé par la cellule de front. Lorsque deux cellules de front entrent en contact au travers de leurs filopodes, les deux bourgeons vasculaires fusionnent par anastomose et forment un vaisseau connecté (Wacker et al, 2011).

II.3.5. La maturation et le flux sanguin

La maturation du vaisseau nécessite le rétablissement de la barrière endothéliale et du flux sanguin. La voie de signalisation impliquant l'angiopoïétine 1 (Ang1) et son récepteur Tie2 s'oppose aux actions du VEGF. Elle induit le renforcement des jonctions entre les cellules endothéliales ainsi que leur quiescence (Gavard et *al*, 2008). Un gradient de PDGF-BB (platelet-derived growth factor) et de TGF- β 1 (transforming growth factor) induit parallèlement le recrutement des pericytes¹ et des cellules musculaires lisses, ainsi que le dépôt d'une nouvelle matrice extracellulaire à la surface des vaisseaux, assurant ainsi la maturation finale d'un vaisseau sanguin fonctionnel (Ricard et Simons, 2015).

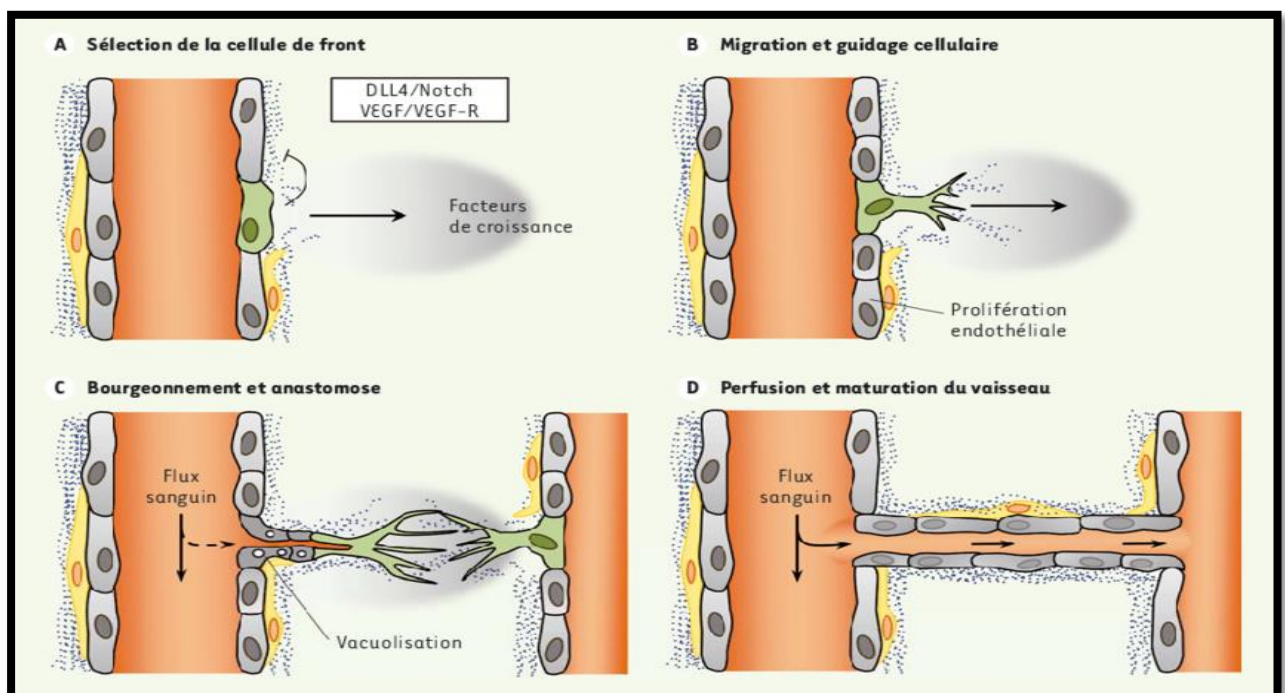


Figure 4 : Etapes de l'angiogenèse normale (Treps et Gavard, 2015)

II.4. Médiateurs de l'angiogenèse

II.4.1. Les activateurs de l'angiogenèse

➤ VEGF (vascular endothelial growth factor)

Le VEGF appartient à une famille de facteurs de croissances angiogéniques (Halimi et *al.*, 2009). Le signal induit par le VEGF a un rôle important dans la physiologie de l'angiogenèse de même que dans la néoangiogenèse associée à la croissance tumorale car il est indispensable à la survie, à la migration et à la croissance des cellules endothéliales (Halimi et *al.*, 2008).

➤ **bFGF (Facteur de croissance basique des fibroblastes)**

Le bFGF est présent dans les cellules nerveuses, les kératinocytes, les macrophages et les cellules endothéliales; en outre, des chercheurs l'ont détecté dans des tumeurs reliées au cancer du cerveau, du pancréas, de la vessie et de la prostate. Il est par ailleurs rare dans d'autres formes de tumeurs, par exemple le cancer du sein et des voies gastro-intestinales, ce qui laisse croire à une expression hétérogène entre les diverses formes de tumeurs (Kerbel et Folkman, 2002).

➤ **PD-ECGF (Facteur de croissance des cellules endothéliales dérivé des plaquettes)**

Les concentrations de ce facteur de croissance sont plus élevées dans les tumeurs du sein, de l'estomac, du côlon, de la tête et du cou. Des recherches ont indiqué que le PD-ECGF et le VEGF participeraient ensemble à la formation de nouveaux vaisseaux (Munagala et al., 2011).

➤ **HGF (Facteur de croissance des hépatocytes)**

Ce facteur influe non seulement sur la croissance des hépatocytes mais aussi sur celle d'autres types de cellules, notamment les cellules endothéliales. Il existe encore peu de résultats publiés sur la relation entre le HGF et la formation de micro-vaisseaux dans les tissus des tumeurs (Hilberg et al., 2008).

➤ **Autres facteurs de croissance**

D'autres facteurs de croissance sont impliqués dans l'angiogenèse, parmi lesquels le facteur de croissance acide des fibroblastes (aFGF), ainsi que le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) non lié à l'héparine, le facteur de croissance épidermale (EGF), le facteur de croissance de type insuline-1 (IGF-1), le facteur de croissance des kératinocytes (KGF) (Szekanecz et al., 2010).

II.4.2. Les inhibiteurs de l'angiogenèse

Il existe un grand nombre de molécules inhibitrices de l'angiogenèse, naturelles ou de synthèse (Szekanecz et al, 2010).

Les cytokines angiostatiques inhibent la sécrétion de médiateurs angiogéniques et bloquent ainsi indirectement la néovascularisation. Ainsi le TGF- β est un inhibiteur puissant de la mitose des cellules endothéliales, il inhibe aussi la migration de ces cellules, réduit l'expression de VEGFR-2 et stimule la synthèse d'intégrines et de composants de la matrice

extracellulaire (Michael et Pepper, 2000). D'autres composés comme l'angiostatine, un fragment du plasminogène (Vandenbunder et Poupon, 1995), l'endostatine, un fragment du collagène de type XIII (Abdollahi et *al.*, 2005) et la throbospondine1 (Isenberg et *al.*, 2009) .

II.5. L'angiogenèse pathologique

Le processus angiogénique est impliqué dans nombre de conditions pathologique, entre autres, figurent la psoriasis (Folkman 1972), la rétinopathie diabétique (Adamis et *al.*, 1994; Sugimoto et *al.*, 2013), polyarthrite rhumatoïde (Neidhart et al. 1999), obésité (Lemoine, et *al.* 2013 ; Cao, 2014) et particulièrement les pathologies néoplasiques (Folkman 1971 ; Folkman 1985 ; Folkman, 2002).

II.5.1. L'angiogenèse tumorale

L'angiogenèse tumorale participe à l'augmentation de l'afflux en oxygène et en nutriments, dont l'apport par simple diffusion n'est plus suffisant à la croissance de la tumeur (Treps et *al.*, 2015). Contrairement aux conditions physiologiques, l'angiogenèse tumorale se caractérise par un échec de maturation et d'organisation, résultant en un réseau vasculaire anarchique et une perméabilité élevée (Azzi et *al.*, 2014).

II.5.2. Les étapes de l'angiogenèse tumorale

Les mécanismes moléculaires et cellulaires de l'angiogenèse physiologique sont piratés au cours de l'angiogenèse tumorale, c'est-à-dire lors de la mise en place d'une vascularisation dédiée à l'irrigation du tissu cancéreux (Treps et Gavard, 2015).

En dehors de l'hypoxie, l'augmentation de l'expression des facteurs pro-angiogéniques est la conséquence de l'activation d'oncogènes alors que la diminution des facteurs anti-angiogénique peut provenir de la perte d'expression de gènes suppresseurs de tumeur (Folkman, 2003).

Les cellules tumorales court-circuitent ou amplifient les différentes voies de signalisation pour les détourner à leur profit. Les facteurs pro-angiogéniques libérés par la tumeur en réponse à l'hypoxie et à l'activation des oncogènes provoquent le découvrément des péricytes et l'activation des cellules endothéliales . Les métalloprotéases libérées dégradent la matrice et permettent la migration des cellules endothéliales vers la source du stimulus. Ainsi, les cellules endothéliales prolifèrent et les tubes se forment (Chung et *al.*, 2010).

II.5.3. Rôle du "Switch angiogénique" dans la sortie de dormance tumorale

Le terme de « dormance tumorale » désigne la persistance de cellules tumorales en petit nombre dans l'organisme, sans croissance tumorale ; certaines tumeurs induites restent dormantes jusqu'à ce que l'immunité adaptative de l'animal soit altérée, ce qui déclenche le développement des tumeurs (Folkman, 1971). Un second processus clé dans la sortie de dormance est la capacité de la tumeur à contrôler l'angiogenèse. Ainsi, Folkman et Hanahan ont attribué en 1989 un rôle critique au « switch angiogénique » dans la sortie de dormance tumorale, c'est-à-dire à la capacité de la tumeur à établir un réseau vasculaire connecté avec son environnement (Carmeliet et Jain, 2000) (Figure 5).

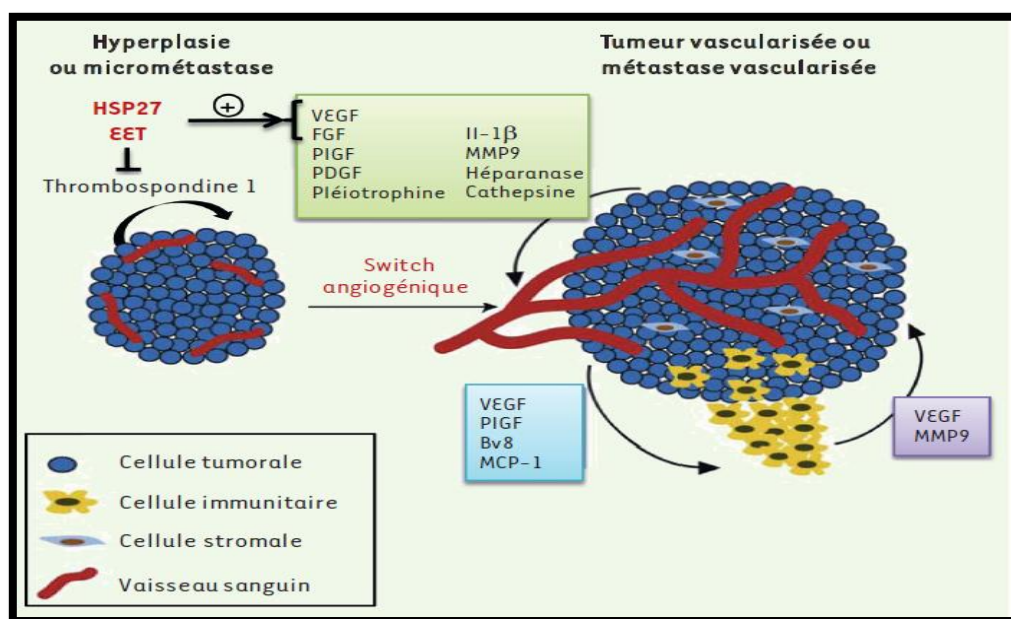


Figure 5 : Représentation schématique des médiateurs moléculaires et cellulaires du switch angiogénique.

Lors de la croissance de la tumeur l'intérieur de la masse tumorale devient progressivement hypoxique ce qui conduit à l'augmentation de la stabilité et de l'activité du facteur induit par l'hypoxie, HIF-1 (Zundel et al, 2000). Les cellules tumorales en hypoxie déclenchent la libération de facteurs nécessaires à la mise en place de l'angiogenèse tumorale : c'est le switch angiogénique (Semenza, 2003).

Par le grand nombre de gènes cibles exprimés, les fonctions induites par HIF-1 confèrent un certain nombre d'avantages aux cellules tumorales. La surexpression de HIF-1 a été corrélée avec la mortalité, le mauvais pronostic et la résistance aux traitements observés chez les patients (Semenza, 2003).

II.6. Le microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral peut se définir comme l'ensemble des facteurs moléculaires, cellulaires et tissulaires capables d'influencer ou d'être influencés par les cellules tumorales (Provot, 2014). Il comprend divers types cellulaires incluant les cellules endothéliales, les péricytes, les fibroblastes et les cellules inflammatoires : macrophages, mastocytes et neutrophiles (Azzi et Gavard 2014). Ces différents types cellulaires sécrètent différents facteurs comme VEGF, FGF, facteur de nécrose tumorale (TNF α), facteur de croissance placentaire (PLGF),... qui jouent un rôle primordial dans le processus angiogénique (Martin et Ouafik 2007; Fridman et Sautès-Fridman, 2014).

