

N° Ref : .....



## 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 anti-angiogénique des médicaments

**Présenté par :**

- BENAZIZA Rokia.
- DRADA Nouria.

**Devant le jury composé de :**

- |                                                |       |               |
|------------------------------------------------|-------|---------------|
| - Président : M <sup>r</sup> ZOUAGHI Mohammed. | M.A.A | C.U.A.B. Mila |
| - Examinatrice : M <sup>me</sup> AMARI Salima. | M.A.A | C.U.A.B. Mila |
| - Promoteur : M <sup>r</sup> MOUSSAOUI Bilal.  | M.A.A | C.U.A.B. Mila |

**Année Universitaire: 2018/2019**

## *Remerciement*

*« La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage »*

*En premier lieu, nous tenons à remercier notre DIEU, notre créateur pour nous avoir donné la force, la santé et le courage pour accomplir ce travail.*

*Nous désirons exprimer notre profonde et vive reconnaissance à notre promoteur, Mr **Moussaoui Bilal** .*

*Pour tous ses: orientations scientifiques, sa compétence à notre disposition, ses précieux conseils et pour son suivi régulier à l'élaboration de Ce travail.*

*Aux membres du jury M<sup>me</sup> : **Amari Safima** l'examinatrice, le président de jury Mr : **Zouaghi Mohammed** Nous les remercions d'avoir accepté d'examiner et juger ce modeste travail.*

*Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à tous nos professeurs qui ont contribué à notre formation.*

*Nous ajoutons des remerciements groupés à tous les techniciens des laboratoires de notre centre.*

*En fin, juste un petit mot pour vous dire\***Merci**\**

# *Dédicace*

*Je dédie ce travail :*

*A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour*

*A mes chères Parents, ma mère **Rébiha** et mon père **Abd elmadjid***

*Pour tous leurs amours, leurs sacrifices, leurs tendresses et leur soutien  
tout le long de mes études.*

*A mes chères frères : **Hicham** et **Abd elrahmane**.*

*A mes chères sœurs : **Ahlem** et **Maroua**.*

*A mon chère binome : **Rokia**.*

*A mon très cher marié : **Zineddine**.*

*Pour tout leur amour, leur soutien, leur encouragement, leur assistance et  
leur présence dans ma vie.*

*A toute ma famille.*

*A tous mes ami (e)s.*

***Drada Nouria***

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*A mes chères parents : ma mère **Elbahdja** et mon père **Essaid**.*

*Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour Dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.*

*A celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de ce projet :*

*Mes chères frères **Ali** et **Nabil**.*

*Mes chères sœurs : **Fatima, Dalila, Nadia, Teldja et Samia** .*

*A toute ma famille, et mes amis.*

*A mon binôme **Randa** et toute la famille **Drada**.*

*Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce*

*Projet soit possible, je vous dis merci.*

***Benaziza Rokja***

## **Liste des abréviations**

|       |                                                 |
|-------|-------------------------------------------------|
| ADN   | Acide désoxyribonucléique                       |
| Ang-1 | Angiopoïétine-1                                 |
| Ang-2 | Angiopoïétine-2                                 |
| BRCA1 | Breast cancer 1                                 |
| CAM   | Membrane chorioallantoïdienne                   |
| CIRC  | Centre international de recherche sur le cancer |
| c-KIT | Stem-cell Growth Factor Receptor                |
| CDK   | Cylin dependent kinase                          |
| DAPK  | Death associated protein kinase                 |
| DLL4  | Delta-like ligand 4                             |
| EAq   | Extrait aqueux                                  |
| EGCG  | Epigallocatechine                               |
| EGF   | Epidermal growth factor                         |
| EGFR  | Epithelial Growth Factor Receptor               |
| ER    | Estrogen receptor                               |
| ERO   | Espèce réactive de l'oxygène                    |
| FAC   | Fibroblastes associés aux carcinomes            |
| FDA   | Food and Drug Administration                    |
| FGF   | Fibroblast growth factor                        |
| FLT-3 | Fms-related tyrosine kinase-3                   |

|               |                                                    |
|---------------|----------------------------------------------------|
| HIF- $\alpha$ | Hypoxia inducible factor- $\alpha$                 |
| HIF- $\beta$  | Hypoxia inducible factor- $\beta$                  |
| HIF-1         | Hypoxia inducible factor-1                         |
| HIF-2         | Hypoxia inducible factor-2                         |
| HRE           | Élément de réponse à l'hypoxie                     |
| HTA           | Hypertension artérielle                            |
| IFNA2b        | Interféron alpha 2b                                |
| IGFBP1        | Insulin-like growth factor binding protein 1       |
| IL2           | Interleukine-2                                     |
| IL8           | Interleukine-8                                     |
| ITK           | Inhibiteur tyrosine kinase                         |
| MEC           | Matrice extra-cellulaire                           |
| MMP           | Métalloprotéinases matricielles                    |
| NK            | Natural killer                                     |
| ORL           | Oto-rhino-laryngologique                           |
| PDGF          | Platelet-derived growth factor                     |
| PDGF-BB       | Platelet-derived growth factor-BB                  |
| PDGFR         | Platelet-derived growth factor receptor            |
| PFKFB3        | Phosphofructokinase-2/fructose-2, 6-bisphosphatase |
| PHD2          | Prolyl-hydroxylase domain 2                        |
| PI3-K         | Phosphatidylinositol 3-kinase                      |

|                |                                               |
|----------------|-----------------------------------------------|
| PTEN           | Phosphatase and tensin homologue              |
| pVHL           | Von Hippel-Lindau Pvh                         |
| Rb             | Retinoblastoma                                |
| SMP            | Syndrome main-piedSMP                         |
| TEM            | Transition épithélio-mésenchymateuse          |
| TGF- $\beta$   | Transforming growth factor- $\beta$           |
| TGF- $\beta$ 1 | Transforming growth factor $\beta$ 1          |
| TIMP-3         | Tissue inhibitor of metalloproteinase-3       |
| TNF- $\alpha$  | Tumor necrosis factor- $\alpha$               |
| TS             | Gènes suppresseurs de tumeur                  |
| UV             | Ultra-violet                                  |
| VEGF           | Vascular endothelial growth factor            |
| VEGF-C         | Vascular endothelial growth factor-C          |
| VEGF-D         | Vascular endothelial growth factor-D          |
| VEGF-R         | Vascular endothelial growth factor receptor   |
| VEGFR-1        | Vascular endothelial growth factor receptor-1 |
| VEGFR-2        | Vascular endothelial growth factor receptor-2 |
| VEGFR-3        | Vascular endothelial growth factor receptor-3 |

## Liste des figures

|                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 1</b> : Les six caractéristiques d'un cancer .....                                                                                  | 4  |
| <b>Figure 2</b> : Différentes étapes du cancer .....                                                                                          | 9  |
| <b>Figure 3</b> : Mécanismes moléculaires de sélection de la cellule de front. ....                                                           | 16 |
| <b>Figure 4</b> : Etapes de l'angiogenèse normale.....                                                                                        | 17 |
| <b>Figure 5</b> : Aberrations du réseau vasculaire tumoral.....                                                                               | 19 |
| <b>Figure 6</b> : Mécanisme impliqué dans l'accumulation d'HIF.....                                                                           | 20 |
| <b>Figure 7</b> : Vérification de la fécondité des œufs. ....                                                                                 | 27 |
| <b>Figure 8</b> : (A) Désinfection des œufs avec l'éthanol à 70%. (B) Incubation des œufs à l'incubateur.....                                 | 28 |
| <b>Figure 9</b> : Préparation et révélation de la membrane chorioallantoïdienne.....                                                          | 28 |
| <b>Figure 10</b> : Préparation du cefazal® (céfazolin 1g). ....                                                                               | 29 |
| <b>Figure 11</b> : Préparation du daflon® 500mg.....                                                                                          | 30 |
| <b>Figure 12</b> : Protocole de préparation de l'extrait aqueux du <i>Camellia sinensis</i> L. ....                                           | 30 |
| <b>Figure 13</b> : Différentes étapes de préparation de l'extrait aqueux du <i>Camellia sinensis</i> L.....                                   | 31 |
| <b>Figure 14</b> : Pastilles en papier filtre imbibées dans les solutions préparées. A droite, le dépôt des pastilles carrées sur la CAM..... | 31 |
| <b>Figure 15</b> : (A) Poids de l'œuf avant de prélever 3ml d'Albumen (J3). (B) Poids de l'embryon au moment du sacrifice (J12). ....         | 33 |
| <b>Figure 16</b> : Observations de la CAM sous stéréomicroscope. ....                                                                         | 33 |
| <b>Figure 17</b> : Observations de la CAM traité par le daflon sous stéréomicroscope. ....                                                    | 33 |
| <b>Figure 18</b> : Observations de la CAM traité par l'extrait aqueux du <i>Camellia sinensis</i> . sous stéréomicroscope.....                | 34 |
| <b>Figure 19</b> : Œuf au troisième jour de l'incubation. ....                                                                                | 35 |
| <b>Figure 20</b> : Œuf au 14 <sup>ème</sup> jour de l'incubation.....                                                                         | 35 |
| <b>Figure 21</b> : Observation des vaisseaux primaire, secondaire et tertiaire sous stéréomicroscope. ....                                    | 36 |
| <b>Figure 22</b> : Observation des vaisseaux suite à l'application du thé sous stéréomicroscope. ....                                         | 36 |
| <b>Figure 23</b> : Observation des vaisseaux suite à l'application du Daflon sous stéréomicroscope. ....                                      | 37 |

|                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 24 :</b> Œuf infecté.....                                                                                      | 37 |
| <b>Figure 25 :</b> Observation des vaisseaux suite à l'application du Céfazoline sous stéréomicroscope.<br>.....         | 38 |
| <b>Figure 26 :</b> Histogramme représente l'effet des traitements sur le poids de l'embryon. ....                        | 38 |
| <b>Figure 27 :</b> Histogramme représente l'action des traitements sur le nombre des capillaires. ....                   | 40 |
| <b>Figure 28 :</b> Histogramme représente l'effet des traitements sur l'inhibition relative des vaisseaux sanguins. .... | 41 |

## **Liste des tableaux**

**Tableau 1:** Agents favorisant le développement d'un cancer .....5

**Tableau 2:** Gènes suppresseurs de tumeurs communément inactivés lors de la tumorigenèse. ....7

# **Sommaire**

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction**

## **Premier partie : Synthèse bibliographie**

### **Chapitre I : La biologie du cancer**

|                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| 1. La biologie du cancer .....                                 | 3  |
| 1.1. Définition du cancer .....                                | 3  |
| 1.2. Caractéristiques des cellules cancéreuses .....           | 3  |
| 1.3. Causes du cancer .....                                    | 4  |
| 1.4. Gènes du cancer et Les gènes suppresseurs de tumeur ..... | 6  |
| 1.5. Processus de cancérogenèse .....                          | 7  |
| 1.5.1. Initiation .....                                        | 8  |
| 1.5.2. Promotion .....                                         | 8  |
| 1.5.3. Progression .....                                       | 8  |
| 1.6. Traitement du cancer .....                                | 9  |
| 1.6.1. Les traitements conventionnels : .....                  | 9  |
| 1.6.1.1. La chirurgie .....                                    | 9  |
| 1.6.1.2. La radiothérapie .....                                | 9  |
| 1.6.1.3. La chimiothérapie .....                               | 10 |
| 1.6.1.4. L'hormonothérapie .....                               | 10 |
| 1.6.2. Traitements ciblées : .....                             | 10 |
| 1.6.2.1. L'immunothérapie .....                                | 10 |
| 1.6.2.2. L'antiangiogénique .....                              | 10 |

## Chapitre II : Angiogenèse

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. La genèse vasculaire : Vasculogenèse, Angiogenèse et Lymphangiogenèse ..... | 12 |
| 1.1. Vasculogenèse .....                                                       | 12 |
| 1.2. Angiogenèse .....                                                         | 12 |
| 1.2.1. Cellules endothéliales.....                                             | 13 |
| 1.3. Lymphangiogenèse .....                                                    | 13 |
| 2. Angiogenèses physiologique et pathologique.....                             | 14 |
| 3. Mécanisme cellulaire et moléculaire de l'angiogenèse physiologique .....    | 14 |
| 3.1. Premier temps : la sélection.....                                         | 15 |
| 3.2. Deuxième temps : la migration.....                                        | 16 |
| 3.3. Troisième temps : la fusion et la formation de la lumière .....           | 16 |
| 3.4. Quatrième temps : la maturation et le flux sanguin.....                   | 17 |
| 4. Angiogenèse tumorale .....                                                  | 18 |
| 4.1. Structure et caractéristiques des vaisseaux tumoraux.....                 | 18 |
| 4.2. Evénements moléculaires à l'origine de l'angiogenèse tumorale : .....     | 19 |
| 4.2.1. Rôle de l'hypoxie .....                                                 | 19 |
| 4.2.2. Le microenvironnement tumoral .....                                     | 21 |
| 4.3. Rôle de l'angiogenèse dans la progression tumorale et la métastase .....  | 22 |
| 4.4. La thérapie antiangiogénique.....                                         | 23 |
| 4.4.1. Inhibiteurs des VEGF et récepteurs des VEGF.....                        | 23 |
| 4.4.1.1. Le bevacizumab (AvastinR) .....                                       | 23 |
| 4.4.2. Inhibiteurs de tyrosine kinase des VEGF-Rs .....                        | 24 |
| 4.4.2.1. Le sunitinib (SutentR) .....                                          | 24 |
| 4.4.2.2. Le sorafenib (NexavarR) .....                                         | 24 |
| 4.4.2.3. Le pazopanib .....                                                    | 24 |
| 4.4.3. Inhibiteurs de protéases .....                                          | 24 |
| 4.5. Les avantages de la thérapie antiangiogénique.....                        | 25 |

|        |                                                                      |    |
|--------|----------------------------------------------------------------------|----|
| 4.6.   | Toxicité des antiangiogéniques .....                                 | 25 |
| 4.6.1. | Atteintes cardio-vasculaires .....                                   | 25 |
| 4.6.2. | Atteintes rénales .....                                              | 25 |
| 4.6.3. | Toxicité cutanéomuqueuse .....                                       | 25 |
| 4.6.4. | Autres effets secondaire .....                                       | 26 |
| 5.     | Reprofilage des médicaments dans la thérapie anti-angiogénique ..... | 26 |

## **Deuxième partie : Etude expérimentale**

### **Chapitre III : Matériel et méthodes**

|        |                                                                                                                |    |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.     | Matériels et méthodes .....                                                                                    | 27 |
| 1.1.   | Collecte des œufs et incubation .....                                                                          | 27 |
| 1.2.   | Préparation des membranes chorioallantoïdienne .....                                                           | 28 |
| 1.3.   | Préparation des substances testées.....                                                                        | 29 |
| 1.3.1. | Origine de la Cefazal® 1g et préparation de solution :.....                                                    | 29 |
| 1.3.2. | Origine du daflon® 500mg et préparation de la suspension :.....                                                | 29 |
| 1.3.3. | Origine du matériel biologique (Végétal) et préparation de l'extrait aqueux<br><i>Camellia sinensis</i> . .... | 30 |
| 1.4.   | Déroulement du test CAM.....                                                                                   | 31 |
| 1.5.   | Analyse statistique .....                                                                                      | 34 |

### **Chapitre IV : Résultats et discussions**

|     |                               |    |
|-----|-------------------------------|----|
| 1.. | Evaluation qualitative.....   | 35 |
| 2.  | Evaluation quantitative ..... | 38 |

## **Conclusion**

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

## **Résumé**

# *Introduction*

## **Introduction**

En 2018, le centre international de recherche sur le cancer(CIRC) a estimé qu'il y avait 18,1 millions de nouveaux cas et 9,6 millions de décès. Un homme sur cinq et une femme sur six dans le monde développeront un cancer au cours de leur vie, et un homme sur huit et une femme sur 11 meurent de cette maladie. 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 (OMS, 2018).

Une tumeur ne peut croître sans son approvisionnement en oxygène et nutriments (Bennis et *al.*,2010). La disponibilité d'oxygène et de nutriments fournis par la vascularisation est cruciale pour les cellules normales et néoplasiques, cependant, la nature des vaisseaux intra-tumoraux et leur relation avec les cellules néoplasiques a été débattue pour des siècles (Pezzella et *al.*, 2015).

C'est en 1971 que les travaux de J. Folkman ont mis en exergue pour la première fois l'importance de l'angiogenèse dans la physiopathologie des tumeurs solides (Folkman, 1971). Ce processus multifactoriel fait intervenir de nombreuses molécules synthétisées par la cellule tumorale ou son microenvironnement, certaines pro-angiogéniques : (Endostatine, angiostatine...), d'autres anti-angiogéniques : VEGF, FGF....(Cézé et *al.*, 2009).

Les traitements anticancéreux incluent, suivant le type et le degré d'évolution, la chirurgie (Chodez et *al.*, 2015), l'irradiation (Vordermark, 2016) et/ou la chimiothérapie (Young and Burchenal, 1971; Parimi and Chi, 2016). D'autres approches médicamenteuses sont en cours de développement ou viennent d'être intégrées à l'arsenal thérapeutique tel que l'immunothérapie (Grossman et *al.*, 2016; Hellmann et *al.*, 2016) et les inhibiteurs de l'angiogenèse (Cao, 2004; Jary et *al.*, 2015; Giacomini et *al.*, 2016).

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 *al.*, 2015). D'autre part sorafenib (Davoudi et *al.*, 2014; Ferrari et *al.*, 2015), le sunitinib (Porta et *al.*, 2014), le pazopanib (McLachlan and 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).

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

Par ailleurs, le développement de novo de médicaments est un processus long et coûteux. De plus en plus, les firmes pharmaceutiques 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 est dit reprofilage ou réorientation (Mucke, 2015; Heckman et *al.*, 2016; Ishida et *al.*, 2016). Ainsi, l'Artesunate (ART) un anti-malarial bien connu réputé faiblement toxique, montre une action anticancéreuse sélective et anti-angiogénique contre le carcinome cellulaire du rein (Jeong et *al.*, 2015).

La céfazoline est un agent antibactérien indiquée chez les adultes et chez les enfants âgés de plus d'un mois dans le traitement des infections suivantes, causées par des micro-organismes sensibles à la céfazoline : Infections de la peau et des tissus mous, infections des os et des articulations, prophylaxie des infections périopératoires (ANSM, 2015). D'après la documentation disponible, n'a fait l'objet d'aucune étude visant son interaction avec l'angiogenèse.

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 ovo*, du potentiel inhibiteur de la néovascularisation d'un médicament antibiotique, le Cefazol, et d'un complément alimentaire le daflon® largement utilisé pour le traitement des dysfonctionnements du système vasculaire veineux.