Les cellules endothéliales stimulent la prolifération tumorale directement par la production locale de facteurs de croissance, et indirectement lors de l'angiogenèse tumorale qui apporte d'autres facteurs de croissance véhiculés par le sang (Provot, 2014). Elles sécrètent aussi d'autres facteurs, comme le monoxyde d'azote (NO) qui induit la dilatation des vaisseaux sanguins par relâchement des péricytes (Conway, et *al.*, 2001).

Les cellules immunitaires infiltrées influencent aussi fortement la prolifération des cellules endothéliales pour créer de nouveaux vaisseaux sanguins en sécrétant une panoplie de facteurs : facteur de croissance de l'épiderme (EGF), TGF β , (TNF α), FGF, interleukines, etc. (Provot, 2014 ; Riabov et *al.*, 2014 ; Marone, et *al.*, 2016).

Une fois le processus de desmoplasie bien engagé, les cellules stromales les plus fréquentes sont des cellules de type fibroblastique appelées CAF (*cancer-associated fibroblasts*) ou TAF (*tumor-associated fibroblasts*). Les CAF présentent des caractéristiques différentes des fibroblastes normaux, notamment un profil d'expression génique qui leur est propre. Leur phénotype est dit activé. Ils proviennent de myofibroblastes, de fibroblastes résidents, de cellules souches, de fibroblastes sénescents, de la moelle osseuse (Albregues et *al.*, 2014 ; Buache et Rio, 2014). Les CAF synthétisent et sécrètent abondamment des molécules solubles stimulant l'angiogenèse par des mécanismes paracrines, entre autres figurent les bFGF, VEGF, PDGF, TGF- β ,... (Huang et *al.*, 2014).

Le tissu adipeux est fréquemment retrouvé à proximité des cancers invasifs, en particulier dans le cancer du sein. Parmi les cellules qui le composent, les adipocytes matures, du fait de leur activité sécrétoire, sont hautement susceptibles d'influencer l'agressivité tumorale. En fait, les adipocytes peuvent synthétiser des cytokines, VEGF par exemple, impliquées dans l'angiogenèse (Laurent et *al.*, 2014).

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau complexe de fibres, d'une grande diversité de molécules protéiques, glycoprotéiques, protéoglycanes, et de polysaccharides. Outre le fait qu'ils représentent un substrat facilitant les mouvements cellulaires, ces fibres assurent flexibilité et résistance aux tissus et constituent des canaux de communication intercellulaire (Kalluri, 2003). En dehors de leurs rôles structuraux, la MEC exerce un contrôle rigoureux sur le comportement cellulaire et peut être de ce fait impliquée dans la plupart des processus physiologiques ainsi que dans des conditions pathologiques (Mongiat et *al.*, 2016). La MEC régule l'angiogenèse à différents niveaux et par différentes manières. A travers des interactions d'adhésion avec les intégrines exprimées sur les cellules endothéliales, La MEC orchestre des cascades de signalisation intracellulaires complexes et affecte, de ce fait, plusieurs aspects fondamentaux de leur biologie : la prolifération, la migration, l'organisation du cytosquelette, la morphologie cellulaire, la survie cellulaire,... et par conséquent la stabilisation des vaisseaux sanguins (Neve et *al.* 2014). En outre, les molécules de la MEC et ses fragments jouent un rôle primordial dans l'installation de l'angiogenèse (Mongiat et *al.*, 2016) et en fin les cytokines angiogéniques directement fixées (bFGF, EGF) sur la MEC et qui nécessitent une activation protéolytique (Hynes et Naba, 2012).

II.7. Structure et caractéristiques des vaisseaux tumoraux

Une perméabilité constitutive importante, une dilatation, un réseau chaotique et un flux de sang aberrant caractérisent les vaisseaux tumoraux (Treps et Gavard, 2015). Au sein d'un même vaisseau, le flux sanguin n'est pas constant et peut même changer de direction. Les vaisseaux tumoraux ne forment qu'une barrière partielle contre les grosses molécules et les protéines plasmatiques (Treps et Gavard, 2015) (Figure 6).

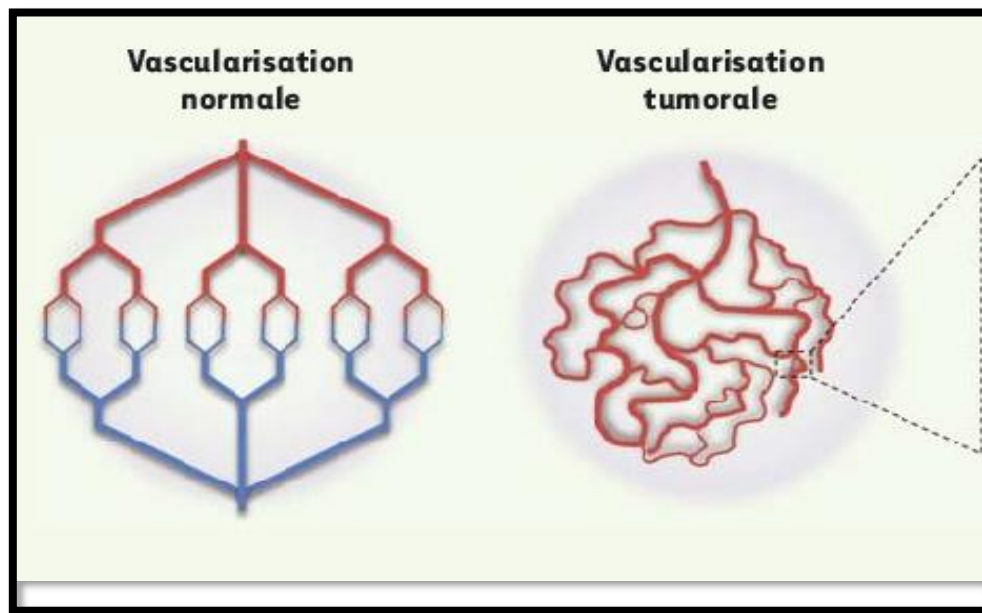


Figure 06 : Representation de la hiérarchisation des vaisseaux normaux et tumoraux (Treps et Gavard, 2015).

II.8. Rôle de l'angiogenèse dans la progression tumoral et la métastase

La progression et l'invasion tumorales sont des processus complexes au cours desquels les cellules acquièrent des propriétés aberrantes de prolifération, survie et migration, et la capacité à former un réseau sanguin dédié. (Azzi et Gavard, 2014).

Le processus métastatique correspond à la dissémination de cellules à partir d'une tumeur primaire vers des organes à distance. Il existe différentes étapes, maintenant bien répertoriées, dans le processus de la cascade métastatique (Méjean et Lebret, 2008) :

- Les étapes dans la tumeur primaire : angiogenèse et prolifération de la tumeur, perte de l'adhésion cellulaire, capacité de mobilité et de diffusion.
- Les étapes dans la circulation : entrée, survie et transport.
- Les étapes dans les organes à distance : arrêt dans le tissu, extravasation, angiogenèse et prolifération.

L'essentiel de la mortalité liée au cancer est due au développement de métastases (Hubert et Abastado, 2014). L'un des prérequis d'une croissance tumorale métastatique, l'installation de réseaux vasculaires par angiogenèse et lymphangiogenèse qui assurent des échanges nutritionnelles et respiratoires (Bacac et Stamenkovic, 2008). La production par les cellules cancéreuses de facteurs de croissance stimulant la néoformation des vaisseaux lymphatiques

constitue une des adaptations responsables de la propagation métastatique et dénote le passage de l'état de dormance à la progression tumorale (Leclers et *al.*, 2005) (Figure 7).

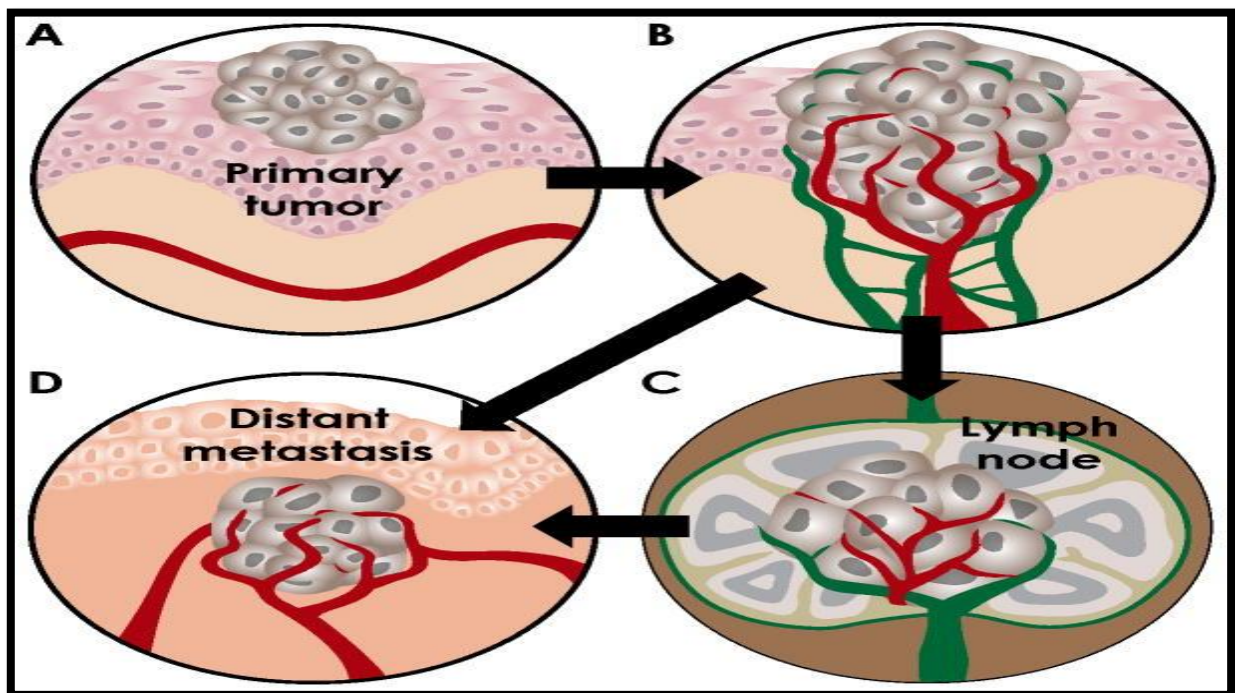


Figure 07 : Angiogenèse et métastase (Bielenberg et Zetter, 2015)

II.9. La lymphangiogenèse

Un autre processus, la lymphangiogenèse, dont les étapes sont schématiquement similaires à celles de l'angiogenèse, a comme but final la formation des vaisseaux lymphatiques (Mandriota et Pepper, 1999). Le système lymphatique est formé de vaisseaux qui drainent les liquides interstitiels de l'organisme vers des organes lymphoïdes comme les ganglions lymphatiques, la rate et les amygdales ainsi que vers les organes les plus évolués tels que le thymus et la moelle osseuse (Leclers et *al.*, 2005). Il possède un mur vasculaire beaucoup plus perméable que celui du réseau sanguin, ce qui en fait une voie privilégiée pour la dissémination métastatique (Morfoisse et *al.*, 2014).

II.10. Thérapie anti-angigénique

C'est Judah Folkman qui en 1971 a proposé la théorie selon laquelle sans vaisseau, une tumeur ne pouvait pas grossir au-delà d'une taille critique (2 mm) et ne pouvait pas métastaser à d'autres organes (Méjean et Lebreton, 2008).

En 2004, 33ans après la publication de l'hypothèse, la fameuse "Food and Drug Administration" (FDA) autorisa la mise sur le marché du premier médicament antiangiogénique sous le nom commercial d'Avastin (Ferrara *et al*, 2005). Actuellement, il existe un grand nombre de molécules inhibitrices de l'angiogenèse, naturelles ou de synthèse. Certaines d'entre elles ont déjà été utilisées pour cibler la néovascularisation associée aux tumeurs ou à l'inflammation (Szekanecz, et al.2010). Parmi les plus connus de thérapie antiangiogéniques il y a :

II.10.1. Bevacizumab

Le bevacizumab est un anticorps monoclonal recombinant de type IgG1 (Pérol et Arpin, 2009) anti-VEGF humanisé (Feige, 2010), bloquant ainsi sa capacité à se fixer sur son récepteur (Pérol et Arpin, 2009). Il est actuellement utilisé en association avec plusieurs types de chimiothérapie (El Mesbahia et *al*, 2011) et devenu un standard du traitement de différents cancers (colorectal, rein, sein, poumon) (Cézé et *al*, 2009).

II.10.2. Sunitinib

Le sunitinib est un inhibiteur spécifique des activités tyrosine kinase ayant pour principales cibles VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3 (Bennis et *al*, 2010) où il inhibe la phosphorylation de ces récepteurs (El Mesbahia et *al.*, 2011). Les études précliniques ont montré qu'il permet d'inhiber la néovascularisation diminuant ainsi la densité microvasculaire tumorale tout en ayant une action antitumorale directe dans certains cancers (Bennis et *al*, 2010).

II.10.3. Sorafenib

Le sorafénib est un inhibiteur de nombreux récepteurs à activité tyrosine kinase impliqués dans l'angiogénèse et la prolifération tumorale (El Mesbahia et *al*, 2011). Il inhibe également d'autres activités enzymatiques notamment les sérine/thréonine kinases associées aux protéines Raf, impliquées dans la prolifération cellulaire de certaines tumeurs. Son action inhibitrice multikinase a permis de diminuer la croissance tumorale (Bennis et *al*, 2010).

II.11. Efficacité clinique des antiangiogéniques

En cancérologie, l'efficacité clinique d'un traitement est évaluée habituellement par sa capacité à améliorer la survie globale (SG) des malades lors d'études comparatives à grandes échelles (essais cliniques de phase III). L'intérêt du traitement antiangiogénique repose sur l'hypothèse que l'inhibition de l'angiogenèse doit empêcher la croissance tumorale tout en étant mieux toléré que les traitements anticancéreux conventionnels.

II.12. Résistance aux traitements anti-angiogénique

La méthode conventionnelle en chimiothérapie consiste à administrer la dose maximale tolérable suivie d'une période de pause thérapeutique. L'équipe de Folkman en 2000 proposait que les doses délivrées au patient soient en faible quantité mais sur des périodes longues afin d'empêcher la tumeur de se multiplier pendant le laps de temps sans traitement et de développer des résistances (Castan, 2014).

II.13. Toxicité des anti-angiogéniques

Comme pour toute nouvelle classe thérapeutique, des effets indésirables significatifs leur ont été imputés. Les principaux effets classes sont ici résumés (Bennis et *al.*, 2009).

❖ Atteintes cardio-vasculaires :

L'hypertension artérielle a été l'effet indésirable le plus fréquemment observé chez les patients traités par antiangiogéniques. L'effet hypertenseur des antiangiogéniques est expliqué par une vasoconstriction et une augmentation des résistances périphériques liées à l'inhibition de la production de monoxyde d'azote par les vaisseaux mais aussi à une diminution du nombre et de la densité capillaire au niveau des tissus (El Mesbahi et *al.*, 2011).

❖ Atteintes rénales :

Parmi les atteintes rénales observées chez les patients recevant un antiangiogénique, la protéinurie a été la plus fréquente (Bennis et *al.*, 2009).

❖ Atteintes cutanées :

Au cours des essais cliniques, une augmentation de l'incidence des saignements post-opératoires ou des complications de cicatrisation des plaies a été observée dans les 60 jours suivant une intervention chirurgicale majeure chez 10 à 20 % des patients traités par bevacizumab au moment de l'intervention chirurgicale (Bennis, 2009).

- Des modifications de la chevelure ont été également récurrentes. Une décoloration des cheveux après 5 à 6 semaines de traitement a concerné 30 % des patients sous sunitinib.
- Affections des ongles : On observe, chez les patients sous Sorafenib et Sunitinib, des hémorragies sous-unguéales. Elles apparaissent, dans le premier mois du traitement, sous la forme de lignes longitudinales noires, ou rouges foncés, situées sous la partie distale des ongles. Elles peuvent atteindre un, ou plusieurs doigts et plus rarement, les orteils (Lattafi et *al.*, 2016).
- Trouble de la pigmentation cutanée: Une coloration jaunâtre de la peau est notée, chez, environ, 30% des patients traités par Sunitinib (Lattafi et *al.*, 2016).

❖ autres effets secondaire

Des risques d'hémorragies, de fatigue et de diarrhées.

II.14. Reprofilage des médicaments dans la thérapie anti-angiogénique

Une nouvelle stratégie consiste au reprofilage ou revalorisation de molécules (médicaments) déjà en service. Ainsi, des médicaments en usage pour le traitement d'une telle ou telle pathologie, peuvent trouver une application nouvelle (Mucke, 2015 ; Ishida et *al.*, 2016).

La réorientation des médicaments (également appelée repositionnement) est le processus d'identification d'une nouvelle utilisation pour un médicament existant dans une indication ne relevant pas de l'indication originale. Réutilisation de médicaments constitue un domaine émergent et dynamique de développement de médicaments, souvent dirigé par des unités académiques et médicales organismes de bienfaisance de recherche. La réutilisation inclut la découverte de nouvelles utilisations thérapeutiques pour des médicaments déjà connus (repositionnement), développer différentes formulations pour le même médicament (reformulation) et créer de nouvelles combinaisons de médicaments précédemment utilisés en tant que produits distincts (combinaison de médicaments innovants) (Langedijk et *al.*, 2015). A titre d'exemple, la thalidomide, initialement approuvée en Europe dans les années 1950 comme sédatif et aux États-Unis en 1998 pour traiter la lèpre, a été l'un des premiers composés suggérés par l'équipe de Bloom pour le reprofilage dans ce cas, le traitement du myélome multiple la Food and Drug Administration des États-Unis (FDA) a approuvé la thalidomide pour le myélome multiple en 2012. Bloom estime que cela ne coûte que 40-80 millions de dollars pour obtenir l'approbation de la FDA, comparativement à la moyenne de 1 à 2 milliards de dollars qu'il faut pour développer un médicament à partir de zéro (Scannell et *al.*, 2012) ; aussi Artesunate (ART) un anti-malarial bien connue réputé faiblement toxique, montre une action

anticancéreuse sélective et anti-angiogénique contre le carcinome cellulaire du rein (Jeong et *al.*, 2015).

Etudes expérimentales



III. Matériel et méthodes

Pour déterminer l'effet de « Daflon » et « Amoxypen » et de l'extrait aqueux (EAq) de « *Rosmarinus officinalis* » sur l'angiogenèse, nous avons opté pour un test, *in ovo*, qui consiste à évaluer la croissance des vaisseaux sanguins dans la membrane chorioallantoïdienne de l'embryon de poulet, le «Test de CAM ».

La totalité des expérimentations effectuées ont été réalisées au niveau de l'animalerie du centre universitaire A. BOUSSOUF à Mila.

III.1. Collecte des œufs et incubation

Fraîchement fertilisés, cent cinquante-quatre (154) œufs d'une taille hétérogène ont été collectés dans une production locale (domestique) des fermes familiales au niveau de la wilaya de Mila. Une vérification minutieuse des œufs pour trier ceux qui sont effectivement fécondés de ceux qui ne le sont pas à l'aide d'une torche appliquée sur le pôle pointu de l'œuf (Figure 8).

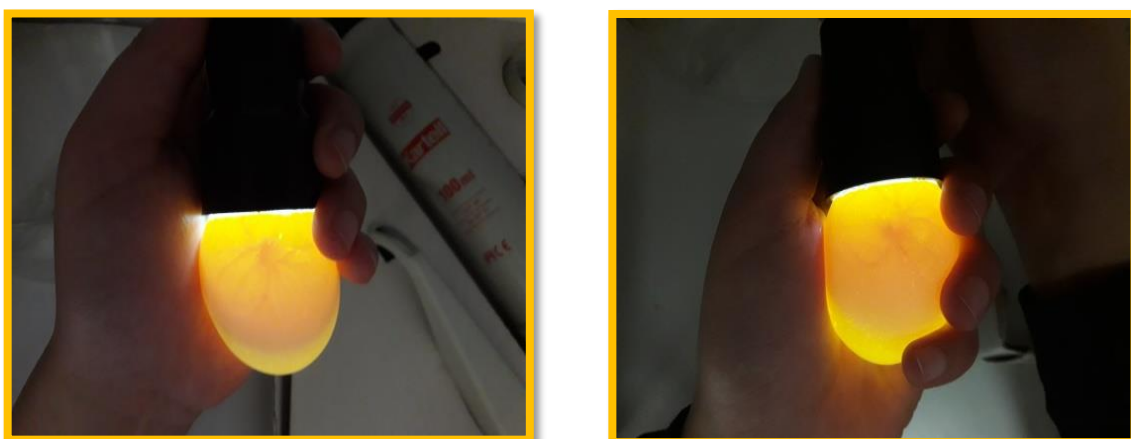


Figure 8 : Vérification de la fécondité des œufs.

Pour diminuer la contamination à partir de la surface, les œufs ont été désinfectés avec de l'éthanol à 70%, puis ont été séchés dans l'air ambiant, incubés à 37.5 ° C et 65% d'humidité dans un incubateur d'œufs (WQ01) pour 72h. Les œufs sont balancés (tournés) de 60 ° chaque 2 heures pendant 3 jours (Figure 9).



Figure 9 : Stérilisation et incubation des œufs.

III.2. Préparation des membranes chorioallantoïdiennes

Au 3^{ème} jour de l'incubation, et suivant le protocole (Ribatti et *al.*, 2013), les coquilles des œufs ont été percées au pôle le plus pointus à l'aide d'une aiguille (22Gx1 1/4" ; 0,70x30mm) et 2-3ml d'albumen ont été prélevés délicatement pour ne pas toucher le jaune. Le prélèvement provoque la formation d'un sac d'air artificiel qui provoque le décrochage de la CAM de la coquille de l'œuf. Ensuite, une fenêtre d'environ 1cm de diamètre a été ensuite découpée dans la coquille et recouverte de ruban adhésif transparent. L'embryon sous-jacent le CAM et les vaisseaux sont révélés, et ensuite les œufs ont été retournés à l'incubateur. (Voir figure10).



Figure 10 : Préparation et révélation de la membrane chorioallantoïdienne.

III.3. Préparation des substances testées

III.3.1. Origine de l'Amoxypen® 1g et préparation de solution

Une quantité largement suffisante du médicament antibiotique préparation injectable voie intramusculaire stricte, l'Amoxypen sous le nom de marque Amoxicilline ® 1g, produit par la firme pharmaceutique SAIDAL, enregistré sous le numéro du lot 16/99/13G043/003et a été acheté auprès d'une officine locale à Ahmed Rachedi.

Dans un éppendorf, 250mg de la poudre Amoxypen 1g a été dissout dans 1ml d'eau distillée, puis agité par un agitateur vortex à une température ambiante (Figure 11).



Figure 11: Préparation de l'Amoxypen® (Amoxicilline 1g).

III.3.2. Origine du daflon® 500mg et préparation de la suspension :

Une quantité largement suffisante du médicament vasoprotecteurs voie orale, le daflon® sous forme de comprimés pelliculés (30) à base de fraction flavonoidique purifiée micronisée 500mg, autorisé sur le marché depuis 18/04/1986 par SERVIER -France, a été acheté auprès d'une officine locale à Ahmed Rachedi. Le numéro du lot était 649279 affichant une date de fabrication de 08/2018 et de péremption de 08/2021.

Pour une suspension bien concentrée de daflon, un comprimé de 500mg a été dissout dans 5 ml d'eau distillé, puis l'ensemble a été agité vigoureusement pendant 20 min à l'aide d'un agitateur mécanique jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène (Figure 12).

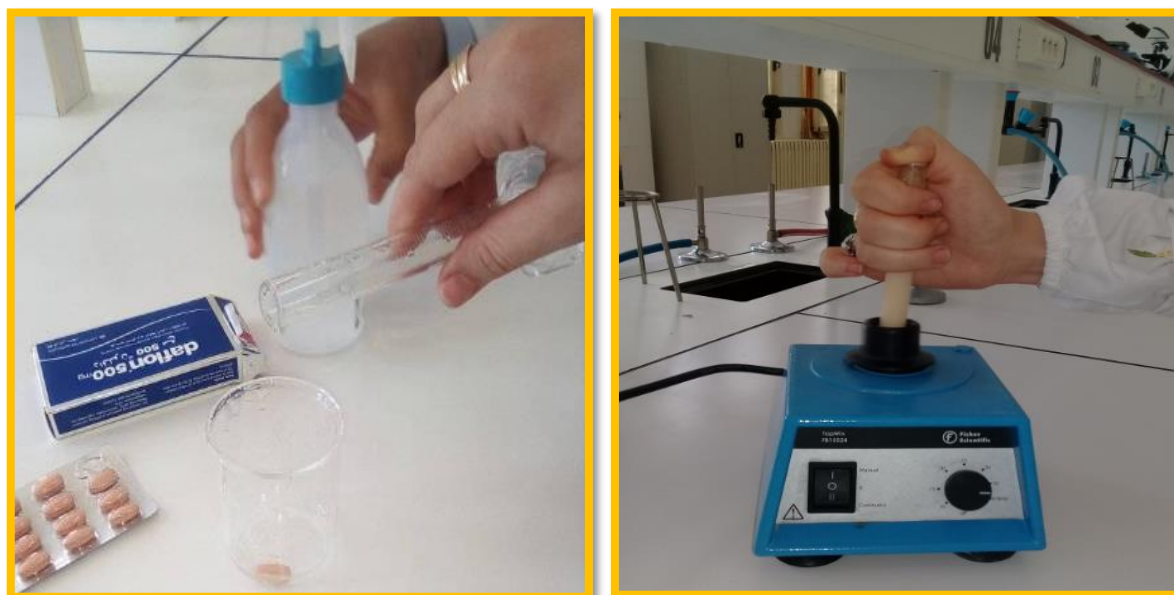


Figure 12: Préparation du Daflon® 500mg.

III.3.3. Origine du Matériel biologique (Végétal) et préparation de l'extrait aqueux de *Rosmarinus officinalis*

L'extrait aqueux (EAq) de *Rosmarinus officinalis*, a été obtenu par décoction de 30 g des tiges et des feuilles de la plante dans 50ml d'eau distillée pendant 10 minutes à température élevée sur une plaque à chauffante. Puis la filtration jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène (Figure 13).