# Première Partie : Synthèse bibliographique

# *Chapitre I*

## *La biologie du cancer*

## 1. La biologie du cancer

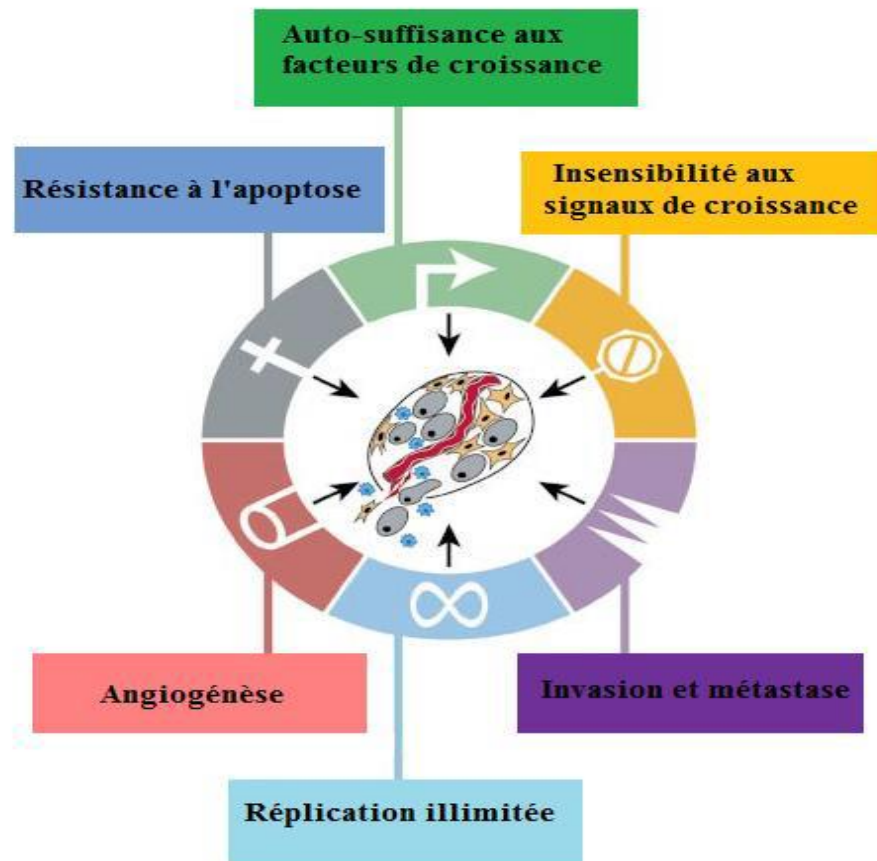
### 1.1. Définition du cancer

Le cancer est une maladie multifactorielle qui correspond à une multiplication anarchique et incontrôlée de certaines cellules normales de l'organisme. Ces cellules échappent aux mécanismes normaux de différenciation, de régulation de leur multiplication et résistent à la mort cellulaire programmée. Pour qu'un cancer se développe, la cellule doit accumuler plusieurs mutations dans son génome (Macdonald et *al.*, 2003). Ces mutations sont le résultat d'agressions par des facteurs environnementaux, ou d'origine naturelle lors de la division cellulaire. Le cancer se développe à partir d'une seule cellule saine en un ensemble de cellules cancéreuses (Macdonald et *al.*, 2003; Mareel & Leroy, 2003).

Les tumeurs ne sont pas toutes cancéreuses, celles qui restent dans un endroit et n'affectent pas les tissus environnants sont dites bénignes (Belk & Borden, 2004). Les tumeurs qui envahissent les tissus environnants sont dites malignes, ces tumeurs ont la capacité de migrer à travers les tissus adjacents et éventuellement coloniser des sites distants. Ce processus appelé métastase et est mal compris au niveau moléculaire. Il reste essentiellement intraitable et est la principale cause de décès par cancer (Hesketh, 2013).

### 1.2. Caractéristiques des cellules cancéreuses

Il existe environ 200 types de tumeurs pouvant affecter tous les tissus du corps. Ces affections résultent toutes de l'acquisition et du maintien par les cellules de caractères anormaux : l'indépendance vis-à-vis des signaux de croissance, la résistance aux signaux inhibant la croissance, la résistance à la mort cellulaire programmée ou apoptose, la capacité à susciter la genèse de vaisseaux sanguins (angiogenèse), la capacité à former des métastases (Bouyahya et *al.*, 2018), et une multiplication cellulaire à l'infini (immortalité) (Maudelonde, 2004). Ces propriétés, chacune plus ou moins développée selon les tumeurs, résultent de l'altération de l'expression ou de la séquence d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs (Bouyahya et *al.*, 2018) (Figure 1).



**Figure 1 :** Les six caractéristiques d'un cancer (Hanahan & Weinberg, 2000)

### 1.3. Causes du cancer

La plupart des cancers sont causés par des agents environnementaux (Tableau 1) appelés carcinogènes. Les cancérogènes comprennent des agents physiques (rayons ultraviolets solaires, rayonnements ionisants), 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 (Stéhelin, 1985), et des agents biologiques (virus, bactéries, parasites) (Fridman & Sautès-Fridman, 2014). 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).

**Tableau 1:** Agents favorisant le développement d'un cancer (Fridman & Sautès-Fridman, 2014)

| <b>Agents</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <b>Cancers associés</b>                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><u>Agents physiques</u></b><br><br>Rayons X<br>UV<br>Radionucléides                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Leucémies, lymphomes<br>Mélanomes<br>Cancer de la thyroïde<br>Leucémies                                                                                                                                                                                                                     |
| <b><u>Agents chimiques</u></b><br><br>Tabac<br><br>Amiante<br><br>Goudron<br>Sciure de bois                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Cancer du poumon<br>Cancer ORL<br>Cancer de la vessie<br><br>Mésothéliome<br>Cancer du poumon<br><br>Cancer des testicules<br>Cancer des fosses nasales                                                                                                                                     |
| <b><u>Agents biologiques</u></b><br><br><b>Virus</b><br>Virus de papillome humain<br><br>Virus des hépatites B et C<br>Virus d'Epstein-Barr<br>Virus Herpès humain de type 8<br>Virus lymphotrope T<br>humain de type 1<br><br><b>Bactéries</b><br><i>Helicobacter pylori</i><br><i>Salmonella typhi</i><br><i>Chlamydia pneumoniae</i><br><br><b>Parasites</b><br><i>Schistosoma haematobium</i><br><i>Opisthorchis viverrini</i> | Cancer du col de l'utérus<br>Cancer ORL<br>Cancer du rectum, cancer du vagin<br>Cancer du foie<br>Lymphomes<br>Sarcome de Kaposi<br>Lymphomes T<br><br>Cancer de l'estomac<br>Cancer de la vésicule biliaire<br>Cancer du poumon<br><br>Cancer de la vessie<br>Cholangiocarcinome hépatique |

### **1.4. Gènes du cancer et Les gènes suppresseurs de tumeur**

Le génome des cellules eucaryotes renferme deux familles de gènes, les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs (anti oncogènes), capables de provoquer ou d'accélérer le processus cancéreux lorsque leur structure ou la régulation de leur expression est altérée. Ces gènes se distinguent par leur mécanisme d'action (Bieche, 2004). Les protooncogènes sont des gènes cellulaires normaux qui, quand activés de manière inappropriée par des événements génétiques (mutations, amplifications, fusions ou délétions) ou épigénétiques (méthylations) modifient la régulation de la croissance et différenciation (Couch, 1996), et ont un effet positif sur la prolifération cellulaire (gain de fonction) (Bieche, 2004).

Les gènes suppresseurs de tumeur (TS) normalement inhibent le cancer en s'opposant à l'action des oncogènes, favorisant la réparation de l'ADN muté, ou le contrôle du développement des tissus (Junien, 1986). Quand les gènes TS sont mutés, ces protections sont perdues. Donc l'inactivation des (TS) conduit à l'accumulation d'erreurs dans le génome pouvant amener à l'apparition d'une cellule cancéreuse (Bunz, 2008). De nombreux éléments de preuve suggèrent qu'une simple modification ne suffit pas à convertir une cellule saine à une cellule maligne, et il semble évident que le développement de la maladie néoplasique implique perte ou inactivation de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs, ou activation de proto-oncogènes, ou leur combinaison (Couch, 1996).

Par l'intermédiaire de leurs produits, oncogènes et gènes suppresseurs contrôlent respectivement, de manière positive et négative, des réactions métaboliques impliquées dans la progression coordonnée du cycle cellulaire. De l'intensité relative de ces deux circuits opposés dépend la décision pour la cellule de rester dans un état quiescent, de s'engager dans le cycle cellulaire, de se différencier ou enfin de mourir (Bieche, 2004) (Tableau 2).

**Tableau 2:** Gènes suppresseurs de tumeurs communément inactivés lors de la tumorigenèse (Deltour et *al.*, 2005).

| Gènes                               | Rôles biologiques                                                                                                                                                                            | Principaux types de cancer associés                                                                            |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Rb</b><br><b>p15 INK4B</b>       | <b><u>Cycle cellulaire</u></b><br>- Inhibition de la transcription dépendante d'E2F<br>- Inhibiteur des CDK 4 et 6                                                                           | - Rétinoblastome, gliome, cancer du côlon<br>- Leucémie, lymphome                                              |
| <b>p53</b><br><b>BRCA1</b>          | <b><u>Maintien de l'intégrité du génome</u></b><br>- Transcription de gènes (cycle cellulaire et apoptose) et réparation de l'ADN<br>- Régulation de la transcription et réparation de l'ADN | - Cancers du poumon, de la prostate, du sein et de l'ovaire<br>- Cancers du sein et de l'ovaire                |
| <b>Caspase 8</b><br><b>DAPK</b>     | <b><u>Apoptose</u></b><br>- Clivage de substrats lors de l'activation des récepteurs de mort<br>- Kinase calcium-dépendante phosphorylant divers substrats                                   | - Médulloblastome, cancers du poumon et du foie<br>- Lymphome, gliome, cancers gastrique et du col de l'utérus |
| <b>E-cadhérine</b><br><b>TIMP-3</b> | <b><u>Migration, invasion</u></b><br>- Interaction cellule/ cellule et matrice extracellulaire<br>- Inhibiteur de métalloprotéases                                                           | - Cancers gastrique, de la thyroïde et du sein<br>- Médulloblastome et cancer du foie                          |
| <b>PTEN</b><br><b>ER</b>            | <b><u>Réponse aux facteurs de croissance</u></b><br>- Inhibition de la voie de la PI3-K<br>- Contrôle de la prolifération                                                                    | - Glioblastome, cancers gastrique, du sein et de la thyroïde<br>- Cancers du sein et de la prostate            |

### 1.5. Processus de cancérogenèse

Le processus de développement néoplasique a été divisé en étapes définies opérationnellement d'initiation, de promotion et de progression, chacune pouvant également comporter plusieurs étapes (Couch, 1996).

### 1.5.1. Initiation

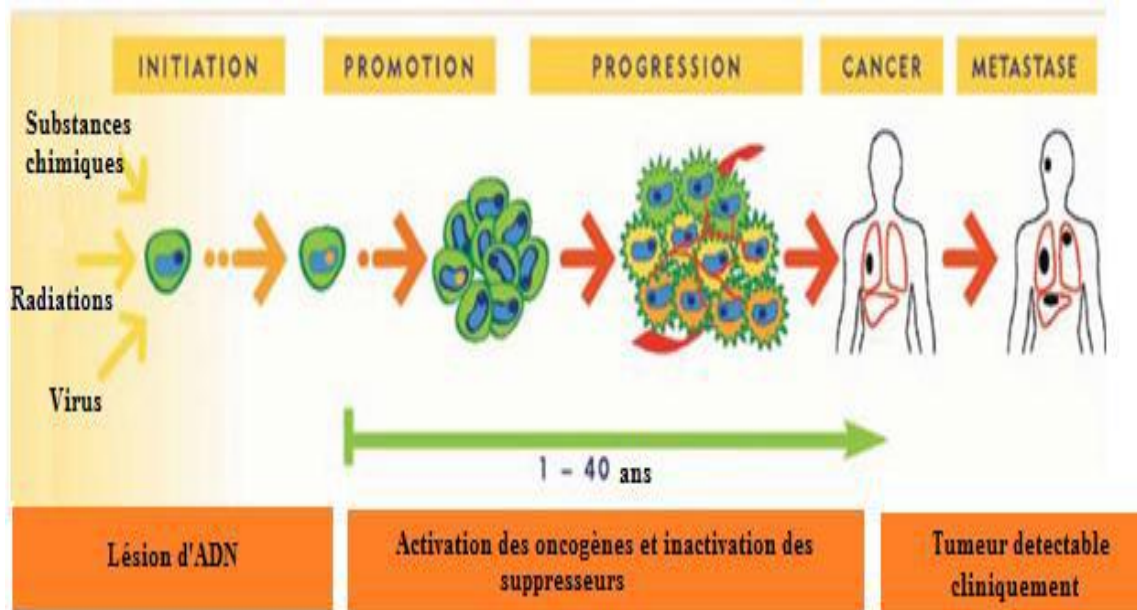
La première étape de la cancérogenèse est le développement des aberrations génétiques dans les potentielles cellules tumorales. Ces aberrations sont principalement des mutations avec les changements réels dans le nucléotide séquence de la cellule (Klopffleisch, 2016). Les altérations de l'ADN peuvent être causées par un génétoxique d'origine endogène (ERO) ou exogène (par exemple les UV solaires). De plus, comme des erreurs peuvent survenir pendant la réplication de l'ADN et la mitose, une stimulation de la prolifération entraîne un accroissement de la fréquence des mutations (Butterworth, 1990) (Figure 2).

### 1.5.2. Promotion

Elle correspond à une exposition prolongée, répétée ou continue, à une substance qui entretient et stabilise la lésion initiée. Cette étape consiste en une prolifération plus ou moins contrôlée des cellules initiées en processus d'acquérir les caractéristiques lui permettant de générer un cancer. Elle résulte d'une cascade d'interactions entre les cytokines et leurs récepteurs, ce qui amène à la perte de l'homéostasie tissulaire et l'émergence de clones cellulaires transformées. Plusieurs agents dits promoteurs de carcinogenèse sont impliqués dans cette étape. La nutrition et les habitudes alimentaires, l'alcoolisme, le tabagisme, les infections les traumatismes répétés et l'âge sont les plus importants (King, 1996) (Figure 2).

### 1.5.3. Progression

Durant l'étape de la progression, la prolifération des cellules tumorales est incontrôlable et le cancer devient cliniquement détectable (plus de  $10^9$  cellules). Cependant, du fait du nombre très important de mitoses, les cellules finissent par acquérir certaines propriétés d'autonomie de croissance, une adaptabilité métabolique et une pharmaco-résistance. Durant la progression, une perte de fonction caractérise les cellules cancéreuses qui deviennent alors incapables d'effectuer leurs fonctions normales au sein d'un tissu. De même, l'instabilité génétique conduit les cellules cancéreuses à l'acquisition de nouvelles propriétés d'indépendance et de nouvelles caractéristiques fonctionnelles (Liotta, 1992) (Figure 2).



**Figure 2:** Différentes étapes du cancer (Béliveau & Gingras, 2007)

## 1.6. Traitement du cancer

L'objectif du traitement du cancer est l'élimination de la tumeur cancéreuse ainsi que la prévention de l'apparition d'autres tumeurs localisées ou métastatiques. D'une façon générale, On distingue plusieurs méthodes de traitements du cancer:

### 1.6.1. Les traitements conventionnels :

#### 1.6.1.1. La chirurgie

La chirurgie a été le premier traitement utilisé pour lutter contre le cancer, notamment pour traiter les petites tumeurs localisées ou les tumeurs solides à développement lent qui représentent 70% des cancers. Elle consiste en l'ablation de la tumeur et est souvent associée à d'autres thérapies telles que la chimiothérapie, la radiothérapie ou l'hormonothérapie. Ce traitement est le seul moyen de traiter les zones peu vascularisées où la chimiothérapie n'accède pas (Pasquet, 2011).

#### 1.6.1.2. La radiothérapie

La radiothérapie est une méthode de traitement qui utilise les rayonnements ionisants. Elle vise à éradiquer localement toute trace de cancer. Elle peut être utilisée seule, ou en association avec la chirurgie, soit en pré-opératoire, mais le plus souvent en postopératoire. La radiothérapie s'applique à la fois sur la tumeur primitive et sur les territoires ganglionnaires.

Comme la chimiothérapie et la chirurgie, la radiothérapie peut être dangereuse en cas de complications. Les effets secondaires dépendent souvent de la zone irradiée et de la dose de radiations appliquée (Meyer et *al.*, 2007).

#### **1.6.1.3. La chimiothérapie**

La chimiothérapie consiste en l'administration de substances chimiques, cytotoxiques pour les cellules souches, dans le but d'arrêter ou de ralentir l'évolution de la multiplication des cellules tumorales, ainsi que pour limiter ou prévenir la formation des métastases. La chimiothérapie est également utilisée pour réduire la taille d'une tumeur trop volumineuse et faciliter ainsi son traitement par la chirurgie (Chabner & Roberts, 2005).

#### **1.6.1.4. L'hormonothérapie**

L'hormonothérapie est souvent utilisée pour traiter plusieurs types de cancers hormono-dépendants, notamment le cancer de la prostate, le cancer du col de l'utérus, le cancer de la thyroïde et le cancer du sein. Elle agit sur la production des hormones responsables de la prolifération des cellules tumorales, soit par prise de médicaments pour la supprimer temporairement, soit par ablation de l'organe sécréteur de l'hormone impliquée. De même, l'action directe ou indirecte sur l'hormone stimulante peut être effective suite à l'utilisation soit des anti-hormones, soit des inhibiteurs de leur synthèse (Bershtein et *al.*, 2004).

### **1.6.2. Traitements ciblés :**

#### **1.6.2.1. L'immunothérapie**

Le principe de l'immunothérapie dans le cancer est de stimuler l'activité du système immunitaire contre les cellules tumorales. Deux cytokines ont l'approbation de la FDA pour une utilisation comme médicaments anticancéreux : interleukine 2 (IL2) et interféron alpha 2b (IFNA2). Les interleukines stimulent la prolifération de sous-ensembles de cellules T et B et les interférons activent particulièrement les macrophages (Hesketh, 2013).

#### **1.6.2.2. L'antiangiogénique**

Un traitement anti-angiogénique n'a pas pour but la destruction des cellules tumorales, il vise essentiellement les cellules endothéliales en empêchant leur division dont le résultat est un état de quiescence vasculaire avec une involution des vaisseaux néoformés. Les composés anti-angiogéniques peuvent agir à plusieurs niveaux : inhibition de la synthèse de facteurs angiogéniques par les cellules tumorales (mode d'action des interférons), inhibition de la liaison des facteurs angiogéniques aux récepteurs présents à la surface des cellules endothéliales, inhibition du signal angiogénique intracellulaire, altération des interactions entre cellules

endothéliales et MEC (matrice extracellulaire) comme l'inhibition de la dégradation de la MEC. (Chabannes et *al.*, 2001).

# *Chapitre II*

## *Angiogenèse*

## 1. La genèse vasculaire : Vasculogenèse, Angiogenèse et Lymphangiogenèse

Au tout début du développement de l'embryon, l'oxygène et les nutriments nécessaires à sa croissance diffusent librement. Puis, au fur et à mesure que les besoins 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). L'angiogenèse processus physiologique existant durant l'embryogenèse en complément de la vasculogenèse ou indépendamment selon les tissus (Sweiki et *al.*, 1992); Chez l'adulte, l'angiogenèse est réactivée de façon transitoire pour répondre à des besoins physiologiques (Ferrara, 2004).

### 1.1. Vasculogenèse

Au cours du développement embryonnaire, la formation du système cardiovasculaire débute par la vasculogenèse, processus qui donne naissance à un réseau primitif de structures vasculaires (Pepper, 2000) par différenciation des précurseurs des cellules endothéliales dérivés du mésoderme (Azzi & Gavard, 2014). Les angioblastes, eux-mêmes dérivés de cellules souches plus primitives, les hémangioblastes (Pepper, 2000). La maturation de l'hémangioblaste vers la voie endothéliale est initiée par le vascular endothelial growth factor (VEGF), un facteur de croissance angiogénique essentiel au développement vasculaire (Stephan et *al.*, 2000).

La vasculogenèse intervient dans la vascularisation de plusieurs organes, notamment le foie, la rate et le poumon. De plus, les rôles de la vasculogenèse ont également été décrits chez l'adulte, tels que la formation de capillaires à la suite d'une lésion ischémique (Patel & D'Amore, 2011).

### 1.2. Angiogenèse

L'angiogenèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins au cours du développement et chez l'adulte (Treppe & Gavard, 2015). C'est un processus complexe, multi-étapes (Chabannes et *al.*, 2001) par lequel les organismes multicellulaires vont recruter de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux préexistants pour leur permettre un apport en nutriment et surtout en oxygène et assurer leur croissance et/ou leur survie (Méjean & Lebreton, 2010).

Ce processus implique le mouvement et la différenciation des 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). Par ailleurs, ce processus implique diverses populations cellulaires et des facteurs humoraux, notamment des facteurs angiogéniques (Stephan et *al.*, 2000).

L'angiogenèse est régulé par une balance entre des molécules favorisant l'angiogenèse appelés pro-angiogéniques (VEGF, PDGF, FGF...) et des molécules la limitant appelés anti-angiogéniques (angiostatine, thrombospondine...) (Méjean & Lebreton, 2010).

### 1.2.1. Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont le premier acteur de l'angiogenèse (Aird, 2007). Elles forment les vaisseaux sanguins chez un adulte, représentent un poids d'environ 1 kg et couvrent une surface d'environ 1000 m<sup>2</sup>. Le temps de renouvellement de ces cellules, normalement quiescentes, est de 1 000 jours. Les cellules endothéliales sont, après les cellules nerveuses, les cellules dont la demi-vie est la plus longue. Seulement 0,01% des cellules endothéliales résidentes est engagé dans le cycle de division cellulaire (phase proliférative). Cependant, durant l'angiogenèse, les cellules endothéliales des capillaires peuvent proliférer aussi rapidement que les cellules de la moelle osseuse (André et *al.*, 1998), qui prolifèrent avec un temps de renouvellement réduit à cinq jours (Weber & De Bandt, 2000). Sous l'effet de stimulations, par des facteurs angiogéniques, les cellules endothéliales peuvent entrer dans le cycle cellulaire et dégrader la membrane basale. Elles peuvent s'organiser en capillaires dans le stroma périvasculaire, induire la différenciation de cellules mésenchymateuses en péricytes pour former de nouveaux vaisseaux fonctionnels adaptés à leur microenvironnement tissulaire (André et *al.*, 1998). Les cellules endothéliales qui tapissent la face interne des vaisseaux lymphatiques et sanguins sont organisées en une fine monocouche et sont étroitement reliées entre elles par des jonctions cellulaires spécialisées (Azzi & Gavard, 2014).

### 1.3. Lymphangiogenèse

La formation du système lymphatique au cours de l'embryogenèse s'effectue après celle du système cardiovasculaire, mais lui est étroitement associée. Le système lymphatique se constitue en partie par la différenciation de cellules lymphangioblastiques du mésenchyme primaire et par la formation de six sacs lymphatiques foetaux induits par bourgeonnement à partir de la vascularisation initiale (Leclerc et *al.*, 2005).

La lymphangiogenèse correspond à la prolifération et au développement de nouveaux lymphatiques provenant de l'hôte (Lebreton & Méjean, 2008). Ce processus est initié par l'activation d'un récepteur nommé VEGFR-3 (vascular endothelial growth factor receptor-3) localisé sur la membrane plasmique des cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques. Le récepteur VEGFR-3 est spécifiquement activé par les facteurs de croissance VEGF-C et VEGF-D (vascular endothelial growth factor-C/-D) (Leclerc et *al.*, 2005). Bloquer VEGF-C ou D et

inhiber VEGFR-3 sont des stratégies thérapeutiques probablement très intéressantes pour lutter contre la lymphangiogenèse (Méjean & Lebreton, 2010).

La lymphangiogenèse physiologique est essentiellement contemporaine du développement embryonnaire et n'existe pratiquement pas dans les tissus adultes normaux, sauf lors de la cicatrisation et dans les ovaires au cours du cycle menstruel. Une lymphangiogenèse de l'adulte est également observée dans des conditions pathologiques comme l'inflammation et la dissémination métastatique (Gligorov & Lévy, 2014).

## 2. Angiogenèse physiologique et pathologique

Dans des conditions physiologiques normales, cette néovascularisation est finement contrôlée et joue un rôle fondamental dans les fonctions reproductrices (régénération de l'utérus, formation du corps jaune (corpus luteum et du placenta) (Gingras & Béliveau, 1997), durant le cycle menstruel (Garrido & Imhof, 2014). L'angiogenèse intervient au cours des réactions inflammatoires et lors des processus de réparation tissulaire survenant par exemple à la suite d'une ischémie (Bennis et *al.*, 2001).

Au cours de l'angiogenèse pathologique, l'activation est prolongée dans le temps, résultat d'une perturbation de l'équilibre entre facteurs angiogéniques et angio-inhibiteurs. Ceci correspond à des situations pathologiques variées telles que les rétinopathies, les hémangiomes infantiles (Weber & De Bandt, 2000). La croissance tumorale (Pepper, 2000). La dégénérescence maculaire liée à l'âge, l'arthrite rhumatoïde, ou le psoriasis. Dans le cancer, une fois que le réseau vasculaire tumoral est établi, il permet la diffusion métastatique. À l'inverse, lorsque la formation des nouveaux vaisseaux est insuffisante, comme dans les maladies coronariennes, les maladies artérielles périphériques, les accidents vasculaires cérébraux, l'apport en nutriments et l'oxygénation des tissus sont insuffisants, ce qui entraîne leur mort par hypoxie (Lataillade & Uzan, 2010).

## 3. Mécanisme cellulaire et moléculaire de l'angiogenèse physiologique

La formation des néovaisseaux à partir des vaisseaux préexistants fait intervenir des mécanismes complexes de régulation (autocrine et/ou paracrine) entre différents types cellulaires : cellules endothéliales, cellules lymphoïdes, cellules stromales : macrophages, fibroblastes, cellules mésenchymateuses et cellules tumorales quand il existe un processus néoplasique. Ces éléments cellulaires sont capables de synthétiser des facteurs de croissance, des cytokines, des composants de la Matrice Extra-cellulaire (MEC) et des enzymes spécifiques dont les actions

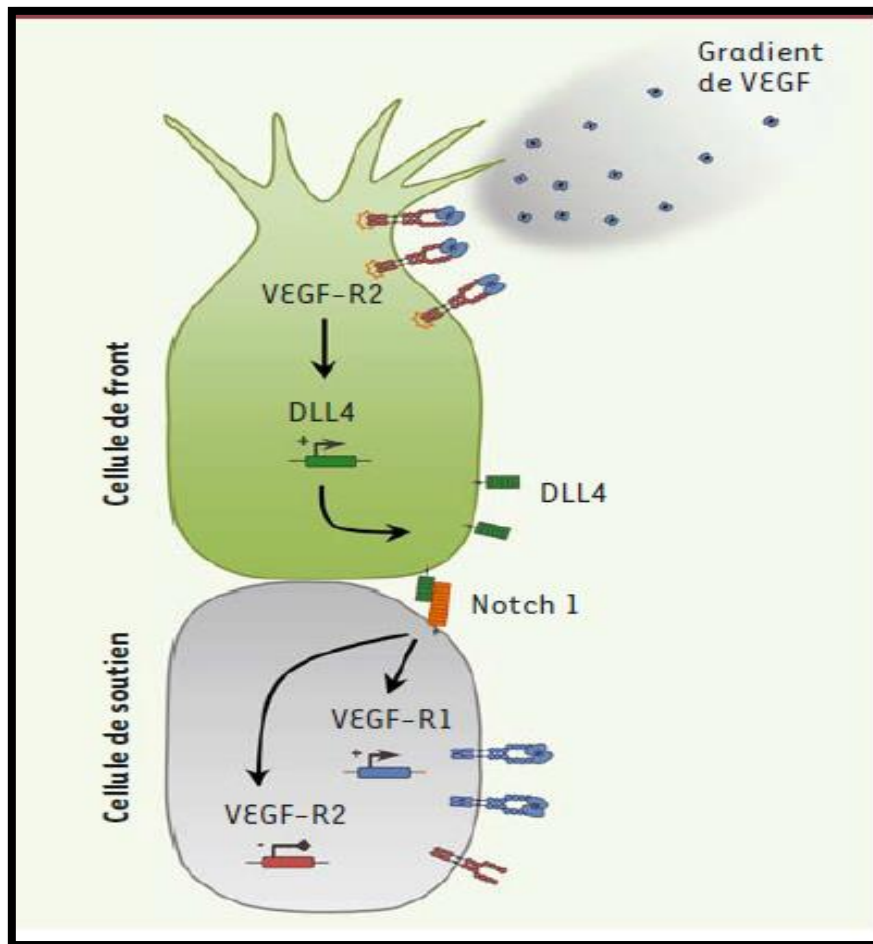
combinées ou coordonnées vont aboutir à la mise en place d'une néovascularisation (Chabannes et *al.*, 2001).

Différents mécanismes assurent le déroulement de la néo vascularisation, dont le bourgeonnement (sprouting) et l'intussusception ou invagination (spliting) (Azzi & Gavard, 2014). Cependant, le bourgeonnement est, le mécanisme moléculaire le plus largement connu, et il consiste en 4 étapes successives (Treppe & Gavard, 2015).

### 3.1. Premier temps : la sélection

La première étape de l'angiogenèse correspond à l'activation et à la sélection de cellules endothéliales (Treppe & Gavard, 2015). Une cellule endothéliale quiescente acquiert un phénotype migratoire et invasif lorsqu'elle est stimulée par des facteurs pro-angiogéniques, tels que le VEGF ou le FGF (fibroblast growth factor), qui sont sécrétés par le microenvironnement vasculaire (Garrido-Urbani et *al.*, 2014). Ces signaux de prolifération, migration et survie sont captés par les cellules endothéliales et les péricytes des vaisseaux les plus proches (Adams & Alitalo, 2007). Ces dernières jouent un rôle essentiel dans la mise en place du processus ils se détachent de la barrière endothéliale et sécrètent des métalloprotéinases qui vont dégrader la membrane basale et permettre la migration des cellules endothéliales sous-jacentes (Garrido-Urbani et *al.*, 2014). Le détachement des cellules périvasculaires des cellules endothéliales, faisant suite à l'induction d'Ang2 par l'hypoxie. Cela inactive l'effet stabilisateur d'Ang1 et conduit au désassemblage de la paroi vasculaire, permettant ainsi aux cellules endothéliales de répondre aux signaux angiogéniques activateurs (Pepper, 2000).

Une cellule endothéliale du front (tip cell) est sélectionnée pour guider la formation du nouveau vaisseau (Azzi & Gavard, 2014). Et des cellules de soutien (stalk cells) qui prolifèrent en arrière. D'un point de vue moléculaire, deux voies de signalisation, reposant sur le DLL4 (delta-like ligand 4), un ligand de Notch, et le VEGF (vascular endothelial growth factor) et son récepteur VEGF-R (VEGF receptor), sont largement impliquées dans le processus de sélection de la cellule de front (Figure 3).



**Figure 3 :** Mécanismes moléculaires de sélection de la cellule de front (Treppe & Gavard, 2015).

### 3.2. Deuxième temps : la migration

À 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 (Treppe & Gavard, 2015). Ces filopodes, capables de détecter des signaux attractifs ou répulsifs, vont s'orienter sur un axe de guidage dirigé vers les cellules émettrices des facteurs pro-angiogènes en suivant la matrice extracellulaire (Adams & Alitalo, 2007) (Figure 4).

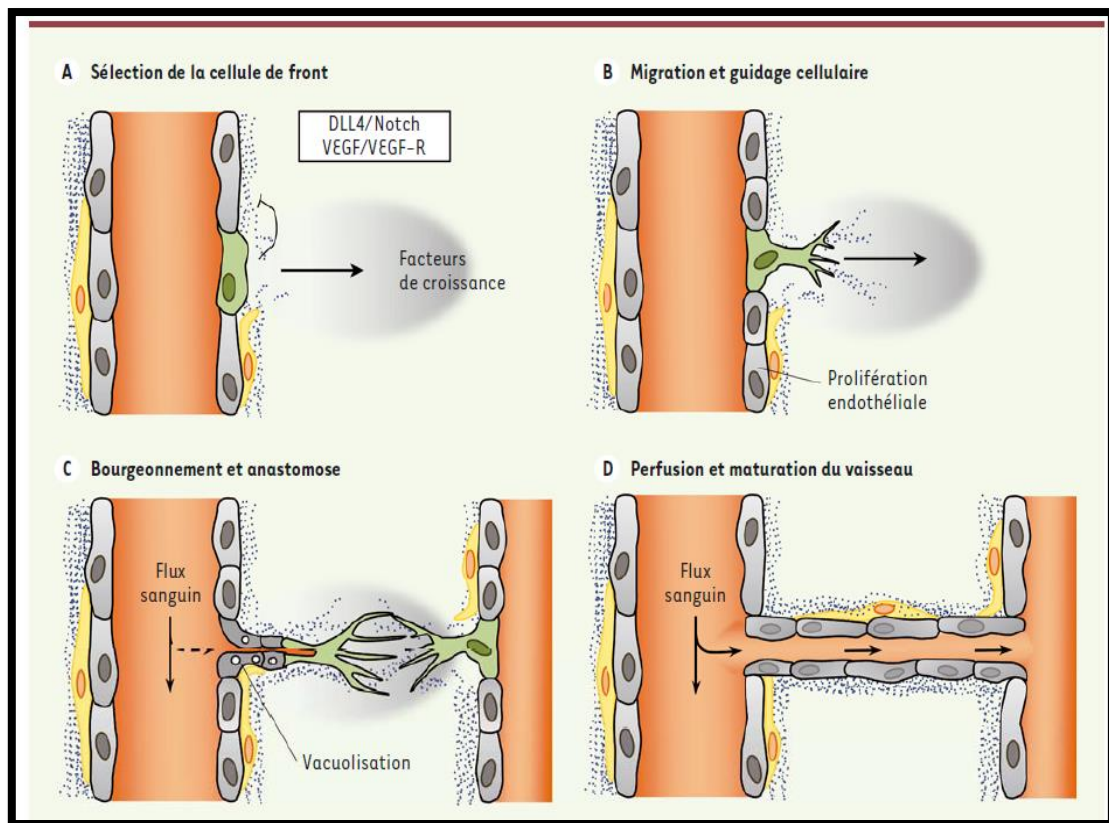
### 3.3. Troisième temps : la fusion et la formation de la lumière

Les cellules endothéliales de ces bourgeons cessent de proliférer et de migrer, forment une lumière, déposent une nouvelle lame basale, et recrutent des cellules périvasculaires. Un flux sanguin peut dès lors s'établir dans les vaisseaux néoformés. Ces événements sont la conséquence d'une diminution locale de l'expression/activité de VEGF et d'Ang2, probablement due à une augmentation de l'activité de TGF- $\beta$  (Mandriota & Pepper, 1998). Ou à la réduction de l'hypoxie, ce qui rétablit le signal de Ang1. (Pepper, 2000). 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 & Gerhardt, 2011) (Figure 4).

### 3.4. Quatrième temps : la maturation et le flux sanguin

In fine, 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 (Treps & Gavard, 2015). Situé sur les cellules endothéliales (Pepper, 2000). Elle induit le renforcement des jonctions entre les cellules endothéliales ainsi que leur quiescence (Treps & Gavard, 2015). Et stabiliser le nouveau vaisseau par inhibition de la prolifération vasculaire (Garrido-Urbani et *al.*, 2014). Un gradient de PDGF-BB (platelet-derived growth factor) et de TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor) induit parallèlement le recrutement des péricytes 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 (Treps & Gavard, 2015) (Figure 4).



**Figure 4** : Etapes de l'angiogenèse normale (Treps & Gavard, 2015).

## 4. Angiogenèse tumorale

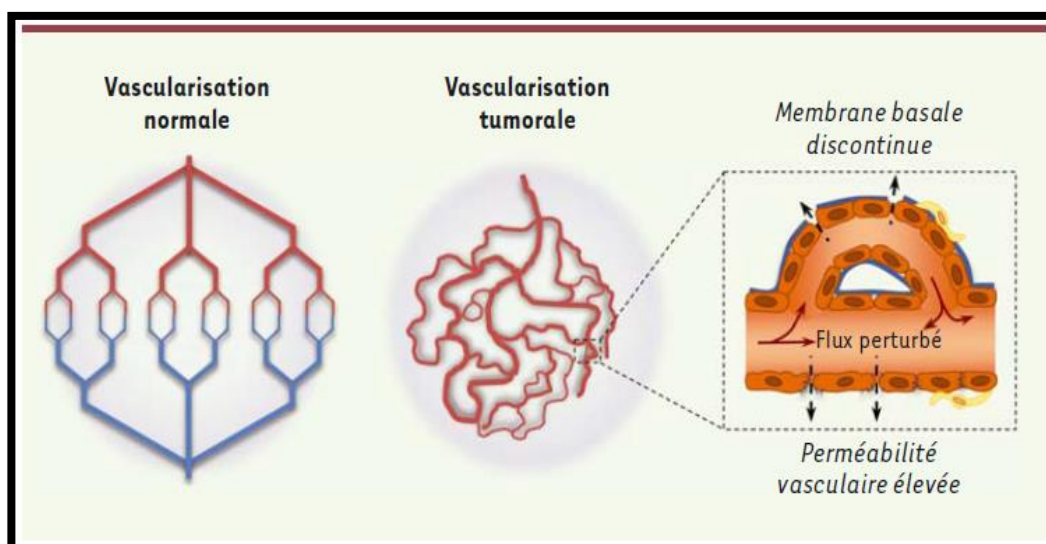
Depuis les travaux de FOLKMAN en 1971, il est établi que l'angiogenèse est indispensable à la croissance des tumeurs solides et à la dissémination tumorale métastatique. Au sein d'un tissu, la taille d'une tumeur non vascularisée ne dépasse pas 2 à 3 mm et en l'absence de vaisseaux (Chabannes et *al.*, 2001). Aux tout premiers stades de son développement, la tumeur n'a pas besoin de vascularisation propre et puise son oxygène et ses nutriments par simple diffusion passive à partir des liquides interstitiels avoisinants. Dès qu'elle atteint un certain volume, ce processus ne suffit plus et le « switch angiogénique » supposé par Folkman se produit (Tobelem, 2008).

J. Folkman et D. 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 anormale connecté avec son environnement (Bensimon, 2012). Les cellules tumorales pourraient rester inactives pendant des années sous l'effet d'une balance favorable à l'apoptose plus qu'à la prolifération cellulaire par un switch anti-angiogénique. Pendant cette période la croissance des métastases serait contrariée par les inhibiteurs de l'angiogenèse (Méjean & Lebre, 2010). Plus de 20 activateurs (VEGF, FGF, TGF $\beta$ , IL8, ...) et inhibiteurs (angiostatine, endostatine, thrombospondine...) de ce processus ont été identifiés (Hennequin, 2007).

Une meilleure connaissance des mécanismes qui régulent l'invasion et l'angiogenèse permet d'envisager des traitements avisés anti-angiogéniques actuellement en développement. Ces traitements représentent l'un des axes de recherche majeurs en cancérologie (André et *al.*, 1998).

### 4.1. Structure et caractéristiques des vaisseaux tumoraux

Les vaisseaux tumoraux diffèrent des vaisseaux normaux à plusieurs niveaux. Sur le plan morphologique, la néoangiogenèse tumorale aboutit à un assemblage structural et dynamique différent de l'angiogenèse physiologique. Les néocapillaires tumoraux ont un diamètre trois fois plus important que celui observé dans les tissus différenciés (Martin, 2012). Les vaisseaux tumoraux sont dilatés, irréguliers, perméables et désorganisés. Ils sont souvent dépourvus de péricytes et de cellules musculaires lisses. La perte de l'intégrité des jonctions cellulaires formées par la VE (vascular endothelial)-cadhérine contribue au dysfonctionnement de la barrière endothéliale et à une perméabilité accrue (Azzi & Gavard, 2014). Les vaisseaux tumoraux ne forment qu'une barrière partielle contre les grosses molécules et les protéines plasmatiques (Treppe & Gavard, 2015) (Figure 5).