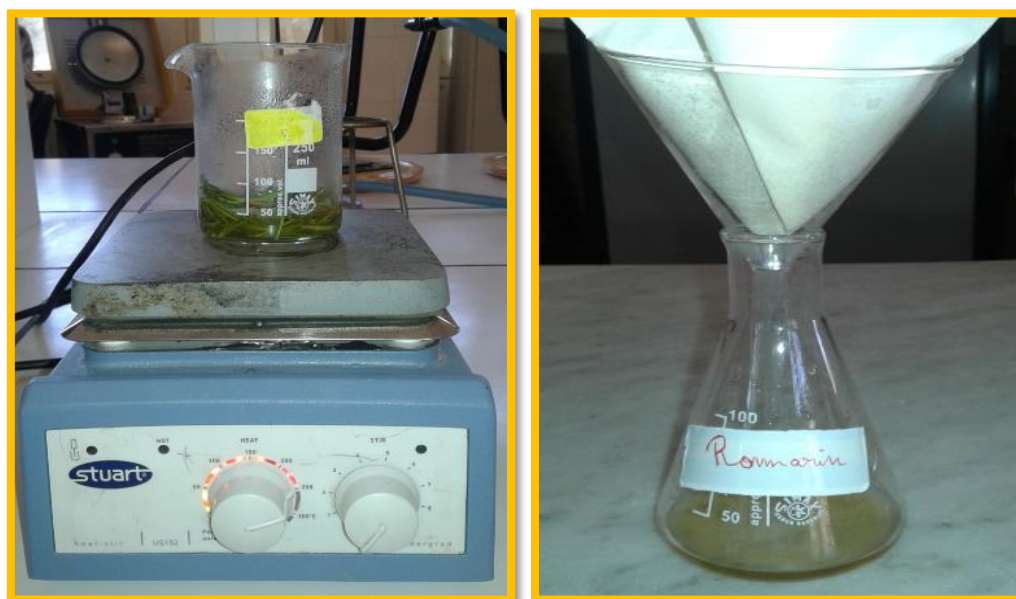


Figure 13 : Préparation de l'extrait aqueux de *Rosmarinus officinalis*.

III.4. Déroulement du test CAM

Au 8^{ème} jour de l'incubation, les fenêtres ont été réouvertes, puis des carrés de papier filtre (< 10X10mm) stérilisés, imbibés soit dans les solutions/suspensions médicamenteuses (Amoxypen 1g et Daflon 500mg) soit dans la solution de *Rosmarinus officinalis* préparée précédemment ont été déposés directement sur la CAM (Figure 14).

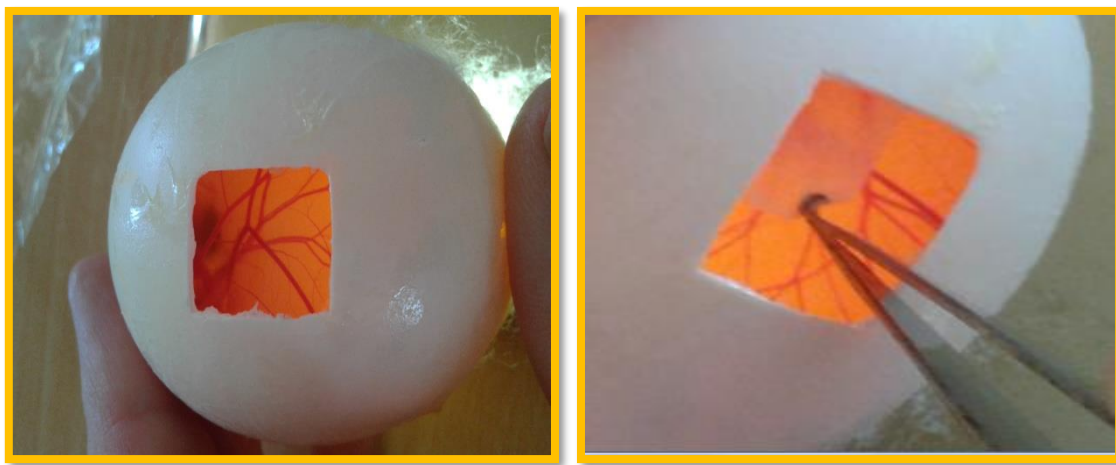


Figure 14 : Application des carrés de papier filtre imbibés dans les solutions préparées sur la CAM.

Ainsi, les œufs préalablement préparés ont été réparti en 4 lots de nombre d'œufs varié. Le premier sera traité par l'Amoxypen, le deuxième par daflon, le troisième par l'extrait aqueux de *Rosmarinus officinalis*, le quatrième représentera les témoins respectifs. Les fenêtres ont été refermées avec du ruban adhésif transparent et les œufs ont été réincubés.

Au 12^{ième} jour, une grande ouverture a été réalisée sur la coquille des œufs. Des images ont été prises pour un traitement informatisé ultérieur.

Des observations sous stéréomicroscope ont été alors effectuées pour évaluer la vascularisation par rapport à un contrôle de vascularisation normale. Puis, on a procédé au comptage des vaisseaux d'ordre secondaire et tertiaire aux alentours de la pastille. Après, on a calculé le taux de réduction (diminution) de la vascularisation pour chaque groupe (Figure 15, 16 et 17), suivant la formule : $TRv(\%) = [(Vc - Vt) / Vc] \times 100$

$$TRv(\%) = [(Vc - Vt) / Vc] \times 100$$

D'où :

TRV : le taux de réduction des vaisseaux sanguins exprimé en pourcentage.

Vc : Nombre des vaisseaux sanguins du deuxième et troisième ordre chez les témoins.

Vt : Nombre des vaisseaux sanguins du deuxième et troisième ordre chez les groupes traités.

Le poids des embryons des différents groupes a été enregistré en vue d'une comparaison ultérieure. Puis, on a calculé le poids relatif des embryons de chaque groupe par la formule suivante :

$$\mathbf{Pr\ (\%) = (Pemb/Pe)\ X\ 100}$$

D'où :

Pr : poids relatif de l'embryon exprimé en pourcentage.

Pemb : poids de l'embryon au moment du sacrifice (J12).

Pe : poids de l'œuf avant de prélever 3ml d'Albumen (J3).

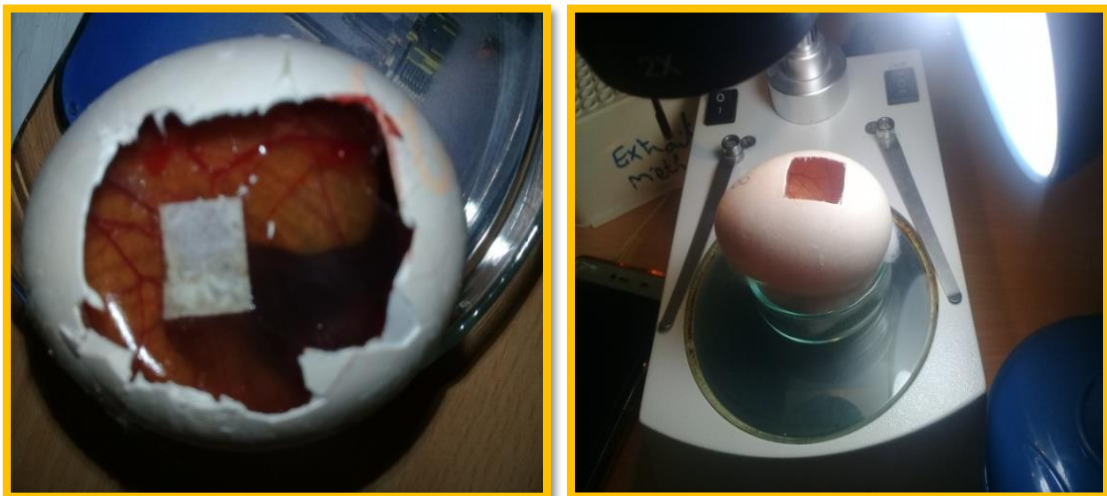


Figure15 : Observations de la CAM sous stéréomicroscope.



Figure 16 : Observations de la CAM traité par le Daflon sous stéréomicroscope.

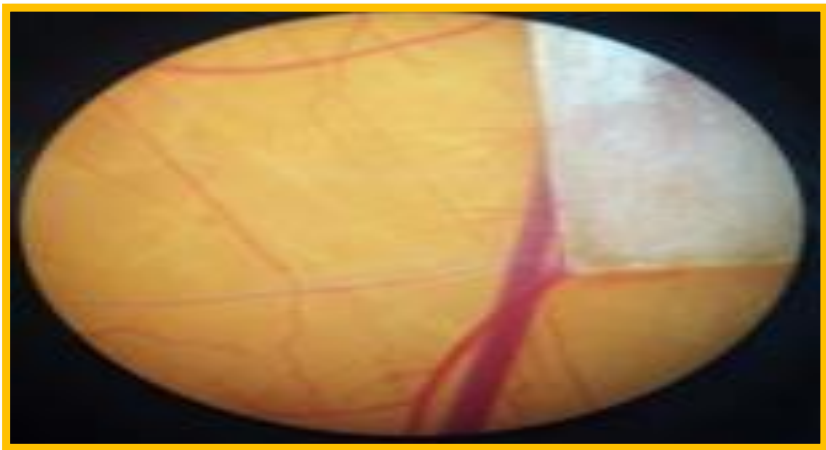


Figure 17 : Observations de la CAM traité par l'extrait aqueux du *Rosmarinus officinalis* sous stéréo microscope.

IV. Analyse statistique :

Toutes les données de cette étude sont exprimées en moyenne $\pm$ Ecart type de la moyenne. La signification statistique a été analysée en utilisant le test-t de Student par la comparaison entre les groupes traités et le témoin. Durant l'analyse statistique on a eu recours au logiciel statistique GraphPad prism7. On note que pour P valeurs inférieures à 0.05, ont été considérées comme significatives.

Résultats et Discussion



IV.1. Evaluation qualitative

Le suivi quotidien, sous stéré microscope, du développement des embryons du poulet, que ce soit *in ovo* ou *ex ovo*, nous a permis de relever les constats suivants :

- 1- Le système circulatoire de l'embryon et de ses annexes deviennent fonctionnels en premier lieu vers le deuxième jour de l'incubation, et que les vaisseaux du sac vitellin apparaissent bien avant ceux de la membrane chorioallantoïdienne (CAM), qui commencent à être visible à partir du quatrième jour d'incubation (Figure 18).

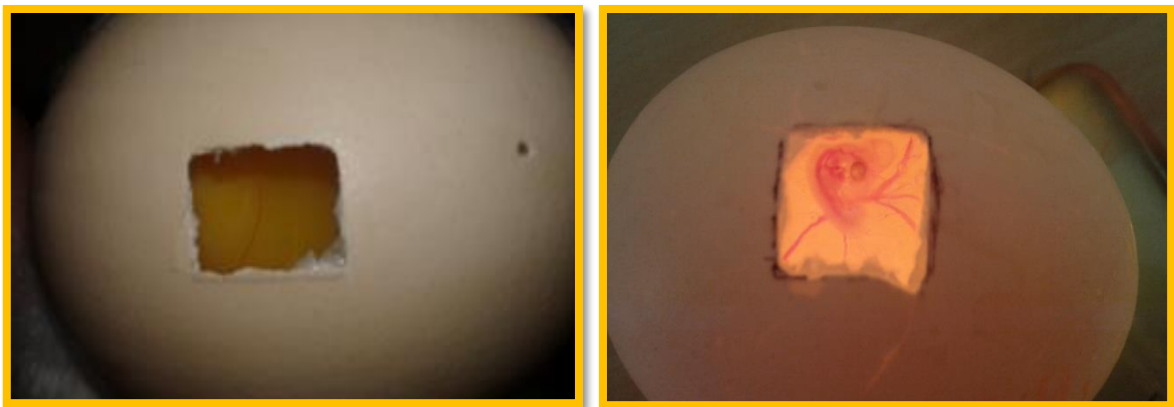


Figure 18 : Révélation des œufs au deuxième et troisième jour d'incubation.

- 2- Le CAM présente une croissance très rapide, au point où, au huitième jour, elle recouvre toute la surface visible sous la fenêtre ouverte sur la coquille. Durant cette période, la croissance des vaisseaux sanguins du CAM prend une allure exponentielle (Figure 19). Au 14^{ème} jour, la CAM enveloppe la totalité de l'embryon et ses annexes (amnios, vésicule vitelline).



Figure 19 : La membrane chorioallantoïdienne.

- 3- La vascularisation de la CAM, se projettent dans le tissu mésenchymateux sous-jacent l'épithélium ectodermique suivant un modèle hiérarchisé. Ceci permet d'observer des aspects en "Y" dites primaires à partir de laquelle diverge des branches secondaires et tertiaires (Figure 20).

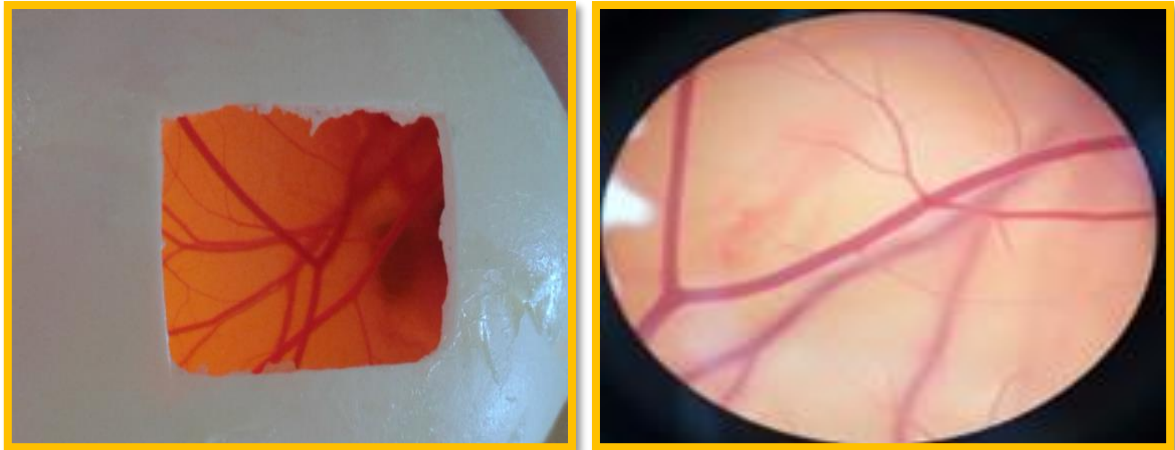


Figure 20 : Vascularisation du CAM en « Y ».

- 4- Il est possible de distinguer trois niveaux d'action des traitements appliqués sur la vascularisation allantoïdienne qu'on classe d'une manière sommaire en :
- Action inhibitrice sélective angiostatique, agissant sur les petits capillaires de l'ordre secondaire et tertiaires du CAM. Cette action peut être suivie d'un rebond angiogénique ou non. Les vaisseaux préexistants du premier ordre ne sont pas affectés, le cas du romarin (Figure 21).

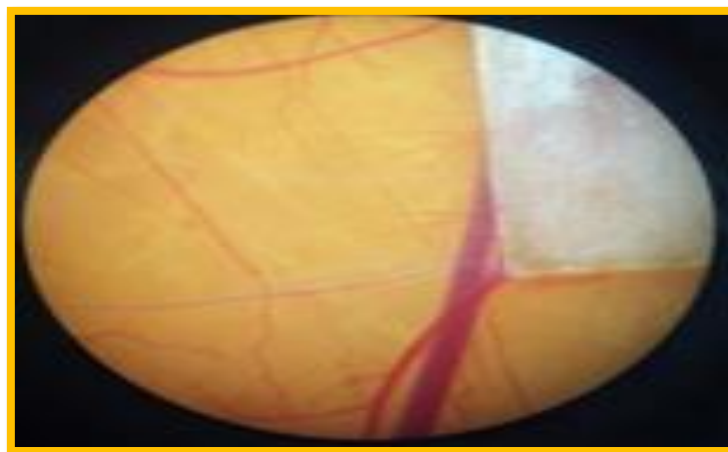


Figure 21 : Effet de l'extrait aqueux de *Rosmarinus officinalis* sur la CAM.

- Effet proangiogénique, en effet une induction très forte des vaisseaux a été enregistrée suite à l'application du Daflon (Figure 22).

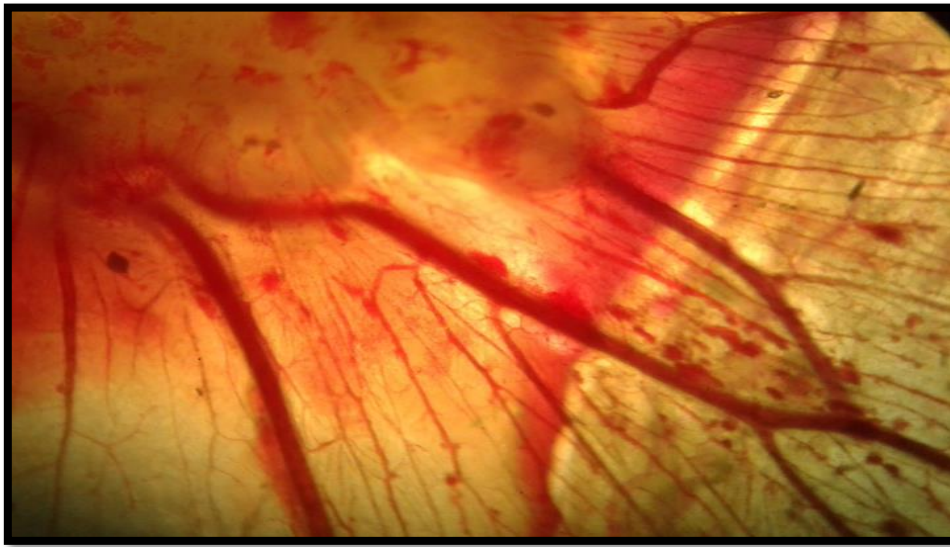


Figure 22 : Effet du Daflon sur la CAM.

- On a pu enregistrer un têt très élevé d'attaques infectieuses (figure23).



Figure 23 : Attaques infectieuses.

- 5- Certains traitements, cas de l'Amoxypen, semblent être inertes vis-à-vis la CAM et sa vascularisation (Figure 24).

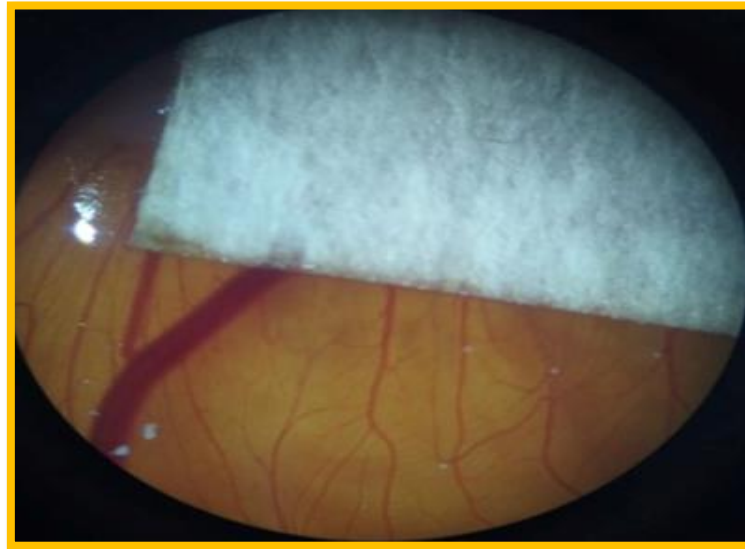


Figure 24 : Effet de l'Amoxypen.

- 6- l'observation macroscopique des embryons nous mènent à croire que tous les traitements appliqués sur la CAM, ne traduit aucune toxicité tératogène.

IV.2.Evaluation quantitative

IV.2.1. Effet des traitements sur le poids de l'embryon

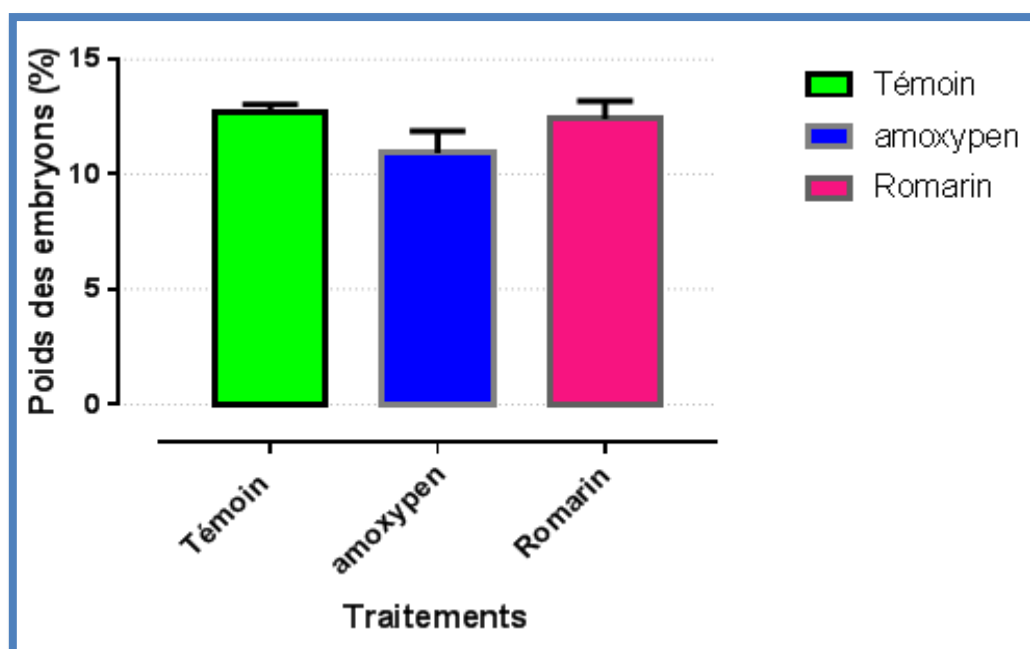


Figure 25 : Effet des traitements sur le poids de l'embryon.

D'après les données présentées sur la figure 25, ils évident que ni l'amoxypen ni le romarin diminuent d'une façon significative le poids relatif des embryons.

En fait, les variations du poids constituent un indicateur robuste reflétant l'état de santé générale des individus, de ce fait il est très utilisé dans les études de toxicité des substances chimiques (Ryan et al., 1991 ; Kuwagata et al., 2019). Lors d'une étude sur l'action angiostatique des agents anticancéreux, Steiner (1992), conclut que l'effet sur le poids des embryons est indépendant de l'inhibition de l'angiogenèse. Au moment où les agents angiostatiques spécifiques tels que l'adriamycine et ses analogues ou l'étoposide n'affichent aucune réduction du poids, les agents chimiothérapeutiques faiblement antiangiogéniques comme la cyclophosphamide et le methotrexate exercent une baisse considérable du poids des embryons.

L'Amoxycilline, est un antibiotique antibactérien de la famille des bêtalactamines du groupe des aminopénicillines (Akhavan, 2019). Une étude a démontré l'absence de variation du poids chez les nouveau nées humains exposé à ce médicament (Almeida et al., 1996).

Le romarin officinal, *Rosmarinus officinalis*, riche en huiles essentielles, ne montre aucune diminution en gain de poids chez les rats adultes (Nusier et al.; 2007). Ces conclusions s'accordent avec les observations que nous avons obtenues sur l'embryon du poulet.

IV.2.2. Action des traitements sur le nombre des capillaires.

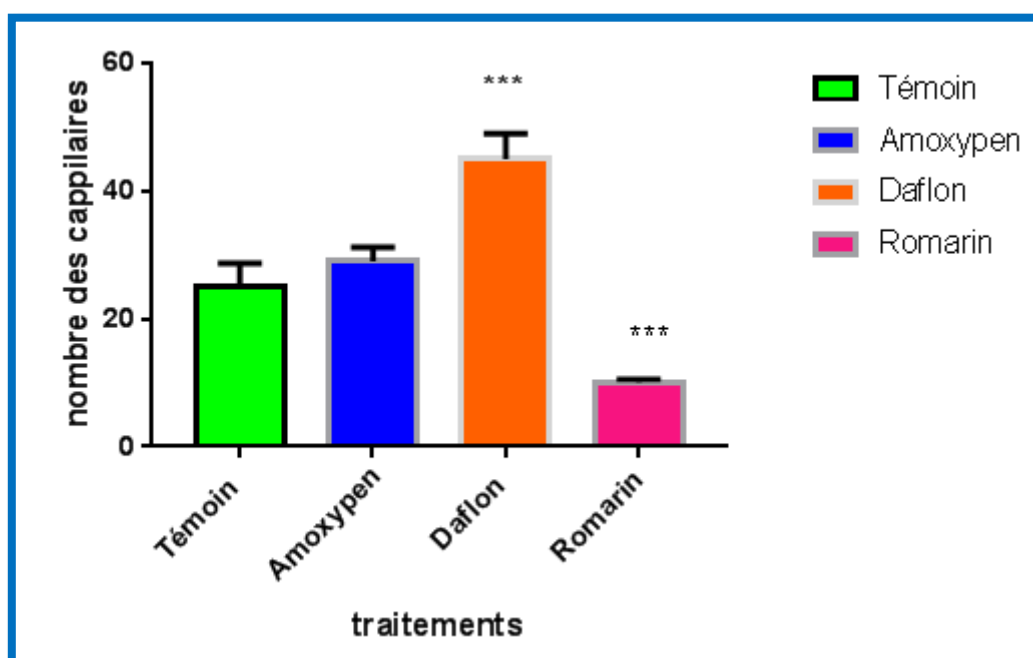


Figure 26 : Action des traitements sur le nombre des capillaires.

On constate que les traitements appliqués (amoxypen, Daflon et Romarin) présentent trois phénomènes différents :

- ✓ Alors que l'Amoxypen semble être inerte par rapport à la vascularisation du CAM.
- ✓ Le Daflon augmente d'une manière très significative ($P < 0.0001$) le nombre des capillaires du second ordre et du troisième comparé au témoin (45 et 25 respectivement). Ceci, contrairement à toutes nos attentes, atteste d'un effet inducteur de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, A ce stade d'étude on considère le Daflon comme une préparation pro-angiogénique.
- ✓ Pour la décoction du romarin officinal, *Rosmarinus officinalis*, à l'opposé du Daflon et de l'Amoxypen, elle provoque une diminution très significative ($P < 0.001$) du nombre des nouveaux vaisseaux sanguins par rapport au témoin (10 et 25 respectivement). Donc, il semble possible de considérer le romarin comme une plante douée de propriétés antiangiogénique.