**Figure 5 :** Aberrations du réseau vasculaire tumoral (Treppe & Gavard, 2015).

## 4.2. Événements moléculaires à l'origine de l'angiogenèse tumorale

### 4.2.1. Rôle de l'hypoxie

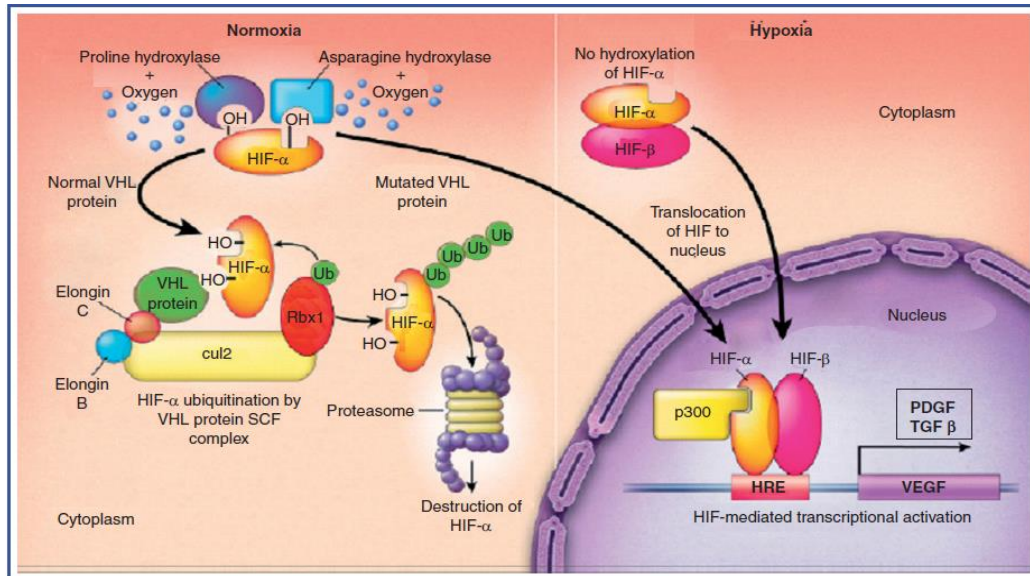
La prolifération des cellules tumorales est limitée par les conditions de normoxie. Une prolifération rapide entraîne le phénomène d'hypoxie cellulaire rendant les cellules tumorales capables de sécréter des molécules chimioattractantes et activatrices (Martin, 2012).

L'hypoxie tumorale est considérée comme une caractéristique majeure du microenvironnement des tumeurs solides. Elle se traduit par une baisse de la pression en oxygène au-dessous de 5 à 10 mm Hg. Les cellules tumorales s'adaptent au stress hypoxique en stabilisant les facteurs de transcription induits par l'hypoxie, essentiellement HIF (*hypoxia inducible factor*)-1 et HIF-2. Les HIF sont des protéines hétérodimériques, composées d'une sous-unité constitutivement exprimée, HIF- $\beta$ , et d'une sous-unité régulée par l'oxygène, HIF- $\alpha$ .

En présence d'oxygène, HIF- $\alpha$  est hydroxylée sur ses résidus proline 402 et/ou 564 par la *prolyl-hydroxylase domain 2* (PHD2) (Hassim et al., 2014). HIF- $\alpha$  hydroxylé se couple à la protéine de Von Hippel-Lindau (pVHL) qui joue le rôle de protéine de transport et d'adressage (Martin, 2012). HIF-1 $\alpha$  est donc ubiquitinylé en normoxie puis dégradé par le protéasome (Gothié & Pouyssegur, 2002).

En condition d'hypoxie, HIF-1 $\alpha$  n'est plus hydroxylé et ne fixe plus pVHL. Le signal hypoxique va aussi déclencher la translocation nucléaire de HIF-1 $\alpha$  pour activer des gènes sous la dépendance d'éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) (Gothié & Pouyssegur, 2002). HIF-1 et HIF-2 activent plusieurs gènes impliqués dans l'angiogenèse tumorale, l'inhibition de l'apoptose, les métastases, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et la résistance aux

traitements conventionnels, ce qui fait de l'hypoxie tumorale un facteur de mauvais pronostic (Hasmim et *al.*, 2014) (Figure 6).



**Figure 6:** Mécanisme impliqué dans l'accumulation d'HIF (Méjean, A., & Lebret, T. 2008).

Le facteur suppresseur de tumeur pVHL (von Hippel- Lindau) cible de mutations dans les cellules germinales donnant le syndrome de cancer héréditaire caractéristique de la maladie du même nom est clairement impliqué dans ce mécanisme (Gothié, E., & Pouyssegur, J. 2002). Lorsqu'il existe une anomalie du gène VHL, HIF-α s'accumule dans la cellule et se lie aux facteurs HIF-β. Le complexe HIF se transloque alors à l'intérieur du noyau cellulaire et se lie au HRE (HIF responsive element) induisant une séquence de transcription de gènes induit par l'hypoxie : VEGF-A (*vascular endothelial growth factor*), EGFR (*Epithelial Growth Factor Receptor*) type 1, PDGFβ (*platelet-derived growth factor*)...etc (Méjean, A., & Lebret, T. 2008).

#### 4.2.2. 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). Le microenvironnement ou le stroma est un tissu non tumoral provenant de l'hôte. Il est un tissu composé d'une trame conjonctivo-vasculaire. Il est le véritable tissu nourricier de soutien des cellules tumorales, présent dans tous les types de cancers solides. Il est présent dans les métastases. Sa formation est induite par les cellules cancéreuses. Le stroma est schématiquement composé : de fibroblastes, d'adipocytes, de sang, de vaisseaux lymphatiques, d'une matrice extracellulaire (MEC), de néovaisseaux formés lors de l'angiogenèse tumorale, des cellules inflammatoires et immunocompétentes : lymphocytes, cellules NK, plasmocytes, histiocytes, polynucléaires neutrophiles, polynucléaires éosinophiles et macrophages (Méjean & Lebret, 2010).

Au cours de la progression tumorale, de nombreuses interactions s'établissent entre les cellules cancéreuses, le tissu environnant et la matrice extracellulaire. Les cellules tumorales peuvent ainsi altérer leur microenvironnement en le rendant permissif et propice à leur croissance; en retour, le microenvironnement tumoral contribue à la migration de ces cellules et, de ce fait, à l'invasion tumorale (Albregues et *al.*, 2014).

Les cellules immunitaires infiltrées (notamment les cellules myéloïdes et lymphoïdes inflammatoires) influencent aussi fortement la prolifération en sécrétant une panoplie de facteurs EGF [epidermal growth factor], TGF [transforming growth factor], TNF- $\alpha$  [tumor necrosis factor], FGF [fibroblast growth factors], interleukines, etc... (Provot, 2014).

Les fibroblastes constituent la population cellulaire la plus abondante du stroma. Dans le contexte des tumeurs épithéliales, nombre d'entre eux sont dans un état activé avec une caractéristique de « fibroblastes associés aux carcinomes » (FAC). Ils dérivent majoritairement de fibroblastes résidents adjacents à la tumeur, ou encore de cellules mésenchymateuses (Albregues et *al.*, 2014). En effet, il est maintenant établi qu'après leur activation par les cellules tumorales, les FAC émettent des signaux oncogéniques, qu'il s'agisse de la sécrétion de cytokines, de chimiokines et de facteurs de croissance, ou de la constitution d'une MEC protumorale. Ces signaux ciblent les cellules cancéreuses et stimulent *in situ* la progression tumorale (Albregues et *al.*, 2014).

Les adipocytes sécrètent des molécules pro-inflammatoires, des molécules qui favorisent le remodelage de la matrice extracellulaire et libèrent des acides gras qui facilitent la croissance tumorale. Ces interactions constituent l'une des bases de l'augmentation de l'incidence et de l'agressivité des cancers chez les obèses (Fridman & Sautès-Fridman, 2014).

La MEC est la composante non cellulaire du stroma. Elle est constituée principalement d'un grand nombre de protéines de grandes tailles, telles que les collagènes, les laminines, les fibronectines et les protéoglycanes qui forment un réseau dense (Buache & Rio, 2014). La MEC présente de nombreuses fonctions. Elle sert de réservoir à un certain nombre de facteurs solubles, souvent sous forme de profacteurs (pro-TGF- $\beta$ , IGFBP1 [*insulin-like growth factor binding protein 1*]). De telles molécules, une fois activées, sont capables d'induire en aval une ou plusieurs voies de signalisation par le biais d'interactions avec d'autres protéines, le plus souvent des récepteurs membranaires (Buache & Rio, 2014). Le remodelage de la MEC par l'action des MMP constitue une autre étape cruciale de la progression tumorale et de la formation du microenvironnement tumoral. En dégradant la MEC, ces enzymes assurent, par clivage protéolytique, l'activation de nombreux facteurs de croissance, de cytokines, de récepteurs et de molécules d'adhérence (Albregues et *al.*, 2014).

#### 4.3. Rôle de l'angiogenèse dans la progression tumorale et la métastase

Alors que la plupart des cancers détectés à un stade précoce peuvent être guéris, un patient qui développe des métastases est souvent incurable. 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. Au cours du développement tumoral, le système lymphatique est considéré dans de nombreux cas de cancers comme la voie primaire de dissémination des métastases (Leclers et *al.*, 2005; Bielenberg et Zetter, 2015).

Les tumeurs bénignes localisées n'ont aucune chance de se propager autant qu'elles restent avasculaires, et ainsi, reçoivent l'oxygène et les nutriments par diffusion passive à partir de vaisseaux sanguins voisins. *In vitro*, ou *in vivo*, les tumeurs ne peuvent pas croître, à moins qu'ils

réalisent le passage angiogénique, à des volumes dépassant les limites de la diffusion (Bielenberg et Zetter, 2015).

Les cellules tumorales doivent développer un réseau vasculaire qui leur offre un accès à la circulation. En général, il admis que plus grande est la tumeur plus dense est la vascularisation et par conséquence il y a plus de chance pour les cellules tumorales de quitter le foyer primaire (Bielenberg et Zetter, 2015).

#### **4.4. La thérapie antiangiogénique**

Le mérite de l'introduction de la thérapie antiangiogénique revient à Judah Folkman dans une publication dans " *The New England Journal of Medicine*". D'après l'auteur, puisque la progression tumorale est conditionnée par l'installation d'un réseau vasculaire, Il serait justifié de cibler la vascularisation tumorale en vue de bloquer la croissance tumorale (Folkman, 1971). En 2004, 33 ans 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 *al.*, 2010). Parmi les plus connu de thérapie antiangiogéniques il est y a :

##### **4.4.1. Inhibiteurs des VEGF et récepteurs des VEGF**

###### **4.4.1.1. Le bevacizumab (AvastinR\_) :**

Le bevacizumab est un anticorps monoclonal humanisé de type IgG1 qui se lie sélectivement au VEGF-A humain et en neutralise l'activité biologique. Il a une forte affinité pour un épitope présent sur toutes les isoformes du VEGF-A, chevauchant partiellement les sites de liaison aux récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2, empêchant la liaison du VEGF-A à ces récepteurs à la surface des cellules endothéliales (Benniset *al.*, 2010). Il est actuellement utilisé en association avec plusieurs types de chimiothérapie pour le traitement du cancer du côlon métastatique, du cancer du poumon non à petites cellules, ainsi que dans les cancers du sein, du rein et du glioblastome (El Mesbahi et *al.*, 2011).

#### 4.4.2. Inhibiteurs de tyrosine kinase des VEGF-Rs

Ce sont des moyens de blocage de l'angiogenèse tumorale et de ciblage direct du domaine kinase des récepteurs impliqués dans la régulation de ce processus. IL existe plusieurs inhibiteurs de tyrosine kinase des récepteurs du VEGF qui agissent par blocage compétitif du site de l'ATP. Ils inhibent au minimum le récepteur R2 mais aussi, dans certains cas, les récepteurs R1 et R3 du VEGF (Faure, 2015).

##### 4.4.2.1. Le sunitinib (SutentR\_) :

Le sunitinib est un inhibiteur des tyrosines kinases de récepteurs variés : VEGF-R1 et 2 impliqués dans l'angiogenèse, récepteurs des facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGFR). L'inhibition de ces kinases entraîne un blocage de la transduction, et de nombreux processus intracellulaires comme la croissance cellulaire, la progression tumorale, le développement des métastases et l'angiogenèse. (Belmondo et *al.*, 2012).

##### 4.4.2.2. Le sorafenib (NexavarR\_) :

Le sorafénib est un inhibiteur multikinase. IL inhibe différents récepteurs à activité tyrosine kinase tels que VEGFR-2, VEGFR-3, c-KIT (stem-cell Growth Factor Receptor), FLT-3 (fms-related tyrosine kinase 3) et PDGFR-bêta (Platelet Derived Growth Factor Receptor). Il inhibe également d'autres activités enzymatiques notamment les sérine/thréonine kinases associées aux protéines Raf, impliquées dans la prolifération cellulaire de certaines tumeurs (Bennis et *al.*, 2010).

##### 4.4.2.3. Le pazopanib :

Le pazopanib est un ITK (inhibiteur tyrosine kinase) ciblant VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR a, PDGFR b et c-Kit, indiqué en 1<sup>ère</sup> ligne dans le cancer du rein avancé (Bretagne, Marie, et *al.*, 2016). C'est le dernier antiangiogénique disponible sur le marché (Lattafi et *al.*, 2016).

#### 4.4.3. Inhibiteurs de protéases

Les inhibiteurs de protéases comprennent les inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases matricielles (MMP). Les metalloproteinases sont impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Plusieurs inhibiteurs de ces protéines sont en développement. Cette stratégie repose sur l'inhibition de la dégradation de la matrice extracellulaire pour empêcher l'invasion et la migration des cellules endothéliales et bloquer ainsi l'angiogenèse (André et *al.*, 1998).

#### 4.5. Les avantages de la thérapie antiangiogénique

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. En bloquant le développement des vaisseaux tumoraux, les antiangiogéniques diminueraient la perfusion de la tumeur et activeraient l'apoptose et la nécrose des cellules tumorales. Ceci devrait conduire à une diminution de la masse tumorale, jusqu'à ce qu'elle ne présente plus qu'un volume résiduel minime.

Un traitement antiangiogénique entraîne avant tout un phénomène de normalisation vasculaire, permettant entre autres d'abaisser la pression interstitielle et de réguler le flux sanguin au sein de la tumeur. Les antiangiogéniques favoriseraient l'approvisionnement tissulaire en oxygène et en médicaments cytotoxiques, améliorant ainsi l'efficacité de la chimiothérapie et de la radiothérapie dont les performances dépendent d'une bonne oxygénation tissulaire (Bennis et *al.*, 2010).

#### 4.6. Toxicité des antiangiogéniques

Le développement des molécules antiangiogéniques a élargi l'arsenal thérapeutique disponible pour traiter un certain nombre de cancers. Cependant, leur action au niveau tumoral n'est pas exclusive et, comme pour toute nouvelle classe thérapeutique, des effets indésirables significatifs leur ont été imputés. Les principaux effets classes sont ici résumés (Bennis et *al.*, 2010).

##### 4.6.1. Atteintes cardio-vasculaires :

L'HTA (L'hypertension artérielle) est une toxicité commune à tous les antiangiogéniques quelle que soit leur classe (Brosseau et *al.*, 2015), il a été l'effet indésirable le plus fréquemment observé chez les patients traités par antiangiogéniques (Bennis et *al.*, 2010).

##### 4.6.2. Atteintes rénales :

Parmi les atteintes rénales observées chez les patients recevant un antiangiogénique, la protéinurie a été la plus fréquente (Bennis et *al.*, 2010).

##### 4.6.3. Toxicité cutané-muqueuse :

Les effets indésirables cutané-muqueux ont une incidence importante chez les patients traités par ITK. Le plus fréquent est le syndrome main-pied (SMP) ou érythrodysthésie palmo-plantaire (Bretagne et *al.*, 2016).

#### 4.6.4. Autres effets secondaire :

Des risques d'hémorragies, des toxicités digestives (stomatite, nausées et vomissements, diarrhées), et de fatigue.

### 5. 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).

*Deuxième Partie :*  
*Etude expérimentale*

# *Chapitre III*

## *Matériels et méthodes*

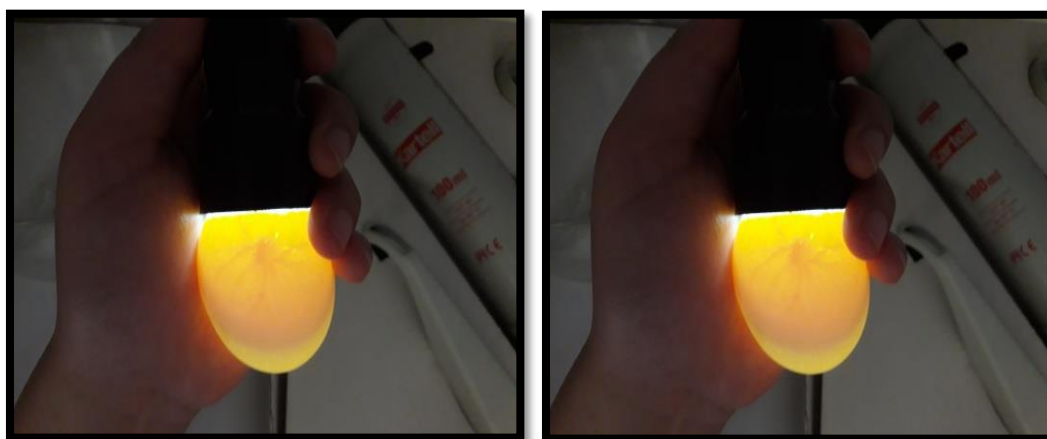
## 1. Matériel et méthodes

Pour déterminer l'effet de la Cefazal, le daflon et l'extrait aqueux (EAq) du *Camellia sinensis* L. 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.

### 1.1. 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 7).



**Figure 7 :** Vérification de la fécondité des œufs.

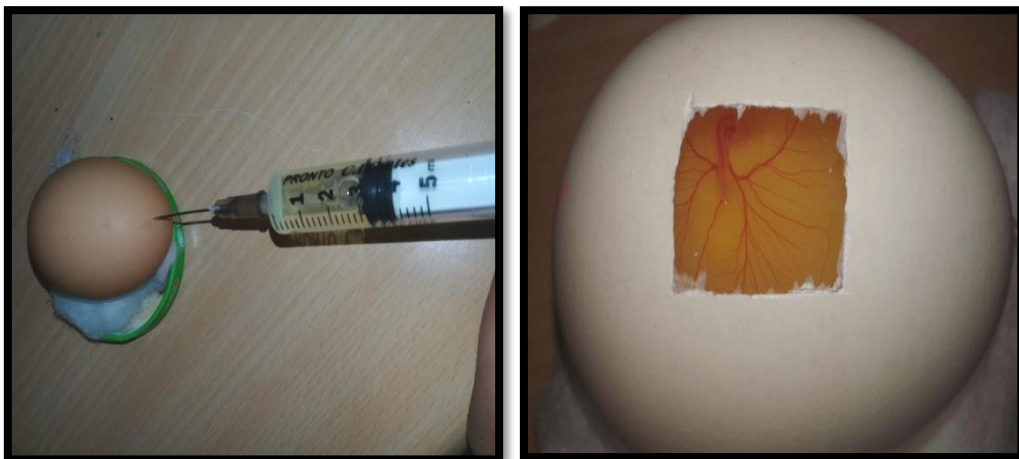
Pour diminuer la contamination à partir de la surface, les œufs ont été désinfectés avec de l'éthanol à 70%, puis ont été séchés dans l'air ambiant, incubés à 37.5 ° C et 65% d'humidité dans un incubateur d'œufs (WQ01) pour 72 h. Les œufs sont balancés (tournés) de 60° chaque 2 heures pendant 3 jours.



**Figure 8 :** (A) Désinfection des œufs avec l'éthanol à 70%. (B) Incubation des œufs à l'incubateur (WQ01).

### 1.2. Préparation des membranes chorioallantoïdienne

Au 3<sup>ième</sup> 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 seringue stérile à aiguille (22Gx1 1/4" ; 0,70x30mm) et 2-3ml d'albumen ont été prélevés délicatement pour ne pas toucher le jaune (voir la figure 09). Le prélèvement provoque la formation d'un sac d'air artificiel qui provoque le décrochage de la CAM de la coquille de l'œuf. 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 (Figure 9).