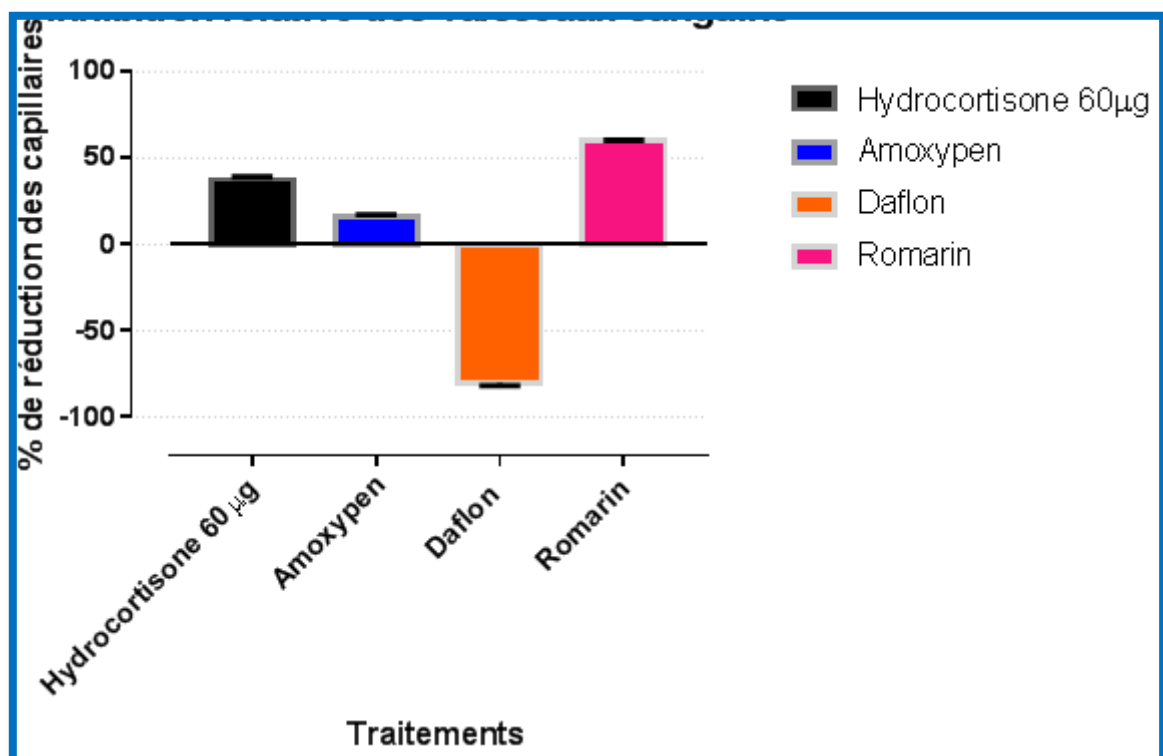


Figure 27 : Inhibition relative des vaisseaux sanguins.

A l'opposé de ce qui a été exposé précédemment, sur cette histogramme (Figure 27), sont rapportées les différentes actions des substances exprimées relativement aux témoins, ceci permet de montrer clairement la nature des effets.

- ✓ L'hydrocortisone pris comme témoin positif, exerce une réduction de l'ordre de 37,5% de la vascularisation du CAM par rapport au témoin.
- ✓ Le Daflon montre une inhibition négative de l'ordre de -80%. Ce qui traduit clairement une évolution dans le sens inverse par rapport à l'hydrocortisone. Donc si ce dernier est un antiangiogénique prouvé, le Daflon semble se comporter comme un pro-angiogénique.
- ✓ Le romarin diminue la vascularisation à des niveaux dépassant l'anti-inflammatoire stéroïdien. Il atteint jusqu'à 60% de blocage.
- ✓ L'Amoxypen se comporte d'une manière proche du témoin.

De ce qui vient d'être décrit, on retient les points suivants :

Cette étude préliminaire vise, principalement, l'évaluation du potentiel antiangiogénique d'un médicament antibiotique, l'Amoxicilline (Amoxypen® 1g) ; un complément alimentaire, le Daflon et une préparation aqueuse de la plante médicinale, *Rosmarinus officinalis*. Elle s'inscrit dans la logique de la réorientation des médicaments actuellement en utilisation clinique ou reprofilage. Aussi, dans le cadre d'un screening préliminaire en vue de la recherche de nouvelles molécules.

Le modèle expérimental choisi pour mener ce travail consiste en les vaisseaux de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) de l'embryon du poulet. Ceci est utilisé couramment dans l'étude *in vivo* de l'angiogenèse et de l'anti-angiogenèse vue la simplicité, le coût modeste et la reproductibilité des résultats (Ribatti, et *al.*, 2001).

Nos résultats, bien que préliminaires, ont permis d'une part, des observations concourant avec ce qui est déjà établie, ainsi, une étude sur le carnosol et l'acide Carnosique, deux composés majeurs du romarin a montré leur rôle antiangiogénique (López-Jiménez, 2013). D'autre part, alors que des travaux précédant avançaient un effet antiangiogénique du flavonoïde hespéridine, un composant du daflon (Gacche, 2015), nous avons relevé une puissante induction des vaisseaux capillaires. En effet, les flavonoïdes de ce produit jouent un rôle vasoprotecteur (Nardarajah, 2014), il est possible qu'ils soient impliqués dans l'induction proangiogénique.

Nous avons relevé l'absence de quelconque effet de l'antibiotique Amoxicilline. D'après nos consultations, c'est la première fois que cet antibiotique soit testé pour son interférence avec les capillaires du CAM.

Enfin, ce travail reste incomplet et des remarques sur des incohérences du dispositif expérimental méritent d'être soulignées. Entre autres, la taille des groupes reste excessivement réduite ce qui influence sur la qualité des analyses statistiques et par la suite sur les conclusions en tirées. En fait, dans des travaux précédents les chercheurs ont eu recours à plus de 600 œufs pour arriver à des résultats convaincants (Knighton, et *al.*, 1977).

Conclusion et perspectives



Conclusion et perspectives

L'objectif de notre travail était d'explorer, *in vivo*, l'effet inhibiteur de l'amoxypen (Amoxiciline®, 1g), Daflon (500g) ainsi que l'effet de l'extrait aqueux des tiges et des feuilles de la plante *Rosmarinus officinalis* vis-à-vis la néovascularisation de la membrane chorioallantoïdienne (CAM). Bien que préliminaire, les résultats obtenus suggèrent des effets pro-angiogénique du Daflon et antiangiogénique du romarin.

De cette étude, il ressort que la plante *Rosmarinus officinalis* L. douée de propriétés antiangiogéniques pourrait constituer une source de biomolécules prometteuse dans la pharmacothérapie antiangiogéniques anticancéreuse, de même que pour le traitement de toutes pathologies liées à la vascularisation anormale (psoriasis, rétinopathie diabétique,...). D'autre part le Daflon pourrait figurer parmi l'arsenal thérapeutique qui vise à consolider la vascularisation, tel est le cas de l'angiogénèse thérapeutique lors des accidents vasculaires cérébraux, l'infarctus du myocarde, le pied diabétique ainsi que la cicatrisation des plaies.

Des recherches plus approfondies sur d'autres modèles permettront d'élucider les mécanismes à l'origine de ces constatations et peuvent ouvrir la voie à des essais cliniques dédiés. Donc, on propose de :

- Revérifier les données recueillies sur des échantillons plus larges.
- Recourir à des modèles expérimentaux plus performants, culture cellulaire, Matrigèle, modèle murin,...
- Elargir la liste des médicaments à tester : aspirine, ...
- Tester des molécules pures au lieu d'utiliser des produits formulés pour éviter toutes interférences.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

-A-

- **Abdel-Rahman O., ElHalawani H et Fouad M. (2016).** Risk of endocrine complications in cancer patients treated with immune check point inhibitors: a meta-analysis. *Future Oncology*. **12** (3): 413-425.
- **Abel E., Angel J., Kiguchi K et DiGiovanni J. (2009).** Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications. *Nature protocols*, **4** (9): 1350.
- **Adamis A. P. et Miller J. W. (1994).** "Increased Vascular Endothelial Growth Factor Levels in the Vitreous of Eyes With Proliferative Diabetic Retinopathy." *American Journal of Ophthalmology*, **118** (4): 445-450.
- **Akhavan B. et Vijhani P. (2019).** Amoxicillin. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
- **Albregues J., Meneguzzi G. (2014).** L'invasion des cellules tumorales- Quand les fibroblastes s'en mêlent. *médecine/sciences* **30** (4): 391-397.
- **Almeida L., Schmauch A. et Bergström S. (1996).** A randomised study on the impact of peroral amoxicillin in women with prelabour rupture of membranes preterm. *Gynecologic and obstetric investigation*, **41** (2):82-84.
- **Ames B.N., Gold L.S. (1997).** Environmental pollution, pesticides and the prevention of cancer: misconceptions. *FASEB J*, **11** (10) :41-52.
- **Azzi S., et Gavard J. (2014).** Vaisseaux sanguins et tumeurs ou l'art du dialogue. *médecine/sciences*, **30** (4) : 408-414.

-B-

- **Bacac., Marina., Stamenkovic., Ivan. (2008).** Metastatic cancer cell. *Annu. Rev. pathmechdis. Mech. Dis*, (3): 221-247.
- **Baeriswy I., Christofori G. (2009).**The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*, (19): 329-37.
- **Balkwill F et Coussens L. M. (2004).** Cancer: an inflammatory link. *Nature*, **431** (7007): 405.
- **Bennis Y.,Guillet B., Christophe Curti et Pascale Pisano. (2010).** Intérêts thérapeutiques des médicaments antiangiogéniques disponibles en cancérologie. *Thérapie*, **65** (2): 95-105.
- **Bensimon J. (2012).** Le switch angiogénique ou comment réveiller les cellules tumorales dormantes. *médecine/sciences*, **28** (12) : 1069-1071.
- **Bièche I. (2004).** Molecular and cancer, Immuno-analyse and biologie spécialisée (19):13-22.
- **Bielenberg D. R et Zetter B.R. (2015).** The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis. *Cancer Journal*, **21** (4): 267-273.
- **Bishop J. M. (1991).** Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, (64): 235-48.
- **Braunstein S., Karpishev K et Pola C. (2007).** A hypoxiacontrolled cap-dependent to cap-independent translation switch in breast cancer. *Mol Cell*, (28): 501-12.
- **Buache É et M.-C. Rio. (2014).** "Le stroma tumoral-Un terreau fertile pour la cellule cancéreuse." *médecine/sciences* **30** (4): 385-390.

- **Calmels B. (2004).** Immunologie et cancer. 1re partie : réponse immunitaire antitumorale.
- **Cao Y. (2014).** "Angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases." *Chemical immunology and allergy*, (99): 170-179.
- **Carmeliet P et Jain R. K. (2011).** Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, (473): 298-307.
- **Castan A. (2014).** Inhibition de l'angiogenèse tumorale : criblage d'une chimiothèque et caractérisation d'un nouveau composé agissant sur la voie de signalisation Ras-ERK. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble. Français.
- **Cézé N., Lecomte T., Watier H. (2009)** Anticorps monoclonaux Thérapeutiques et ciblage vasculaire. *medecine/sciences*, (25): 1099-104.
- **Cheeseman K., Certad G., Jonathan B., Weitzman. (2016).** Parasites et cancer : existe-t-il un lien ? *médecine/sciences*, (32) :867-73. Neuro-oncogenesis: an update EMC-Neurologie, (1) : 75–89.
- **Christophe Chantrain., Yves., DeClerck A. (2002).** Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. *medecine/sciences*, (18):565-75.
- **Chiu W., Baker M.L., Almo S.C. (2006).** Structural biology of cellular machines. *Trends Cell Biol* (16): 144-50.
- **Chung A.S., Lee J., Ferrara N. (2010).** Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat Rev Cancer*, (10): 505-514.
- **Conway E. M., Collen D. (2001).** Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular research*, **49** (3): 507-521.
- **Copyright American Cancer Society. (2016).** Last Medical Review: 12/08/2015.

-D-

- **Detrait E., Etchevers H.C. (2005).** Vascularisation de la tête et du cou au cours du développement. *J. Neuroradiol*, (32) : 147-156.

-E-

- **El Mesbahia O., Tournigandb C., Benbrahimc Z. (2011).**Toxicité cardiovasculaire des thérapies antiangiogéniques. *La Revue de médecine interne*, (32) : 369–372.

-F-

- **Faure S. (2015).** Thérapies ciblées anticancéreuses (1/2). *Actualités pharmaceutiques*, **54** (546) : 57-61.
- **Ferrara N et Kerbel R. S. (2005).**Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, **438** (7070): 967.
- **Fidler I.J. (2003).** The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, (3): 453-8.
- **Folkman J., Cole P. (1966).** "Tumor behavior in isolated perfused organs: in vitro growth and metastases of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment." *Annals of Surgery*, **164** (3): 491-502.
- **Folkman J. (1971).** "Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications." *New England Journal of Medicine*, **285** (21): 1182-1186.
- **Folkman J. (1972).** "Angiogenesis in Psoriasis: Therapeutic Implications." *Journal of Investigative Dermatology*, **59** (1): 40-43.

- **Folkman J. (1974).** Tumor Angiogenesis: Role in Regulation of Tumor Growth1 A2 - Hay, Elizabeth D. Macromolecules Regulating Growth and Development. T. J. King and J. Papaconstantinou, Academic Press: 43-52.
- **Folkman J et Haudenschild C. (1982).** Angiogenesis in Vitro: Implications for Tumor Biology. *Pathobiology of the Endothelial Cell*, Academic Press: 79-93.
- **Folkman J. (1985).** Tumor Angiogenesis. Advances in Cancer Research. K. George and W. Sidney, Academic Press, **(43)**: 175-203.
- **Folkman J. (1995).** Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med*, **333** (17): 57-63.
- **Folkman J. (2001).** "Angiogenesis-dependent diseases." *Seminars in Oncology*, 28(6): 536-542.
- **Folkman J. (2002).** "Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis." *Seminars in Oncology*, **29**(6, Supplement 16): 15-18.
- **Folkman J., Kalluri R. (2004).** Cancer without disease. *Nature*, 427: 787.
- **Fridman W. H et Sautès-Fridman C. (2014).** Le microenvironnement tumoral-Matrice nourricière, champ de bataille et cible thérapeutique des cancers. *médecine/sciences*, **30**(4): 359-365.