**Figure 9 :** Préparation et révélation de la membrane chorioallantoïdienne.

### 1.3. Préparation des substances testées

#### 1.3.1. Origine de la Cefazal® 1g et préparation de solution :

Une quantité largement suffisante du médicament antibiotique préparation injectable voie intramusculaire stricte, la céfazoline sous le nom de marque Cefazal® 1g, produit par la firme pharmaceutique SOPHAL spa Algérie, a été acheté auprès d'une officine locale à Ahmed Rachedi. Le numéro du lot était 481150 affichant une date de fabrication de 12/2018 et de péremption de 11/2020.

Dans un eppendorf, 0.25 g de la poudre de cefazal 1g a été dissout dans 1ml d'eau distillée, puis le mélange obtenu soumis à l'agitation manuel pendant 10 min à une température ambiante (Figure 10).



**Figure 10 :** Préparation de cefazal® (céfazolin 1g).

#### 1.3.2. 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.

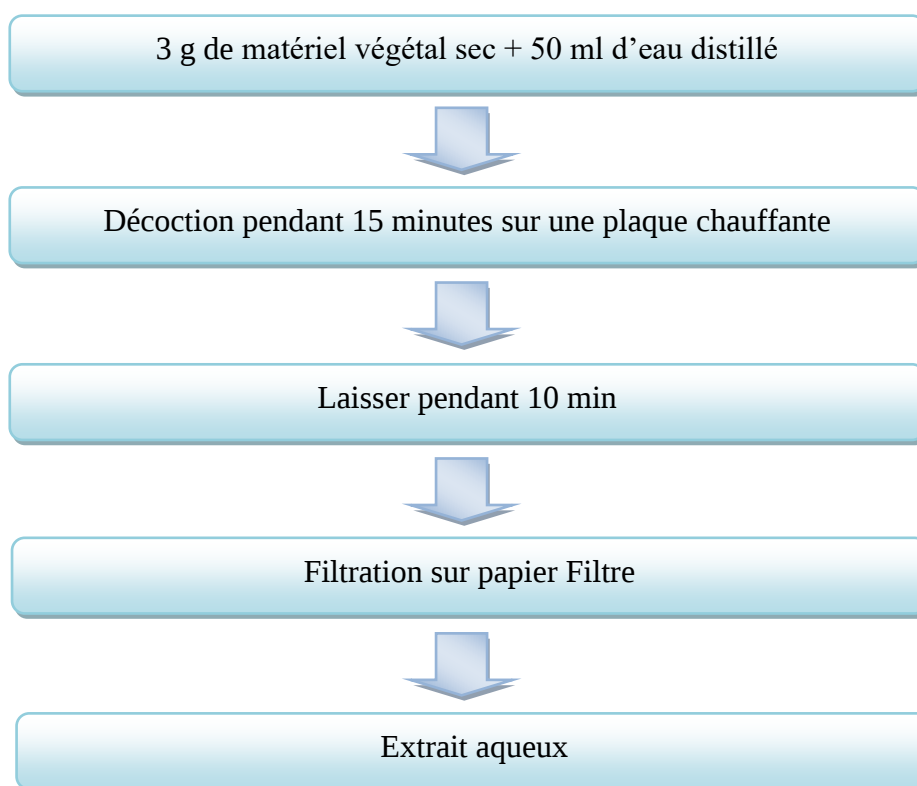
Pour une suspension bien concentrée de daflon, un comprimé de 500mg a été dissout dans 5 ml d'eau distillé, puis l'ensemble a été agité vigoureusement pendant 20 min à l'aide d'un agitateur mécanique jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène.



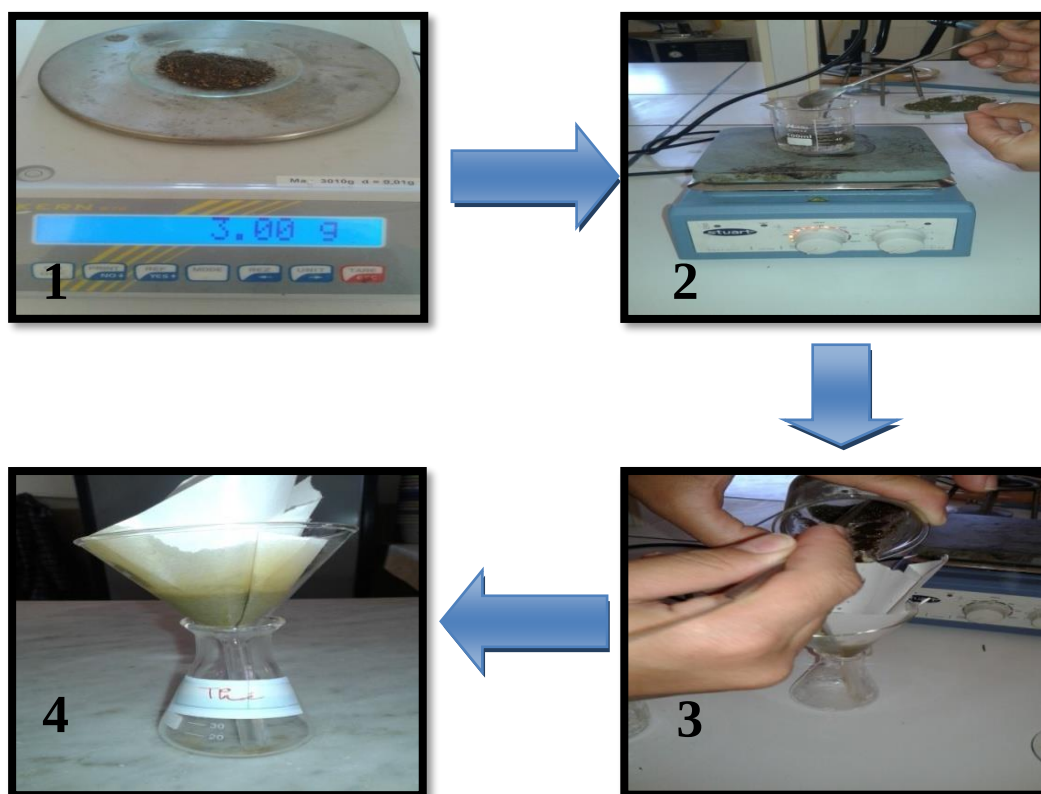
**Figure 11:** Préparation de la solution de daflon® 500mg.

### 1.3.3. Origine du matériel biologique (Végétal) et préparation de l'extrait aqueux *Camellia sinensis*.

L'extrait aqueux (EAq) de *Camellia sinensis* L, à été obtenu par décoction de 3 g de la poudre dans 50ml d'eau distillé pendant 15 minutes à température élevé sur une plaque chauffante. Puis la filtration jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène.



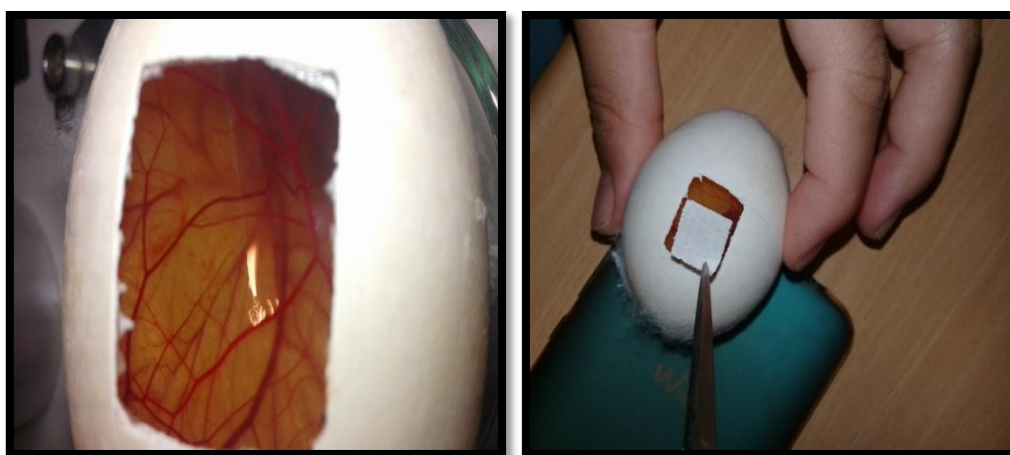
**Figure 12:** Protocole de préparation de l'extrait aqueux de *Camellia sinensis* L.



**Figure 13 :** Etapes de préparation de l'extrait aqueux de *Camellia sinensis L.*

#### 1.4. Déroulement du test CAM.

Au 8<sup>ième</sup> jour de l'incubation, les fenêtres ont été réouvertes, puis des carrés de papier filtre (< 10X10mm) stérilisés, imbibés soit dans les solution/suspension médicamenteuses (cefazal 1g et daflon 500mg) soit dans la solution de *Camellia sinensis* préparées précédemment ont été déposés directement sur la CAM.



**Figure 14 :** Pastilles en papier filtre imbibées dans les solutions préparées. A droite, le dépôt des pastilles carrées sur la CAM.

Ainsi, les œufs préalablement préparés ont été réparti en 4 groupes de nombre d'œufs varié. Le premier consiste en le groupe de cefazol, le daflon, l'extrait aqueux de *Camellia sinensis* et enfin les témoins respectivement. Les fenêtres ont été refermées avec du ruban adhésif transparent et les œufs ont été réincubés. Au 12<sup>ième</sup> jour, une grande ouverture a été réalisée sur la coquille des œufs. Des images ont été prises pour un traitement informatisé ultérieure.

Des observations sous stéréomicroscope ont été alors effectuées pour évaluer la vascularisation par rapport à un contrôle de vascularisation normale. Puis, on a procéder 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, 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 :

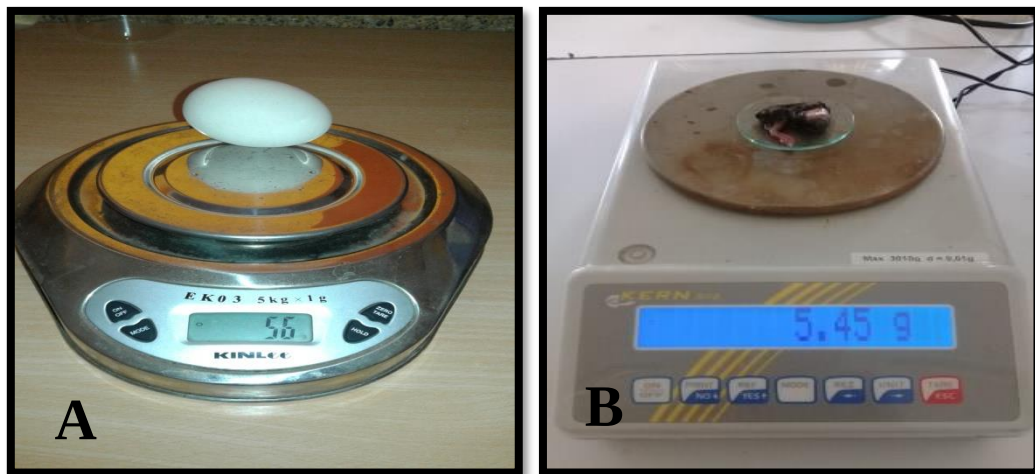
$$Pr (\%) = (Pemb / Pe) \times 100$$

D'où :

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

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

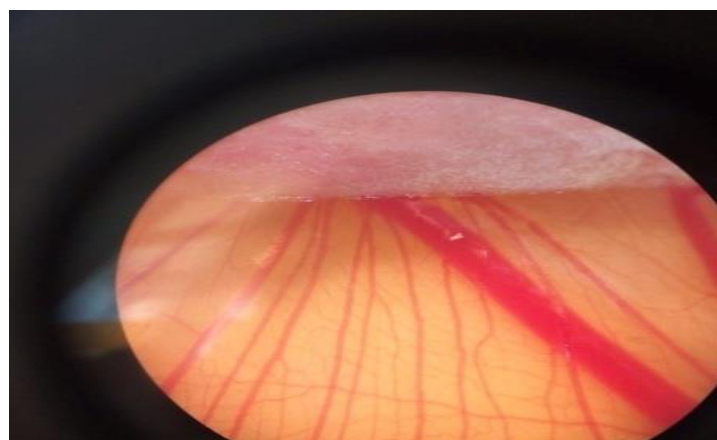
Pe : poids de l'œuf avant de prélever 3ml d'Albumen (J3).



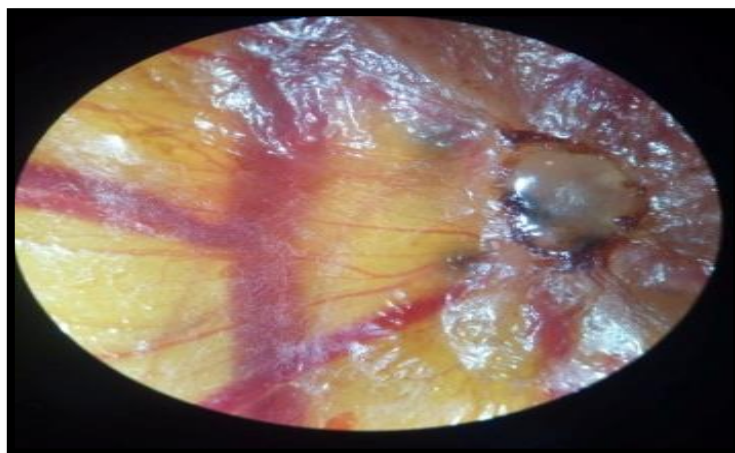
**Figure 15 :** (A) Poids de l'œuf avant de prélever 3ml d'Albumen (J3). (B) Poids de l'embryon au moment du sacrifice (J12).



**Figure 16 :** Observations de la CAM sous stéréomicroscope.



**Figure 17 :** Observations de la CAM traité par le daflon sous stéréomicroscope.



**Figure 18 :** Observations de la CAM traité par l'extrait aqueux de *Camellia sinensis*, sous stéréomicroscope.

### 1.5. 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.

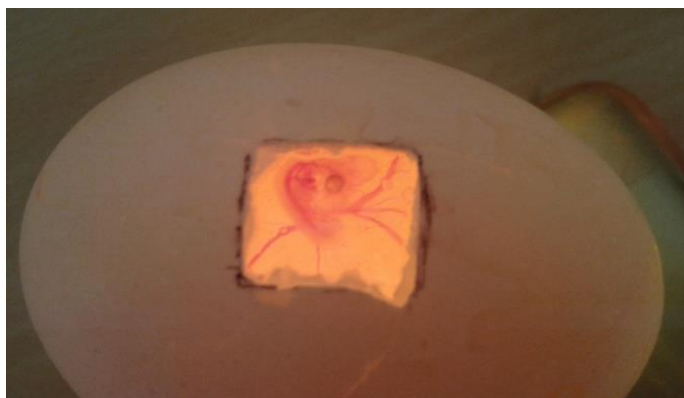
# *Chapitre IV*

## *Résultats et discussions*

## 1. Evaluation qualitative

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

1- Le système circulatoire de l'embryon et de ses annexes devient fonctionnel en premier lieu vers le troisième 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 19).



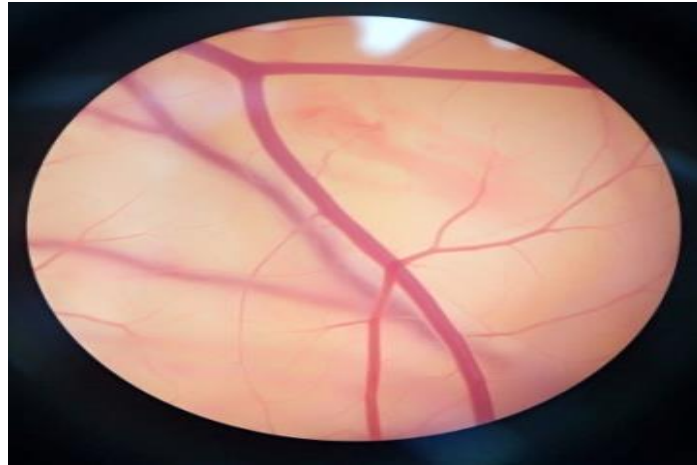
**Figure 19 :** Œuf au troisième jour de l'incubation.

2- La 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 20). Au 14<sup>ème</sup> jour, la CAM enveloppe la totalité de l'embryon et ses annexes (amnios, vésicule vitelline).



**Figure 20 :** Œuf au 14<sup>ème</sup> jour de l'incubation

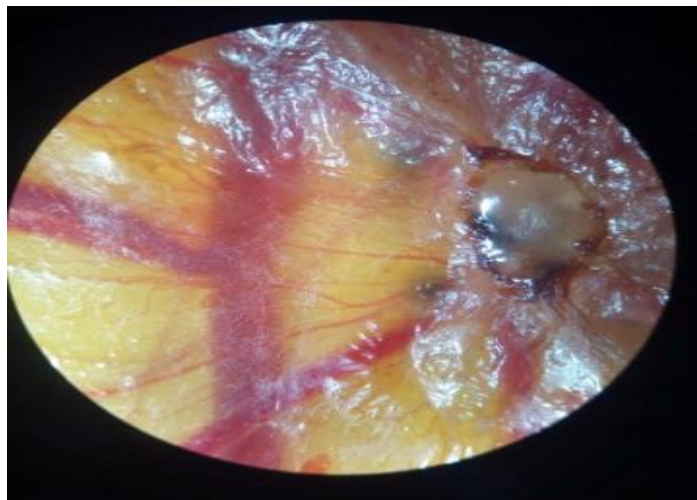
3- La vascularisation de la CAM, se projettent dans le tissu mésenchymateux sous-jacent l'épithélium ectodermique suivant un modèle hiérarchisé. Ceci permet d'observer des aspects en "Y" dites primaires à partir de la quelle diverge des branches secondaires et tertiaires (Figure 21).



**Figure 21 :** Observation des vaisseaux primaire, secondaire et tertiaire sous stéréomicroscope.

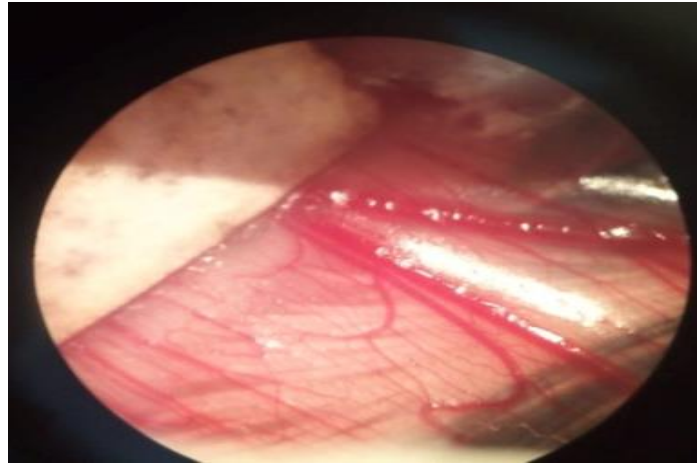
4- Il est possible de distinguer trois niveaux d'action des traitements appliqués sur la vascularisation allantoïdienne qu'on classe d'une manière sommaire en :

- Atteintes à l'épithélium du CAM voire au stroma. On observe des œdèmes, avec effet angiotoxique prononcé dans le cas du thé (Figure 22).



**Figure 22 :** Observation des vaisseaux suite à l'application du thé sous stéréomicroscope.

➤ Effet proangiogénique, en effet une induction très forte des vaisseaux a été enregistrée suite à l'application du Daflon (Figure 23).



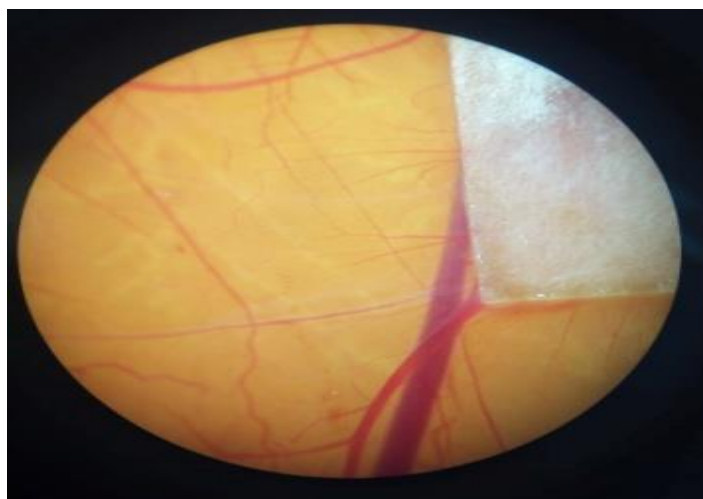
**Figure 23 :** Observation des vaisseaux suite à l'application du Daflon sous stéréomicroscope.

5- On a pu enregistrer un têt très élevé d'attaques infectieuses (Figure 24).



**Figure 24 :** Œuf infecté.

6- Certains traitements, Amoxypen et Céfazoline, semblent être inertes vis-à-vis le CAM et sa vascularisation (Figure 25).

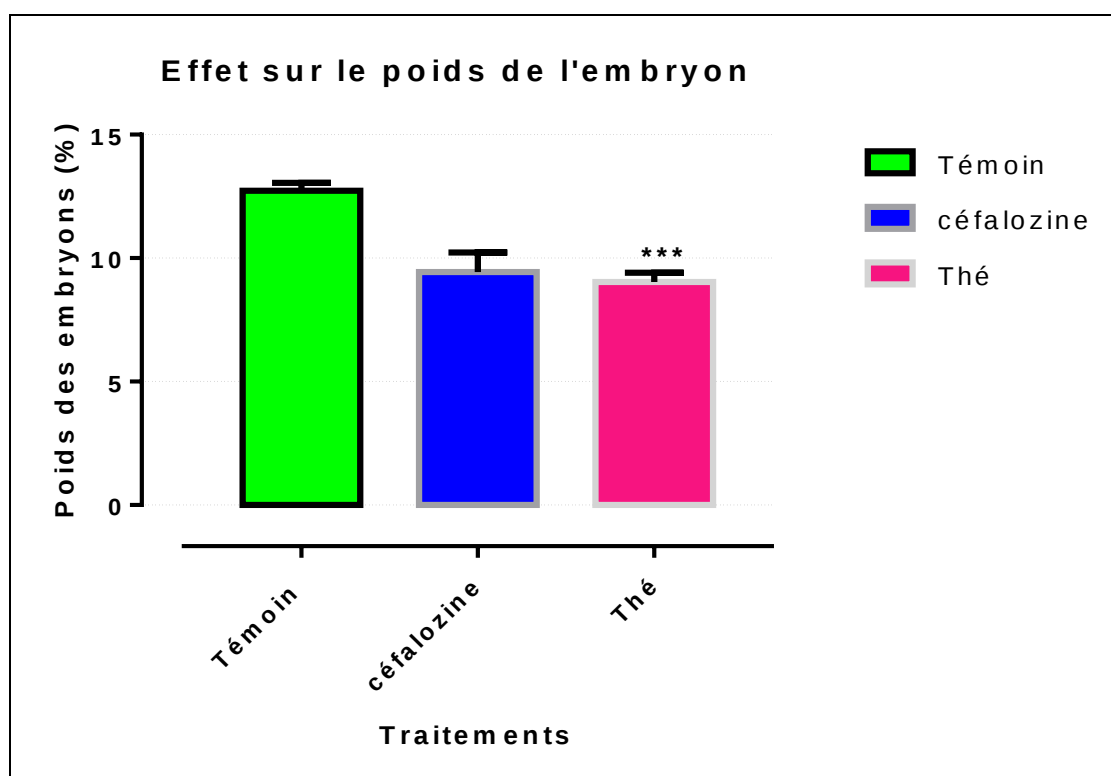


**Figure 25 :** Observation des vaisseaux suite à l'application du Céfazoline sous stéréomicroscope.

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

## 2. Evaluation quantitative :

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



**Figure 26 :** Histogramme représente l'effet des traitements sur le poids de l'embryon.

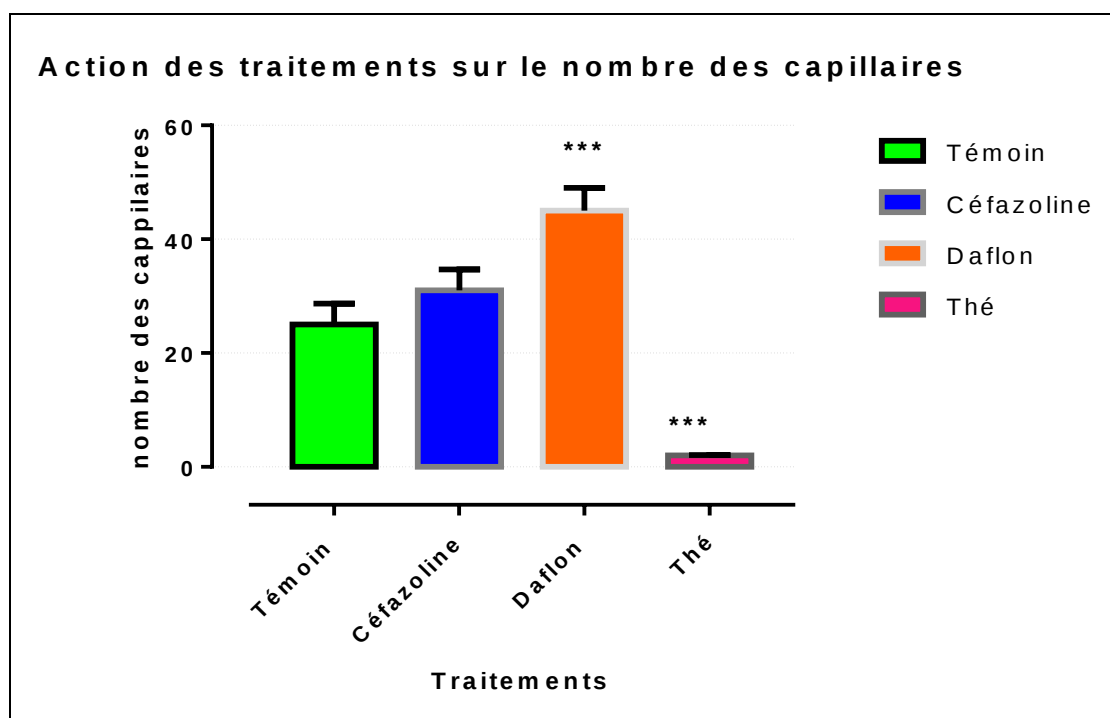
D'après les données présentées sur la figure 26, ils évaluent que le thé diminue d'une façon significative le poids relatif des embryons. Alors que le Céfazoline semble n'avoir aucun effet sur le poids des embryons.

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 tel 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.

Le Céfazoline, est un antibiotique antibactérien de la famille des bêtalactamines du groupe des céphalosporines de 1<sup>re</sup> génération (polk et *al.*, 1980). La documentation qui traite la toxicité de ce médicament sur les embryons fait défaut, ainsi, nous prétendant être les premiers à utiliser le modèle de l'embryon du poulet pour vérifier un tel effet.

Le thé vert, *Camellia sinensis*, riche en composés phénoliques, particulièrement les catechins, montre une diminution en gain de poids chez des embryons du rat (Morita et *al.*, 2009). Ces conclusions s'accordent avec les observations que nous avons obtenues sur l'embryon du poulet.

## 2.2.Effet des traitements sur le nombre des capillaires.

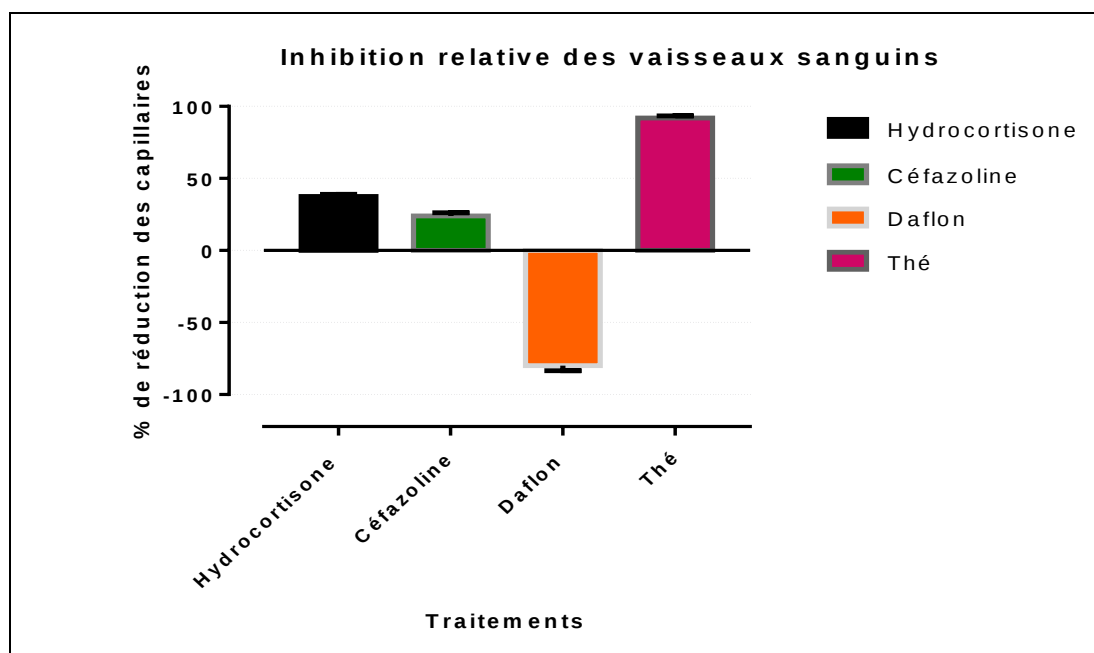


**Figure 27 :** Histogramme représente l'action des traitements sur le nombre des capillaires.

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

- ✓ Alors que le Céfazoline 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, 25 respectivement). Ceci, contrairement à toutes nos attentes, atteste d'un effet inducteur de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, à ce stade d'étude on considère le Daflon comme une préparation pro-angiogénique.
- ✓ Pour la décoction du thé, *Camellia sinensis*, à l'opposé du Daflon et de le Céfazoline, elle provoque une diminution très significative ( $P < 0.0002$ ) du nombre des nouveaux vaisseaux sanguins par rapport au témoin (2 ; 25 respectivement). Donc, il semble possible de considérer le thé comme une plante douée de propriétés antiangiogénique.

### 2.3.Effet des traitements sur l'inhibition relative des vaisseaux sanguins.



**Figure 28 :** Histogramme représente l'effet des traitements sur l'inhibition relative des vaisseaux sanguins.

A l'opposé de ce qui a été exposé précédemment, sur cette histogramme, 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 orientation 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 thé diminue drastiquement la vascularisation à des niveaux dépassant l'anti-inflammatoire stéroïdien. Il atteint jusqu'à 92% de blocage. Il présente des atteintes des tissus de la CAM autres que les vaisseaux.
- ✓ Le Céfazoline 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, le Céfazoline (Cefazal® 1g) ; un complément alimentaire, le Daflon et une préparation aqueuse de la plante, *Camélia sinensis*. 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 cout 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, plusieurs études sur les catéchines en particulier le gallate d'épigallocatechine (**EGCG**), l'ester d'épigallocatechine et d'acide gallique, est le flavanol le plus abondant du thé, connu pour être un puissant antioxydant (Higdon, 2003). Ces études font la liaison entre EGCG et l'effet antiangiogénique du thé (Tang, 2003). D'autre part, alors que des travaux précédant avancent 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 Céfazoline. 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*

## Conclusion

Afin d'explorer l'effet anti-angiogénique des médicaments et des petites molécules des plantes, nous avons opté pour un test, *in ovo* l'effet inhibiteur de l'extrait aqueux du thé commun, *Camellia sinensis L.* Ainsi que l'effet de Cefazal® 1g et de daflon® 500mg vis-à-vis la néovascularisation de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) de l'embryon de poulet. Bien que préliminaire, les résultats obtenus suggèrent un effet anti-angiogénique. Ainsi, à 3g/50ml, l'extrait aqueux du thé commun, *Camellia sinensis L.*, réduit de façon significative la vascularisation du CAM par rapport au témoin. Et un effet pro-angiogénique pour le Daflon.

De cette étude, il ressort que la plantes *Camellia sinensis L.* douée de propriétés antiangiogénique pourrait constituer une source de biomolécules prometteurs (EGCG,...) dans la pharmacothérapie antiangiogénique 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'angiogenèse thérapeutique lors des accidents vasculaires cérébrales, l'infarctus du myocarde, le pied diabétique ainsi que la cicatrisation des plaies.

Donc en perspective, il est nécessaire de poursuivre et approfondir ce travail de recherche par :

- Revérifier les données recueillies sur des échantillons plus larges.
- Recourir à des modèles expérimentaux plus performants, cultures cellulaires, Matrigèle, modèle murin,...
- Fractionner l'extrait aqueux du thé.
- Tester des molécules et des mélanges contrôlés à fin de mettre en évidence l'existence de synergie entre les différents composants.

# *Références bibliographique*

Références bibliographique

**-A-**

-Abdel-Rahman, O., ElHalawani, H., & 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.

-Adams, R. H., & Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(6), 464.

-Aird, W. C. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circulation research*, 100(2), 158-173.

-Albiges, L., Gizzi, M., Carton, E., & Escudier, B. (2015). Axitinib in metastatic renal cell carcinoma. *Expert review of anticancer therapy*, 15(5), 499-507.

-Albregues, J., Meneguzzi, G., & Gaggioli, C. (2014). L'invasion des cellules tumorales-Quand les fibroblastes s'en mêlent. *médecine/sciences*, 30(4), 391-397.

-André, T., Chastre, E., Kotelevets, L., Vaillant, J. C., Louvet, C., Balosso, J., ... & Gespach, C. (1998). Angiogenèse tumorale: physiopathologie, valeur pronostique et perspectives thérapeutiques. *La Revue de médecine interne*, 19(12), 904-913.

-Azzi, S., & 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.*vol. 3 p: 221-247.

-Belk, C. M., & Borden, V. (2004). *Biology: Science for life*. Pearson Prentice Hall.

- Belmondo, L., Montana, M., Curti, C., Crozet, M., Rathelot, P., Penot-Ragon, C., & Vanelle, P. (2012). Perspectives des thérapies ciblées dans le cancer du sein métastatique. *Thérapie*, 67(6), 491-503.
- Béliveau, R., Gingras, D., 2007. Role of nutrition in preventing cancer. *Canadian Family Physician* 53, 1905-1911.
- Bennis, Y., Guillet, B., Curti, C., & Pisano, P. (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.
- Bershtein, L., Poroshina, T., Zimarina, T., Tsyrlina, E., Zhil'tsova, E., Kovalevskii. A., Semiglazov. V., (2004). Expression of estrogen receptors-I and -A, in primary breast neoplasms and tumors exposed to neoadjuvant hormonal therapy. *Bulletin of Experimental Biology & Medicine* 138, 494-496.
- Bieche, I. (2004). Biologie moléculaire des cancers. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 19(1), 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.
- Bouyahya, A., Abrini, J., Bakri, Y., & Dakka, N. (2018). Les huiles essentielles comme agents anticancéreux: actualité sur le mode d'action. *Phytothérapie*, 16(5), 254-267.
- Bretagne, M., Boudou-Rouquette, P., Huillard, O., Thomas-Schoemann, A., Chahwakilian, A., Orvoen, G., ... & Blanchet, B. (2016). Inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant l'angiogenèse et sujets âgés: tolérance, évaluation pré-thérapeutique et gestion des effets indésirables. *Bulletin du Cancer*, 103(3), 259-272
- Brosseau, S., Naltet, C., Gounant, V., & Zalcman, G. (2015). Antiangiogéniques en cancérologie thoracique: critères de prescription et gestion des effets indésirables. *Revue des Maladies Respiratoires Actualités*, 7(4), 414-422

-Buache, É., & Rio, M. C. (2014). Le stroma tumoral-Un terreau fertile pour la cellule cancéreuse. *médecine/sciences*, 30(4), 385-390.

-Butterworth B. E. (1990). Consideration of both genotoxic and nongenotoxic mechanisms in predicting carcinogenic potential. *MutationResearch/Reviews in Genetic Toxicology* 239(2): 117-132.

-Bunz, F. (2008). *Principles of cancer genetics* (Vol. 1). New York, NY, USA.: Springer.

### **-C-**

-Calcagno, F., Lenoble, S., Lakkis, Z., Nguyen, T., Limat, S., Borg, C., ... & Nerich, V. (2016). Efficacy, safety and cost of regorafenib in patients with metastatic colorectal cancer in French clinical practice. *Clinical Medicine Insights: Oncology*, 10, CMO-S38335.

-Cézé, N., Ternant, D., Piller, F., Degenne, D., Azzopardi, N., Dorval, E., ... & Paintaud, G. (2009). An enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of cetuximab. *Therapeutic drug monitoring*, 31(5), 597-601.

-CHABANNES, E., BERNARDINI, S., WALLERAND, H., & BITTARD, H. (2001). L'angiogenèse dans les tumeurs vésicales: indicateur pronostique et cible thérapeutique. *Prog. Urol*, 11(3), 417-427.

-Chabner, B.A., Roberts, T.G.Jr., 2005. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews of Cancer* 5, 65-72.

-Chiesi, F., Primi, C., Bilgin, A. A., Lopez, M. V., del Carmen Fabrizio, M., Gozlu, S., & Tuan, N. M. (2016). Measuring university students' approaches to learning statistics: An invariance study. *Journal of Psychoeducational Assessment*, 34(3), 256-268.

-Chodez, M., Fiard, G., Arnoux, V., Descotes, J. L., & Long, J. A. (2015). Ablative treatments in localized renal cancer: literature review for 2014. *Progres en urologie: journal de l'Association francaise d'urologie et de la Societe francaise d'urologie*, 25(9), 499-509.

-Couch, D. B. (1996). Carcinogenesis: basic principles. *Drug and chemical toxicology*, 19(3), 133-148.

**-D-**

-Deltour, S., Chopin, V., & Leprince, D. (2005). Modifications épigénétiques et cancer. *médecine/sciences*, 21(4), 405-411.

-Drug repositioning and repurposing: terminology and definitions in literature. *Drug discovery today*, 20(8), 1027-1034.

**-E-**

-El Mesbahi, O., Tournigand, C., & Benbrahim, Z. (2011). Toxicité cardiovasculaire des thérapies antiangiogéniques. *La Revue de médecine interne*, 32(6), 369-372.

**-F-**

-Faure, S. (2015). Thérapies ciblées anticancéreuses (1/2). *Actualités pharmaceutiques*, 54(546), 57-61.

-Ferrara, N., Hillan, K. J., & Novotny, W. (2005). Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochemical and biophysical research communications*, 333(2), 328-335.

-Ferrari, S. M., Fallahi, P., Politti, U., Materazzi, G., Baldini, E., Ulisse, S., ... & Antonelli, A. (2015). Molecular targeted therapies of aggressive thyroid cancer. *Frontiers in endocrinology*, 6, 176.

-Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New england journal of medicine*, 285(21), 1182-1186.

-Fridman, W. H., & Sautès-Fridman, C. (2014). Le microenvironnement tumoral-Matrice nourricière, champ de bataille et cible thérapeutique des cancers. *médecine/sciences*, 30(4), 359-365.

**-G-**

-Garrido-Urbani, S., Jaquet, V., & Imhof, B. A. (2014). ERO, NADPH oxydases et vascularisation des tumeurs. *médecine/sciences*, 30(4), 415-421.

-Giacomini, A., Chiodelli, P., Matarazzo, S., Rusnati, M., Presta, M., & Ronca, R. (2016). Blocking the FGF/FGFR system as a two-compartment antiangiogenic/antitumor approach in cancer therapy. *Pharmacological Research*, 107, 172-185.