-G-

- **Gacche R ., N Meshram R., J Shegokar H., Gond D ., S Kamble S et Dhabadge V. (2015).** Flavonoids as a scaffold for development of novel anti-angiogenic agents: An experimental and computational enquiry. *Archives of biochemistry and biophysics*, (577): 35-48.
- **Gargett C et P. A. W. Rogers (2001).** "Human endometrial angiogenesis." *Reproduction*, **121**(2): 181-186.

- **Garrido-Urbani S., Jaquet V et Imhof, B. A. (2014).** ERO, NADPH oxydases et vascularisation des tumeurs. *médecine/sciences*, 30(4) : 415-421.
- **Gavard J., Patel V et Gutkind S. (2008).** Angiopoietin-1 prevents VEGF-induced endothelial permeability by sequestering Src through mDia. *Dev Cell*, (14): 25-36.
- **Gothié,E., et Pouysségur J. (2002).** HIF-1: régulateur central de l'hypoxie. *médecine/sciences*, 18(1) : 70-78.
- **Gu1 Y., Lu1 H., Boisson-Vidal C., Li H., Bousquet G., ZH Z. (2011).** Atomic resolution cryo electron microscopy of macromolecular complexes. *Adv Protein Chem Struct Biol* , (82) : 1-35.

-H-

- **Hanahan D., et Robert A (2011).** "Hallmarks of Cancer: *The Next Generation*." *Cell*, 144(5): 646-674.
- **Halimi1 JM., Azizi M., Bobrie G., Bouché O., Deray G., Guetz G., Lecomte T., Levy J., Hanahan D., et Robert, A (2011).** Hallmarks of Cancer: *The Next Generation*. *Cell*, 144(5): 646-674.
- **Hellstrom M., Phng K., Hofmann (2007).** Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*, 445: 776-80.
- **Hilberg F., Roth J., Krssak M., Kautschitsch S., Sommergruber W., Tontsch-Grunt U., Garin-Chesa P., Bader G., Zoephel A., Quant J., Heckel A., Rettig J., (2008).** BIBF 1120: triple angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy. *Cancer Res*, (68): 4774-4782.
- **Huang L., A. M. Xu. (2014).** "Cancer-associated fibroblasts in digestive tumors." *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(47): 17804-17818.

- **Hubert., Sandra., Abastado., Jean-Pierre (2014).** Les étapes précoces du processus métastatique. *médecine/sciences*. **30** (4): 378-384.
- **Hynes O., et A. Naba (2012).** "Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions." *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **4**(1): a004903.

-I-

- **Isenberg S., Martin-Manso (2009).** "Regulation of nitric oxide signalling by thrombospondin 1: implications for anti-angiogenic therapies." *Nature Reviews Cancer*, **9**(3): 182.

-J-

- **Janin Mélanie., Di Benedetto. (2016).** La résistance aux traitements Antiangiogéniques Une actualité clinique et scientifique *médecine/sciences*, (32) : 370-7.
- **Jayr Christian et Jane M. (2010).** Mécanismes de l'oncogénèse et principe des traitements anticancéreux: implication pour l'anesthésiste. *Le Praticien en anesthésie réanimation*, **14** (6):347-366.

-K-

- **Kahn A. (1987).** Mutation, régulation, prédisposition et correction... la génétique" *super-star*".
- **Kalluri R (2003).** Angiogenesis: Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer* **3**(6): 422.

- **Kuwagata M., Sakai. (2019).** Historical control data on developmental toxicity studies in rats. *Congenital anomalies* 59(4): 125-131.
- **Kerbel R., Folkman J. (2002).** Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2: 727-739.

-ℒ-

- **Larger E. (2003).** Hyperglycémie et angiogenèse *medecine/sciences*;19: 840-6.
- **Lattafi,R (2016)** le traitement du cancer par les anti-angiogéniques : leur effets sur la cavité orale. *Santé Mag* 5-201, 40, 1941, 47.
- **Laurent, V., L Nieto (2014).** Tissu adipeux et cancer-Une association à haut risque. *médecine/sciences* 30(4): 398-404.
- **Lecler., Sylvain., Takakura., Yoshitate et Meyreuis Patrick. (2005).** Properties of a three-dimensional photonic jet. *Optics letters*, 30 19:2641-2643.
- **Leclers D., Durand K., Dutour A., Barrière G., Monteil, J., Rigaud, M., & Sturtz, F. (2005).** Vaisseaux lymphatiques et cancer. *médecine/sciences*, 21(10), 839-848
- **Libert, C., L. Dejager, et al. (2010).** The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. *Nature Reviews Immunology* 10(8): 594.
- **Lemoine, A. Y., S. Ledoux, et al. (2013).** Adipose tissue angiogenesis in obesity. *Thrombosis and haemostasis* 110(4): 661-668
- **López-Jiménez, A., García-Caballero, M., Medina, M. Á., & Quesada, A. R. (2013).** Anti-angiogenic properties of and carnosic acid, two major dietary compounds from rosemary. *European journal of nutrition*, 52(1), 85-95.

-M-

- **Martins-Green, M., Boudreau N., Bisse M.J. (1994).**Inflammation is responsible for the development of wound-induced tumors in chickens infected with Rous sarcoma virus. *Cancer Res* **54**: 4334–41
- **Martin P. M., and Ouafik L. H. (2007).**Interactions entre les cellules tumorales et le microenvironnement tissulaire : « Quand le dialogue remplace le monologue ». Cancer du sein avancé: 29es Journées de la Société Française de Sénologie et Pathologie Mammaire (SFSPM) Avignon, 14–16 novembre 2007. D. Serin and G. de Rauglaudre. *Paris, Springer Paris*: 97-123.
- **Marone G., G. Varricchi et al. (2016).** Mast cells and basophils in inflammatory and tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *European journal of pharmacology* **778**: 146-151.
- **Maxime brulebois. (2014).** L'avastin, son fonctionnement, sa place dans l'arsenal thérapeutique oncologique, son apport dans la prise en charge des patients et son importance économique.
- **Mazzone M., Dettori D., Leite d'Oliveira R., et al. (2009).** Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization. *Cell*; **136** : 839-51.
- **Méjean A.T., Lebret. (2008)** genèse de la métastase La cascade métastatique :
- angiogenèse et nouveaux concepts. Progrès en Urologie, Suppl. 7, S156–S166. 159,163,169P -**Michael S. (2000).** Angiogenèse et morphogenèse de l'arbre vasculaire : de la biologie cellulaire à la clinique. *médecine/sciences* ; **16** : 1378-86.
- **Molnar-Stanciu, D., Guimas V., Bensalem, A., Thiery-Vuillemin A. (2012).**Thérapie ciblée et cancer du sein : état de l'art Pathologie Biologie 60 (2012) 254–263

- **Monge M., Z. A. Massy et al. (2011).** Cellules progénitrices endothéliales, de quoi parle-t-on ? *Néphrologie & Thérapeutique* 7(7): 521-525.
- **Mongiat M., E. Andreuzzi et al. (2016).** Extracellular Matrix, a Hard Player in Angiogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 17(11): 1822.
- **Monier R. M., Tubiana. (2008).** Cancérogenèse. Accroissement des connaissances et évolution des concepts. *Oncologie*, 10: 319–347.
- **Mourad J.J., Nochy, D., Oudard S., Rieu P., Sahali D., (2008)** Effets vasculaires et rénaux des médicaments anti-angiogéniques : recommandations françaises pour la pratique (SN, SFHTA, APNET, FFCD) *Néphrologie & Thérapeutique* 4, 602—615.
- **Munagala R., Aqil F., Gupta R. C. (2011).** Promising molecular targeted therapies in breast cancer. *Indian J Pharmacol.* 43 : 236-245.

-N-

- **Nardarajah D. (2014).** Hesperidin-A short Review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 7(1), 8.
- **Neidhart, M., R. Wehrli, et al. (1999).** "Synovial fluid CD146 (MUC18), a marker for synovial membrane angiogenesis in rheumatoid arthritis." *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 42(4): 622-630.
- **Neve A., F. P. Cantatore et al. (2014).** "Extracellular matrix modulates angiogenesis in physiological and pathological conditions." *BioMed research international* 2014: 756078.
- **Nusier M. K., Bataineh H. N., Daradkah H. M. (2007).** Adverse effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on reproductive function in adult male rats. *Experimental biology and medicine*, 232(6), 809-813.

-P-

- **Patenaude A., J. Parker et al. (2010).** "Involvement of endothelial progenitor cells in tumor vascularization." *Microvascular Research* **79**(3): 217-223.
- **Pepper M. S. (1997).** Manipulating angiogenesis : from basic science to the bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; **17**: 605-19.
- **Pezzella F., A. L. Harris et al. (2015).** Blood vessels and cancer much more than just angiogenesis. *Cell Death Discovery* **1**: 15064.
- **Phng L.K., Stanchi F et Gerhardt H. (2013).** Filopodia are dispensable for endothelial tip cell guidance. *Development*; **140**: 4031-40.
- **Plendl J. (2000).** Angiogenesis and vascular regression in the ovary. *Anatomia Histologia Embryologia* **29** (5): 257-266.
- **Provot S. (2014).** Contrôle de la croissance et de la dissémination tumorales par le microenvironnement-Certitudes et hypothèses émergentes. *médecine/sciences*, **30**(4): 366-371.
- **Puyraimond-Zemmour, D., Vignot, S. (2013).** Le métabolisme de la cellule tumorale : l'effet Warburg *Oncologie* **15**: 435–440.

-R-

- **Riabov V., A. Gudima et al. (2014).** Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Frontiers in physiology* **5**: 75.
- **Ribatti, Humana , Press ,Totowa. (2013).** In vivo angiogenic activity of erythropoietin. *Tissue-Protective Cytokines*: 227-235.
- **Ricard N., Simons M. (2015).** When it is better to regress: dynamics of vascular pruning. *PLoS Biol*; **13**: e1002148..

- **Risau W. et I. Flamme (1995).** Vasculogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **11**(1): 73-91.
- **Robert C. (2005).** Biologie moléculaire des cancers thérapies antiangiogéniques *La Revue de médecine interne* **32** ; 369–372.
- **Rougier P. et Mitry E. (2009).** Cancers colorectaux avant et après les biothérapies: une révolution dans la prise en charge des patients? *Gastroentérologie Clinique et Biologique* **33**(8-9): 672-680.
- **Ryan L. M., P. J. Catalano et al. (1991).** Relationship between fetal weight and malformation in developmental toxicity studies. *Teratology* **44**(2): 215-223.

-S-

- **Sanson M., Taillibert, S. (2004).** Données générales de neuro-oncogénèse
- **Ségala S. (2012)** .Cancer : les mécanismes biologiques
- **Semenza G. L. (2003).** Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* (3): 721–32.
- **Stéhelin D. (1985).** Les oncogènes cellulaires, clés de la cancérogenèse.
- **Steiner R. (1992).** Angiostatic activity of anticancer agents in the chick embryo chorioallantoic membrane (CHE-CAM) assay. *In Angiogenesis* (pp. 449-454
- **Struhl K. (2007).** Transcriptional noise and the fidelity of initiation by RNA polymerase II. *Nature Structural and Molecular Biology* **14**(2): 103.
- **Suchting S., Freitas C et Eichmann A. (2007).** .L'angiogenèse passé sous contrôle du couple Delta-Notch M/S 4, (23), avril.

- **Suchting S., Freitas C., le Noble F., et al. (2007).** The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl AcadSci USA*; 104: 3225-30.
- **Sugimoto M., A. Cutler et al. (2013).** Inhibition of EGF Signaling Protects the Diabetic Retina from Insulin-Induced Vascular Leakage. *The American Journal of Pathology* 183(3): 987-995.
- **Szekanecz Z., Besenyei T., Paragh G et Koch A. E. (2010).** Actualités sur l'angiogenèse synoviale. *Revue du rhumatisme*, 77(1), 14-20.

-T-

- **Tamarat R. et Silvestre J.S.** Néogenèse vasculaire physiologique et pathologique, *Revue Algérie des Sciences Biologiques*.
- **Tammela, Tuomas, Zarkada, Georgia, Wallgard, Elisabet. (2008).** Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature*. Vol. 454. no 7204 : 656.
- **Treps L. et Gavard J. (2015).** L'angiogenèse tumorale-Quand l'arbre de vie tourne mal. *médecine/sciences*, 31 (11): 989-995.
- **Tubiana M. (2008).** Généralités sur la cancérogenèse *C. R. Biologies* (331) : 114–125

-V-

- **Vandenbunder B. et M.-F. Poupon. (1995).** Découverte d'un nouvel inhibiteur de l'angiogenèse, l'angiostatine. Implications pour la biologie et la thérapie des métastases.
- **Vrijssen K. R., J. A. Maring et al. (2016).** Exosomes from Cardiomyocyte Progenitor Cells and Mesenchymal Stem Cells Stimulate Angiogenesis Via EMMPRIN. *AdvHealthc Mater*.

-W-

- **Wacker A. et Gerhardt H. (2011).** Endothelial development taking shape. *Current opinion in cell biology*, **23** (6): 676-685.

-Z-

- **Zhao W.-N., S.-Q. Xu et al. (2016).** Endothelial progenitor cells from human fetal aorta cure diabetic foot in a rat model. *Metabolism*, **65** (12): 1755-1767.