-Gingras, D., & Béliveau, R. (1997). L'angiogenèse tumorale: une nouvelle cible thérapeutique anticancéreuse.

Givel, J.C., Langer, I., Demartines, N., 2007. Surgery. *Revue Médicale Suisse* 17, 116-118.

-Gligorov, J., & Lévy, B. (2014). La lymphangiogenèse. Bases physiologiques et approches physiopathologiques. *e-VEGF-IMMUNO-actu*, 9(1), 5-8.

-Gothié, E., & Pouyssegur, J. (2002). HIF-1: régulateur central de l'hypoxie. *médecine/sciences*, 18(1), 70-78.

-Grossman, H. B., Lamm, D. L., Kamat, A. M., Keefe, S., Taylor, J. A., & Ingersoll, M. A. (2016). Innovation in bladder cancer immunotherapy. *Journal of Immunotherapy*, 39(8), 291-297.

**-H-**

-Haider-Markel, D. P., & Joslyn, M. R. (2001). Gun policy, opinion, tragedy, and blame attribution: The conditional influence of issue frames. *Journal of Politics*, 63(2), 520-543.

-Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

-Harro, C. D., Pang, Y. Y. S., Roden, R. B., Hildesheim, A., Wang, Z., Reynolds, M. J., ... & Dillner, J. (2001). Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(4), 284-292.

-Hasmim, M., Messai, Y., Noman, M. Z., & Chouaib, S. (2014). L'hypoxie tumorale-Un déterminant clé de la réactivité stromale et de la réponse antitumorale. *médecine/sciences*, 30(4), 422-428.

-Heckman-Stoddard, B. M., Gandini, S., Puntoni, M., Dunn, B. K., DeCensi, A., & Szabo, E. (2016, February). Repurposing old drugs to chemoprevention: the case of metformin. In *Seminars in oncology* (Vol. 43, No. 1, pp. 123-133). WB Saunders.

-Hellmann, M. D., Friedman, C. F., & Wolchok, J. D. (2016). Combinatorial cancer immunotherapies. In *Advances in immunology* (Vol. 130, pp. 251-277). Academic Press.

-Hennequin, C. (2007). Les thérapies ciblées en association avec la radiothérapie dans le cancer bronchique. *Cancer/Radiothérapie*, 11(1-2), 77-83.

-Hesketh, R. (2013). *Introduction to cancer biology*. Cambridge University Press.

-Higdon, J. V., & Frei, B. (2003). Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions.

-Hubert, Sandra, ABASTADO, Jean-Pierre(2014). Les étapes précoces du processus métastatique. *médecine/sciences*. Vol. 30. no 4:378-384.

## **-I-**

-Ishida, J., Konishi, M., Ebner, N., & Springer, J. (2016). Repurposing of approved cardiovascular drugs. *Journal of translational medicine*, 14(1), 269.

## **-J-**

-Jeong D E, Song H J, et al (2015). "Repurposing the anti-malarial drug artesunate as a novel therapeutic agent for metastatic renal cell carcinoma due to its attenuation of tumor growth, metastasis, and angiogenesis." *Oncotarget* 6(32): 33046-33064.

-Junien, C. (1986). Les antioncogènes.

### **-K-**

-Kahn, A. (1987). Mutation, régulation, prédisposition et correction... la génétique" super-star".

-King, R.J.B., Cancer biology. Edition Harlow, Essex (England), 1996, 227p.

-Klopfleisch, R. (2016). Basic Principles of Carcinogenesis. In *Veterinary Oncology* (pp. 1-17). Springer, Cham.

-Knighton, D., Ausprunk, D., Tapper, D., & Folkman, J. (1977). Avascular and vascular phases of tumour growth in the chick embryo. *British journal of cancer*, 35(3), 347.

-Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L., & Claesson-Welsh, L. (2011). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochemical journal*, 437(2), 169-183.

-Kuhnt, T., Stang, A., Wienke, A., Vordermark, D., Schweyen, R., & Hey, J. (2016). Potential risk factors for jaw osteoradionecrosis after radiotherapy for head and neck cancer. *Radiation Oncology*, 11(1), 101.

-Ku wagata, M., Y. Sakai, et al. (2019). "Historical control data on developmental toxicity studies in rats." *Congenital anomalies* 59(4): 125-131.

### **-L-**

-Lataillade, J. J., Albanese, P., & Uzan, G. (2010, April). Implication de l'acide hyaluronique dans l'angiogenèse normale et pathologique, application à l'ingénierie cellulaire. In *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie* (Vol. 137, pp. S15-S22). Elsevier Masson

-Lecler, Sylvain, Takakura, Yoshitane, et Meyreus , Patrick (2005). Properties of a three-dimensional photonic jet. *Optics letters*.vol. 30. no 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.

-Li, H., Kilpeläinen, T. O., Liu, C., Zhu, J., Liu, Y., Hu, C., ... & Wu, Y. (2012). Association of genetic variation in FTO with risk of obesity and type 2 diabetes with data from 96,551 East and South Asians. *Diabetologia*, 55(4), 981-995.

-Liotta, L.A., 1992. Cancer cell invasion and metastasis. *Scientific American* 266, 54-59.

### **-M-**

-Macdonald, F., Ford, C.H.J., Casson, A.G., Molecular biology of cancer. BIOS Scientific Publishers ++(Oxford), 2003, 277p.

-Mandriota, S. J., & Pepper, M. S. (1998). Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circulation research*, 83(8), 852-859.

-Mareel, M., & Leroy, A. (2003). Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiological reviews*, 83(2), 337-376.

-Martin, P. M., Dussert, C., & Ouafik, L. H. (2010). Stroma: partenaire actif mais sous-estimé de la tumorigénèse, «quand le dialogue remplace le monologue». *Oncologie*, 12(5-6), 303-321.

-Martin, P. M., & L'H, O. (2012). Angiogenèse: retour au fondamental. *Oncologie*, 14(4), 199-215.

-Maudelonde, T. (2004). Vieillissement et cancer. Société Française de Sénologie et de Pathologie Mammaire-SFSPM.

-McLachlan, J., & Banerjee, S. (2015). Pazopanib in ovarian cancer. *Expert review of anticancer therapy*, 15(9), 995-1005.

-Meyer, J.L., Verhey, J. Xia P. Wong, J., 2007. New technologies in the radiotherapy clinic. *Frontiers in Radiation Oncology* 40, 1-17.

-Méjean, A., & Lebre, T. (2008). La cascade métastatique: angiogenèse et nouveaux concepts. *Progrès en urologie*, 18, S156-S166.

-Méjean, A., & Lebre, T. (2010). Diffusion métastatique, angiogenèse et métastasogenèse. *Progrès en urologie*, 20, S5-S10.

-Méjean, A., & Lebre, T. (2008). Angiogenèse: l'exemple du cancer rénal. *Progrès en urologie*, 18, S309-S314.

-Morita, O., J. F. Knapp, et al. (2009). "Effects of green tea catechin on embryo/fetal development in rats." *Food and Chemical Toxicology* 47(6): 1296-1303.

-Morris, M., Knudsen, G. M., Maeda, S., Trinidad, J. C., Ioanoviciu, A., Burlingame, A. L., & Mucke, L. (2015). Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Nature neuroscience*, 18(8), 1183.

-Mucke, H. A. M. (2015). "Drug Repurposing Patent Applications July-September 2015." *Assay and Drug Development Technologies* 13(10): 661-666.

#### **-N-**

-Nakada, K., Kawamura, M., Konishi, H., Iwasaki, T., Murakami, K., Shida, A., ... & Yanaga, K. (2016, March). Current status and perspective in clinical application of biological function test using C-13-breath test. In *Journal of pharmacological sciences* (Vol. 130, No. 3, pp. S65-S65). Editorial off, kantohya bldg gokomachi-ebisugawa nakagyo, kyoto, 604, japan ;japanese pharmacological soc.

#### **-O-**

-Oh, M. D., Choe, P. G., Oh, H. S., Park, W. B., Lee, S. M., Park, J., ... & Kim, N. J. (2015). Middle East respiratory syndrome coronavirus superspreading event involving 81 persons, Korea 2015. *Journal of Korean medical science*, 30(11), 1701-1705.

#### **-P-**

-Paesler, J., Gehrke, I., Gandhirajan, R. K., Filipovich, A., Hertweck, M., Erdfelder, F., ... & Kreuzer, K. A. (2010). The vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors vatalanib and pazopanib potently induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells in vitro and in vivo. *Clinical cancer research*, 16(13), 3390-3398.

-Pasquet, V. (2011). *Recherche bioguidée de molécules anticancéreuses issues de microalgues marines* (Doctoral dissertation, Université de La Rochelle).

-Patel-Hett, S., & D'Amore, P. A. (2011). Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *The International journal of developmental biology*, 55, 353.

-Pepper, M. S. (2000). Angiogenèse et morphogenèse de l'arbre vasculaire: de la biologie cellulaire à la clinique.

-Pezzella, F., Harris, A. L., Tavassoli, M., & Gatter, K. C. (2015). Blood vessels and cancer much more than just angiogenesis.

-Pietrantonio, F., Cremolini, C., Aprile, G., Lonardi, S., Orlandi, A., Mennitto, A., ... & Marmorino, F. (2015). Single-agent panitumumab in frail elderly patients with advanced RAS and BRAF wild-type colorectal cancer: challenging drug label to light up new hope. *The oncologist*, 20(11), 1261-1265.

-Porta, C., Paglino, C., & Mosca, A. (2014). Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Frontiers in oncology*, 4, 64.

-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.

## **-R-**

-Ribatti, D., & Crivellato, E. (2012). "Sprouting angiogenesis", a reappraisal. *Developmental biology*, 372(2), 157-165.

-Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., Roncali, L., Burri, P. H., & Djonov, V. (2001). Chorioallantoic membrane capillary bed: A useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo.

*The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 264(4), 317-324.

-Rössler, J., Taylor, M., Geoerger, B., Farace, F., Lagodny, J., Peschka-Süss, R., ... & Vassal, G. (2008). Angiogenesis as a target in neuroblastoma. *European Journal of Cancer*, 44(12), 1645-1656.

-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-**

-Scannell, J. W., Blanckley, A., Boldon, H., & Warrington, B. (2012). Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. *Nature reviews Drug discovery*, 11(3), 191.

-Stephan, D., Weltin, D., Zaric, V., Chapelon, D., Da Silva, A., & Lugnier, C. (2000). Angiogenèse: de la physiologie à la thérapeutique. *Reanimation Urgences*, 7(9), 534-544.

-Stéhelin, D. (1985). Les oncogènes cellulaires, clés de la cancérogenèse. Bs. 1 :1 :1-16.

### **-T-**

-Taghizadeh Davoudi, E., bin Noordin, M. I., Akbari Javar, H., Kadivar, A., & Sabeti, B. (2014). Sorafenib in renal cell carcinoma. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 27(1).

-Tang, F. Y., Nguyen, N., & Meydani, M. (2003). Green tea catechins inhibit VEGF-induced angiogenesis in vitro through suppression of VE-cadherin phosphorylation and inactivation of Akt molecule. *International journal of cancer*, 106(6), 871-878.

-Thompson-Coon, J., Hoyle, M., Green, C., Liu, Z., Welch, K., Moxham, T., & Stein, K. (2010). Bevacizumab, sorafenib tosylate, sunitinib and temsirolimus for renal cell carcinoma: a systematic review and economic evaluation.

-Tobelem, G. (2008). Angiogenese physiologique et tumorale. *Journal de Chirurgie*, 145(1), 4-7.

-Treps, L., & Gavard, J. (2015). L'angiogenèse tumorale-Quand l'arbre de vie tourne mal. *médecine/sciences*, 31(11), 989-995.

**-W-**

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

-Weber, A. J., & De Bandt, M. (2000). Angiogenèse: mécanismes généraux et implications au cours de la polyarthrite rhumatoïde. *Revue du rhumatisme*, 67(8), 573-592.

-Wilhelm, S. M., Carter, C., Tang, L., Wilkie, D., McNabola, A., Rong, H., ... & Cao, Y. (2004). BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer research*, 64(19), 7099-7109.

**-Y-**

-Young, C. W., & Burchenal, J. H. (1971). Cancer chemotherapy. *Annual review of pharmacology*, 11(1), 369-386.

**-Z-**

-Szekanecz, Z., Besenyi, T., Paragh, G., & Koch, A. E. (2010). Actualités sur l'angiogenèse synoviale. *Revue du rhumatisme*, 77(1), 14-20.

## Résumé

Au cours des dernières années, des thérapies anti-cancéreuses ciblant l'angiogenèse tumorale ont été développées et ont démontré un bénéfice en terme de survie globale pour les patients atteints de certains cancers métastatiques.

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

A des doses de saturation, l'extrait aqueux de *Camellia sinensis* diminue 92% de la vascularisation de la CAM ; le Daflon l'augmente de 80% et le Cefazal 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 thé vert affiche des tendances antiangiogénique, alors que le cefazal semble être inerte. . Donc, le thé vert mérite une exploration approfondie de son potentiel angiostatique dans le cadre d'une approche thérapeutique.

**Mots-clés :** Cancer, Cefazal, Daflon, *Camellia sinensis*, L'angiogenèse, Membrane chorioallantoïdienne (CAM).

## Abstract

Several anti-tumoral therapies targeting angiogenesis have been developed over the recent years and have demonstrated benefits for several metastatic cancers.

Herein, we explored, *in ovo*, the inhibitory effect of Cefazal, an antibiotic drug; and Daflon, a vasoprotective flavonoids mixture and *Camellia sinensis* plant decoction against the vascularization of the chorioallantoic membrane (CAM).

Our findings suggest an angiostatic effect of *Camellia sinensis* aqueous extract estimated to be approximately 92% of the CAM vasculature. Whoever, Daflon increased the vasculature density of the CAM by almost 80%. Finally, Cefazal, seems to not interfere with the CAM vessels.

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

**Key words:** Cancer, Cefazal, Daflon, *Camellia sinensis*, angiogenesis, chorioallantoic membrane (CAM).

## الملخص

في السنوات الأخيرة، تم تطوير علاجات مضادة للسرطان تستهدف تكوين الأوعية الدموية للورم وأظهرت فائدة من حيث البقاء الكلي للمرضى الذين يعانون من بعض أنواع السرطان المنتقلة.

من خلال هذا العمل تم استكشاف التأثير المثبط للجزيئات الصغيرة بما في ذلك أدوية حيث استعملنا Daflon ,

Cefazal و مستخلص نبات *Camellia sinensis* في مواجهة الأوعية الدموية للغشاء المشيمي (CAM).

تُظهر النتائج تأثيرًا محفزًا لـ Daflon يقارب 80 % ; ومضادًا يقدر 92% للمستخلص المائي لـ

*Camellia sinensis* و غياب التأثير فيما يتعلق بـ Cefazal بالجرعات المركزة جدا.

مما سبق يظهر ان الشاي الاخضر يمكن ان يرشح لدراسات معمقة قصد استعماله كعلاج مضاد لتخليق الاوعية

الدموية لدى مرضى السرطان.

**الكلمات المفتاحية :** السرطان, Cefazal, , Daflon, *Camellia sinensis*, تخليق الأوعية الدموية, الغشاء المشيمي

السقائي.

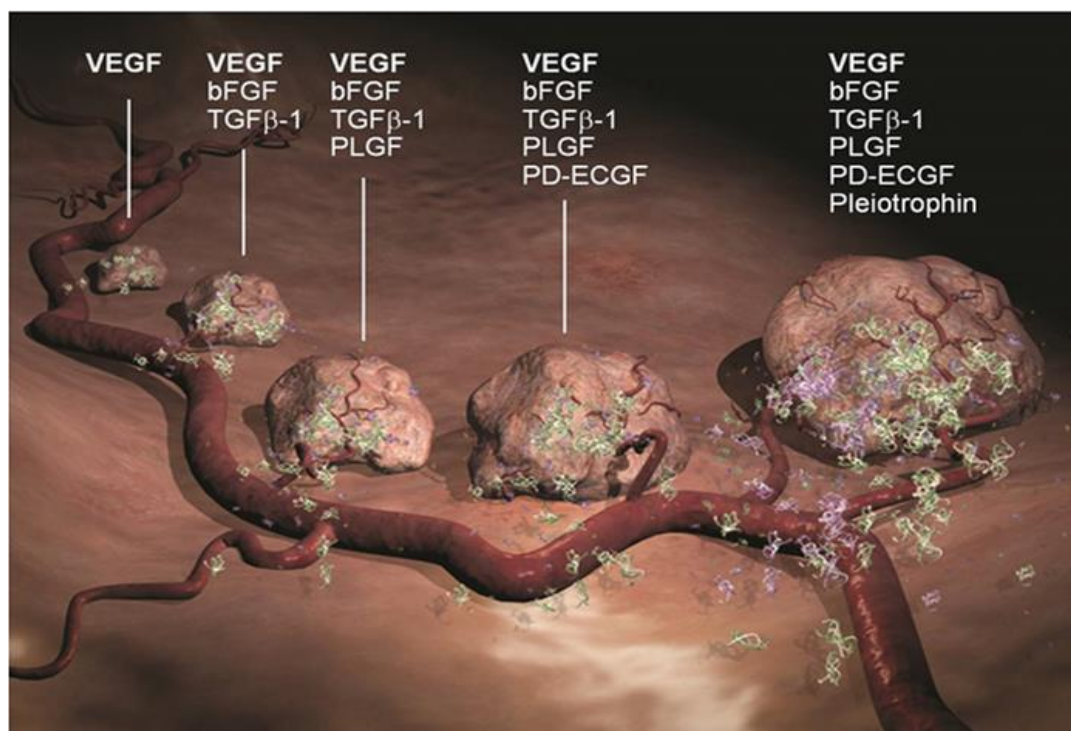
*Annexes*

## Annexes

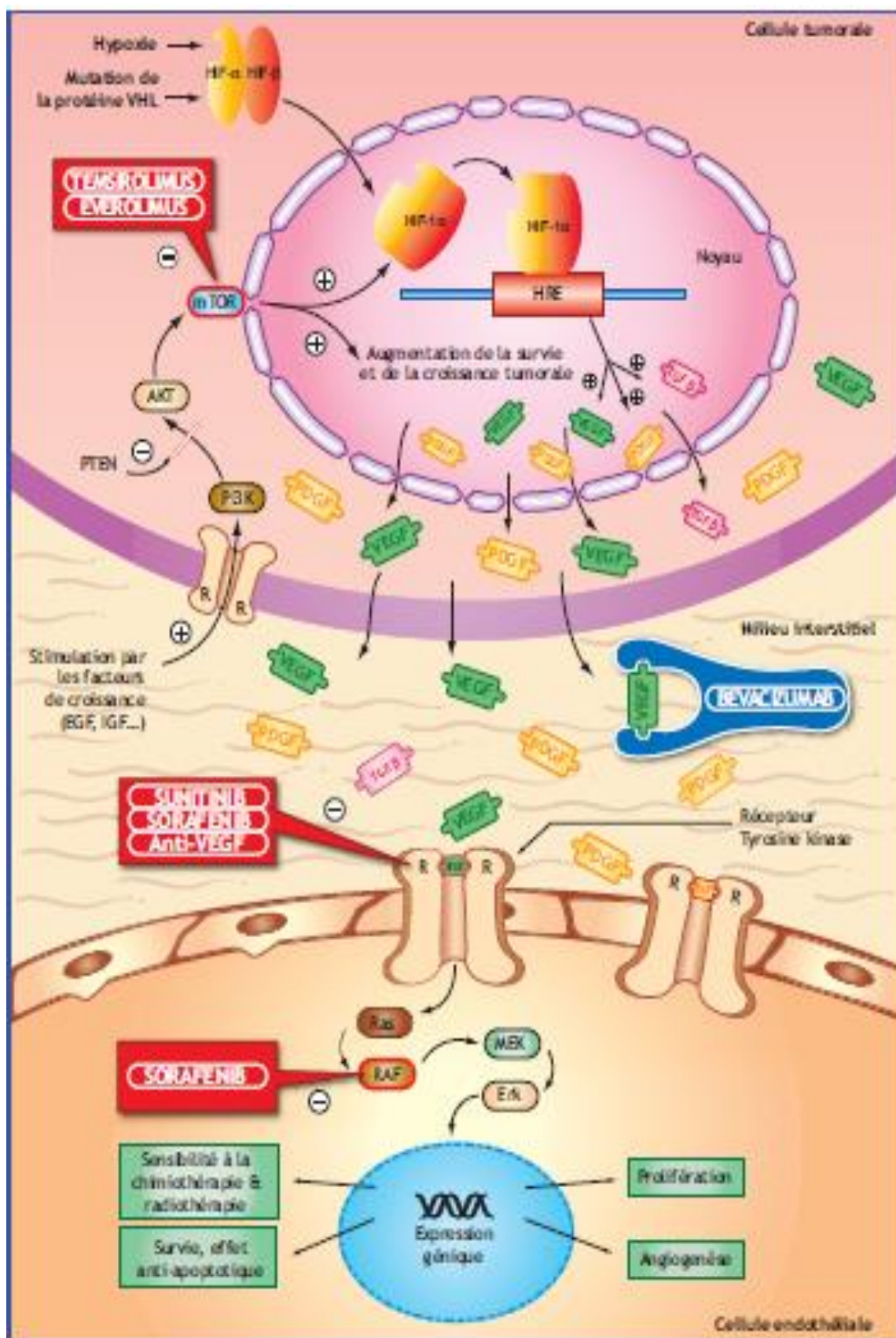
## Annexe 01 : Les principaux facteurs angiogéniques.