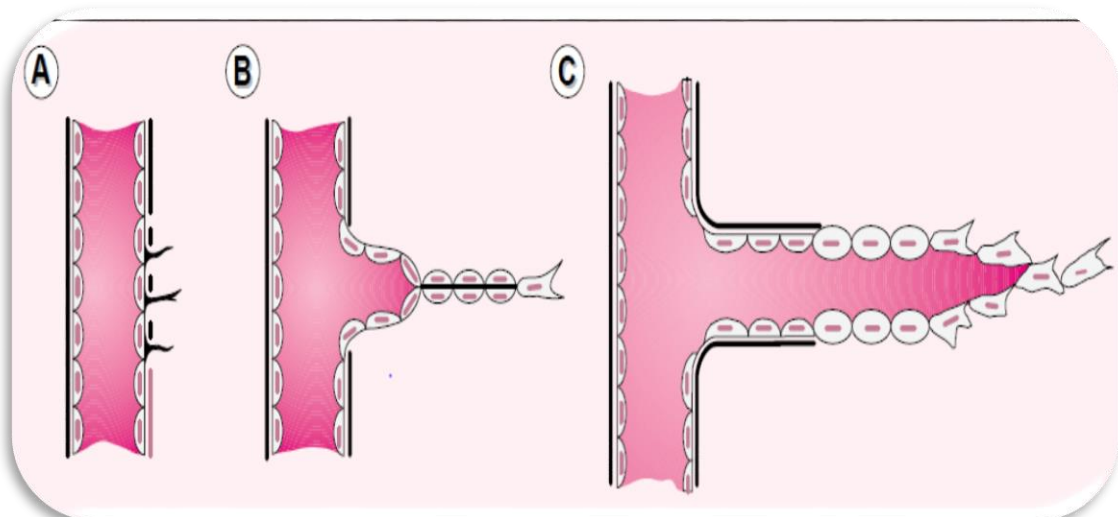
Annexes

Annexe 01. Représentation schématique de l'angiogenèse.

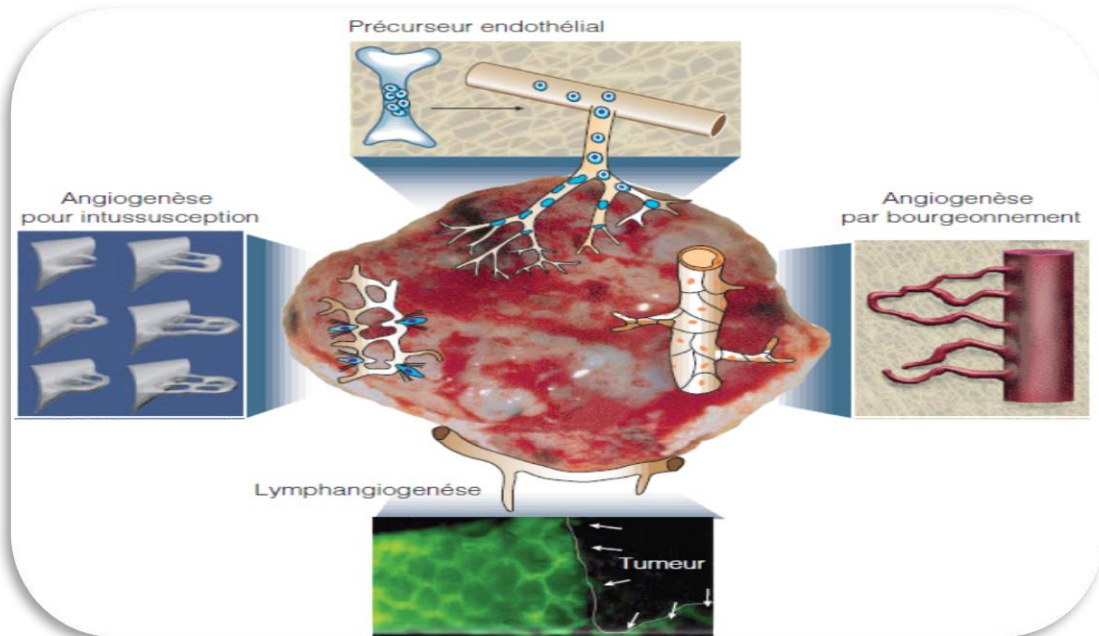
A. Activation des cellules endothéliales suite à l'induction d'un régulateur positif (ou à la perte d'un régulateur négatif, ou aux deux). L'activation est suivie par la dégradation de la lame basale et par l'extension de fins processus cytoplasmiques en direction de la source du stimulus.

B. Migration des cellules endothéliales dans la matrice et formation d'un bourgeon capillaire. Prolifération des cellules situées en arrière du front migratoire. Formation d'une lumière dans la région proximale du bourgeon capillaire.

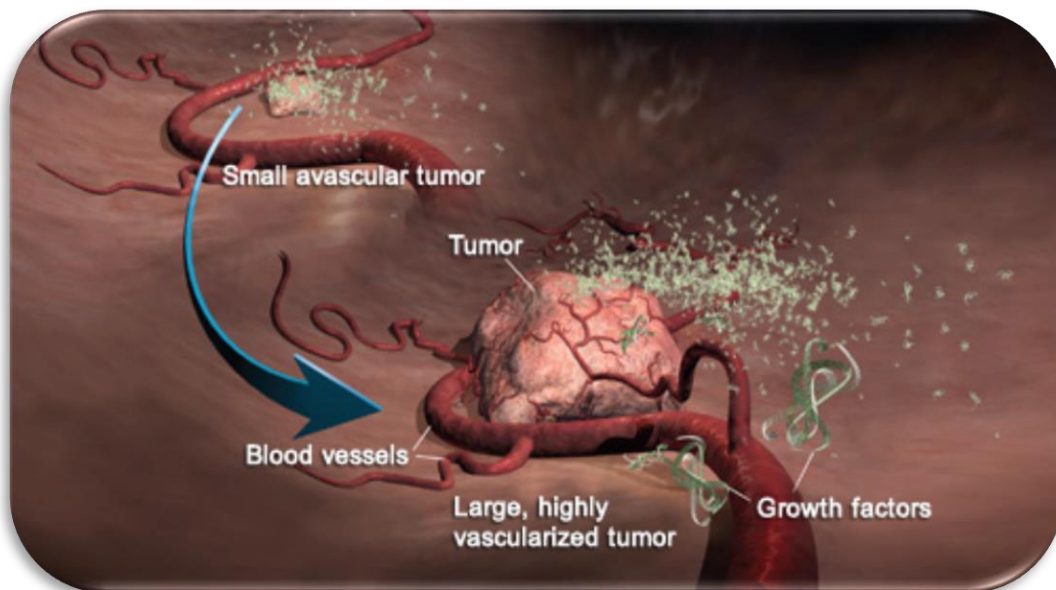
C. Maturation du bourgeon capillaire, impliquant la reconstitution de la lame basale. L'anastomose avec un bourgeon contigu va engendrer un réseau capillaire fonctionnel (Michael S, 2000).



Annexe 02. Mécanisme de l'angiogenèse tumorale. La croissance des vaisseaux tumoraux se fait: par bourgeonnement à partir du réseau vasculaire de l'hôte, par intussusception à partir du tissu interstitiel, par précurseurs endothéliaux dérivés de la moelle. Les vaisseaux lymphatiques autour de la tumeur drainent le tissu interstitiel. (Méjean et Lebre, 2008).



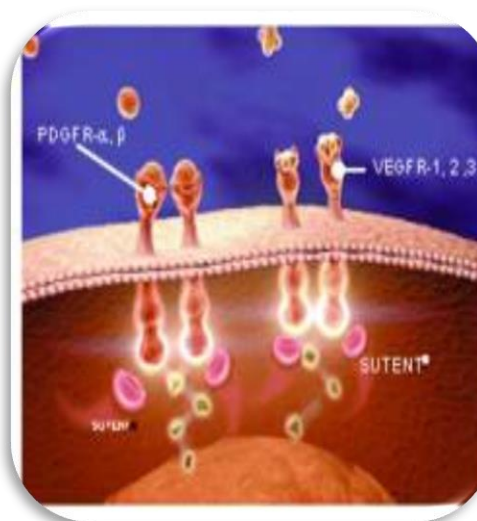
Annexes 03. L'angiogenèse est une caractéristique de la tumeur (Hanahan et al, 2000)



Annexe 04. Effet de Bevacizumab



Annexe 05. Effet de Sunitinib.



Annexe 06. Amoxypen® 1g.



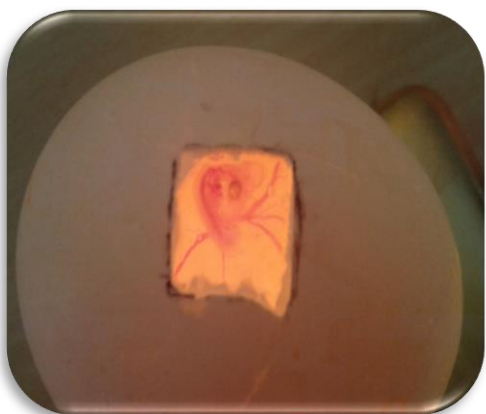
Annexe 07. Daflon® 500mg.



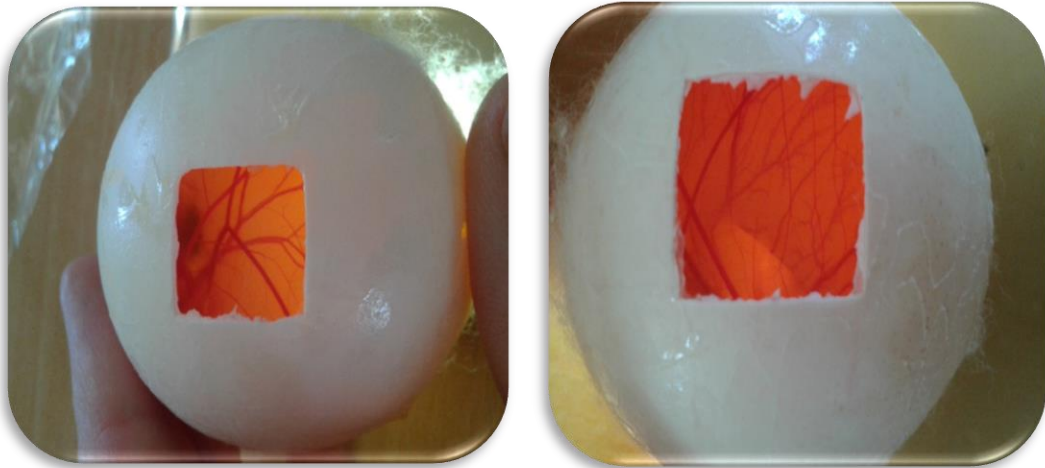
Annexe 08. Préparation et incubation des œufs.



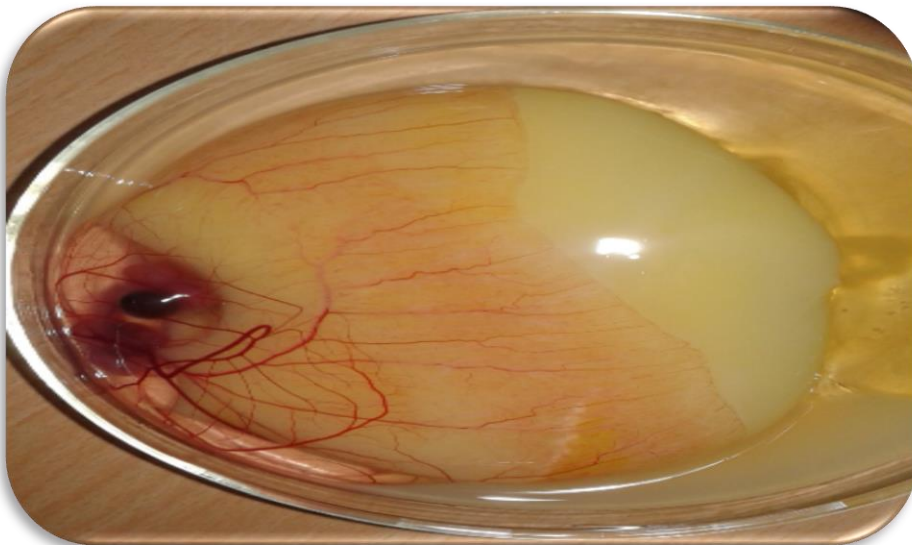
Annexe 09. Œuf après trois jours d'incubation



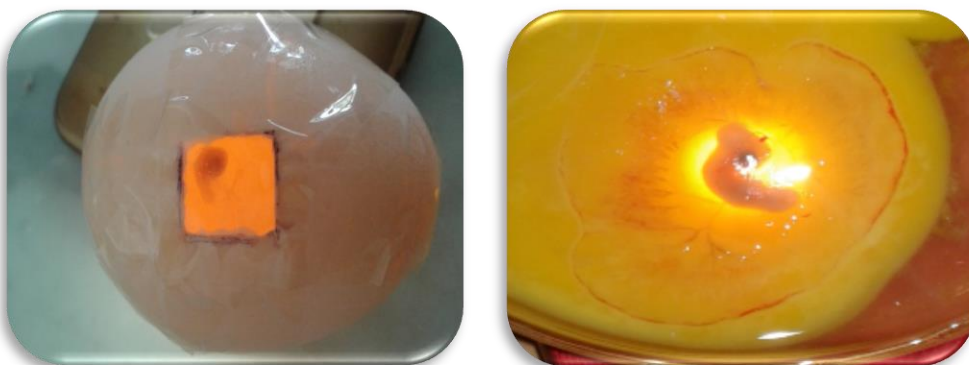
Annexe10 . Œufs aux huitième jour



Annexe 11. La mombrane chorioallantoïdienne



Annexe 12. Attaques infectieuses.



Annexe 13. Stérilisation du papier filtre.