| Facteurs angiogéniques                            | Effets biologiques                                                                                                                                                                | Implication en cancérologie                                                                                                     | Anticorps en développement                                                                                                  |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| VEGF-VEGFR                                        | VEGFR-1 : (+) migration des cellules endothéliales (CE)<br>VEGFR-2 : (+) survie, capacité de migration et prolifération<br>(+) Perméabilité vasculaire                            | L'hypoxie induit l'expression du VEGF-A [3]<br>Le VEGF-A est surexprimé dans de nombreux modèles tumoraux [4, 5]                | AMG-706, HuM833 (anti-VEGF)<br>IMC-1C11, DC101 (anti-VEGFR-2) [12]<br>IMC-V18 (anti-VEGFR-1)                                |
| PDGF-PDGFR                                        | (+) Prolifération des péricytes et des cellules musculaires lisses<br>(+) Migration, assemblage dans la paroi vasculaire [17]                                                     | Surexpression du PDGF dans plusieurs types de cancers (pancréas, poumon)                                                        | 1B3 [18]<br>(anti-PDGFR $\beta$ )<br>3G3 (anti-PDGFR $\alpha$ )                                                             |
| FGF-FGFR                                          | (+) Prolifération et migration des CE (autocrines) [19]<br>(+) Morphogenèse des microcapillaires                                                                                  | FGF : surexpression fréquente (prostate, mélanome)<br>FGFR : surexpression et/ou mutations activatrices (vessie, sein, estomac) | KM1334 [20] (anti-FGFRb)<br>IMC-A1, IMC-4H, IMC-H7 (anti-FGFR1)                                                             |
| TGF $\beta$ -TGF $\beta$ R                        | (+) Angiogenèse<br>(+) Potentiel métastatique des cellules tumorales                                                                                                              | Surexpression de TGF $\beta$ (prostate) + phénotype tumoral agressif [21]                                                       | Anti-TGF $\beta$ [22]                                                                                                       |
| Angiopoïétines (Ang-1, Ang-2) et leurs récepteurs | Ang-1 et Ang-2 lient le récepteur Tie-2<br>Ang-1 : (+) survie des CE, intégration dans la paroi vasculaire<br>Ang-2 : (+) prolifération et migration des CE (si VEGF et FGF) [23] | Tie-2 : sélectivement exprimé par les CE<br>La neutralisation d'Ang-2 diminue la densité microvasculaire tumorale               | Anti-Ang-2 [24]                                                                                                             |
| Intégrines                                        | (+) Adhésion cellule-cellule<br>(+) Adhésion cellule-MEC                                                                                                                          | (+) Migration et angiogenèse (via l'organisation du cytosquelette, la forme et la motilité des cellules endothéliales)          | Anti- $\alpha$ v $\beta$ 3<br>Étaracizumab (Abégrin®) a été testé avec succès en phase I, est actuellement en phase II [25] |

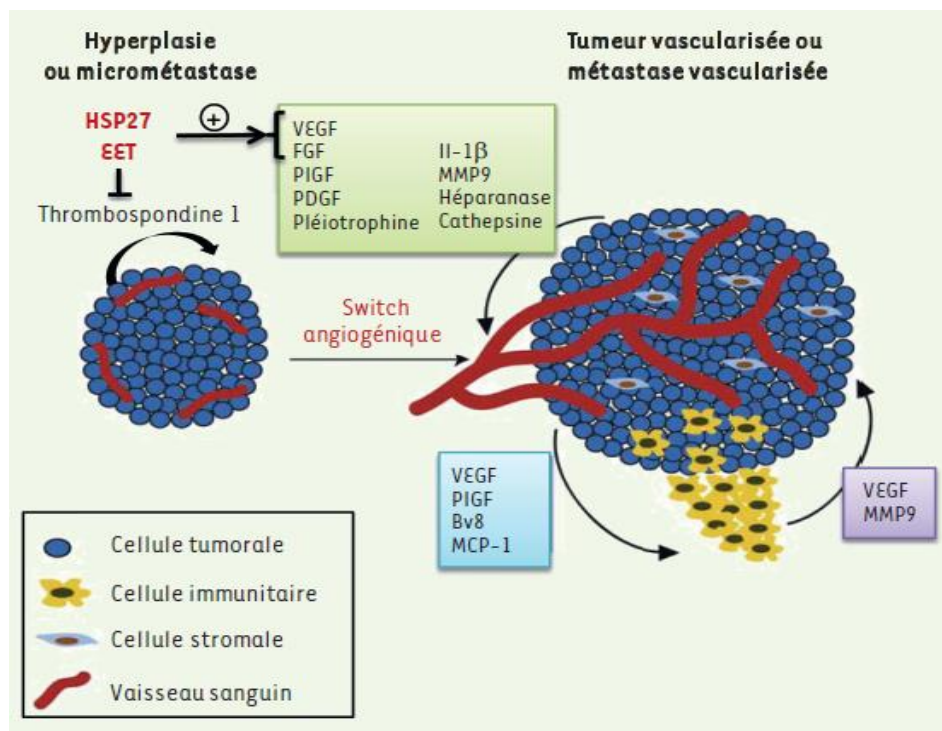
## Annexe 02 : VEGF Amplification de l'angiogenèse tumorale par apport de facteurs de croissance.



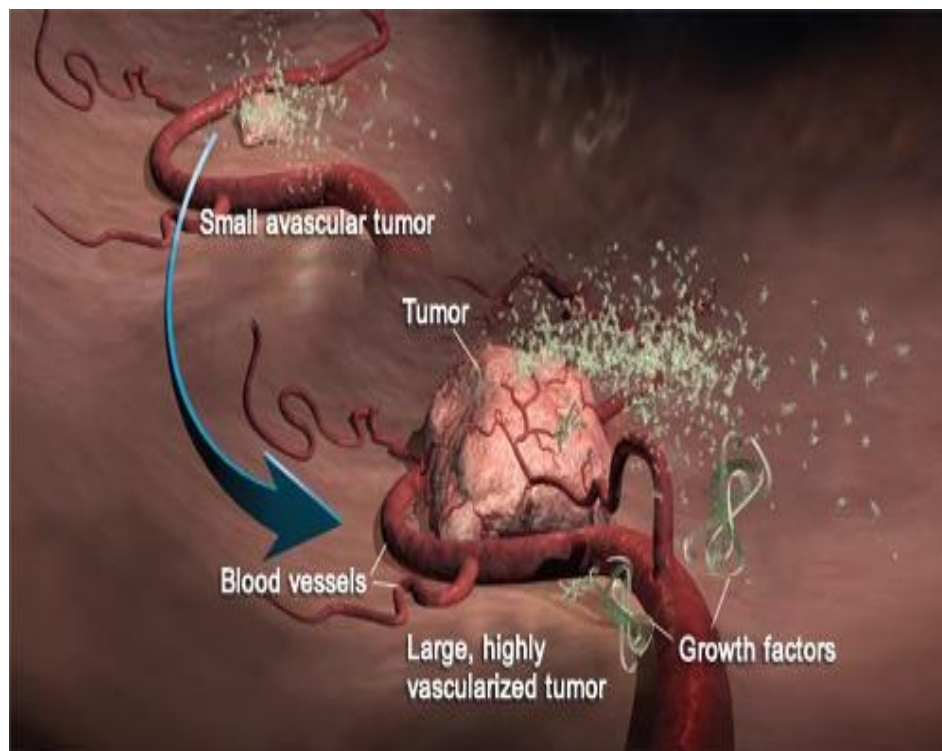
Annexe 03 : Action des molécules ciblées

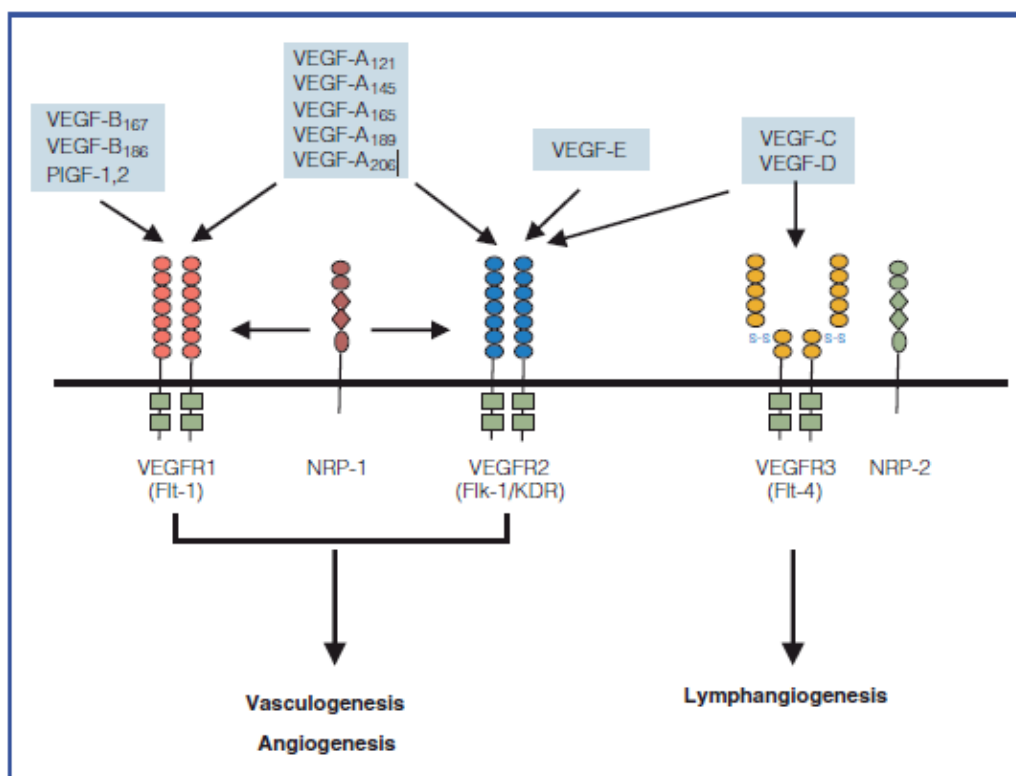
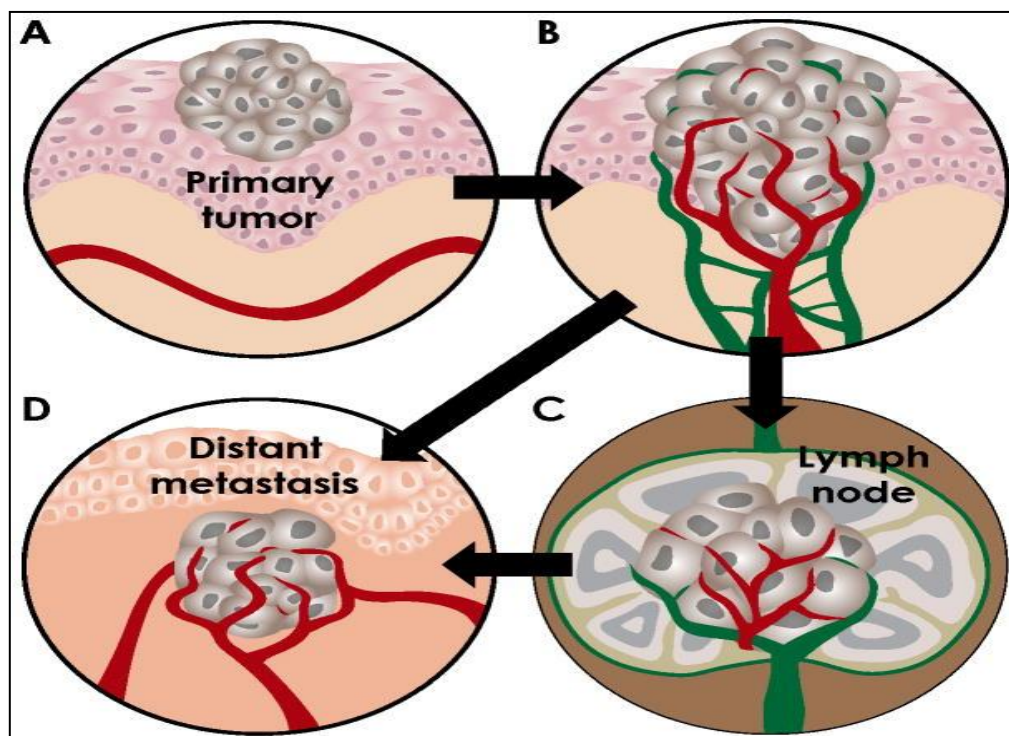


**Annexe 04 :** Représentation schématique des médiateurs moléculaires et cellulaires du switch angiogénique.



**Annexe 05 :** L'angiogenèse est une caractéristique de la tumeur (Hanahan et *al*, 2000)



**Annexe 06 : Les récepteurs de VEGF et liaison avec la famille VEGF.**

**Annexe 07 : Angiogenèse et métastase.**


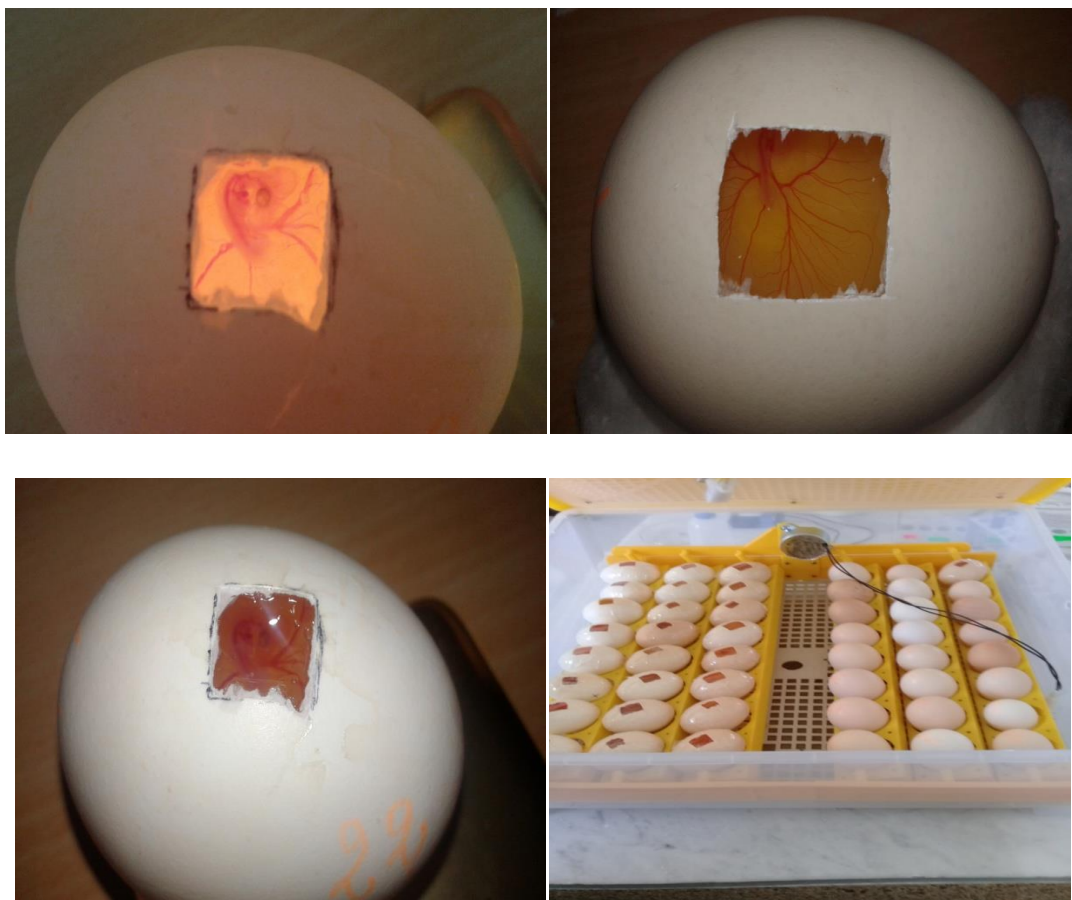
**Annexe 08 : Le prélèvement de l'albumine.**



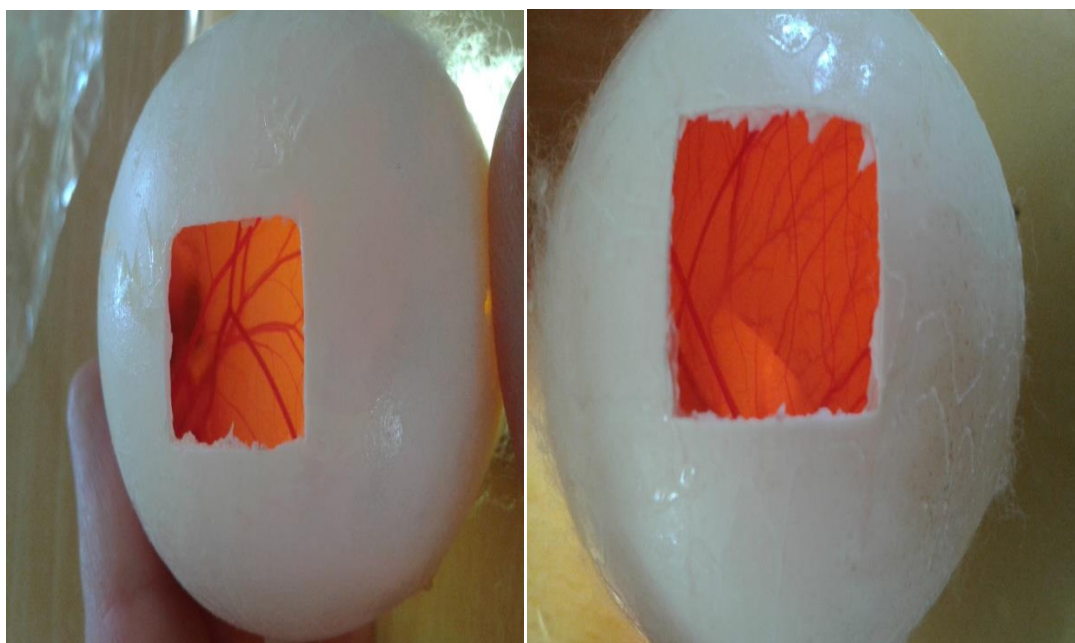
**Annexe 09 : Une fenêtre d'environ 1cm de diamètre découpée dans la coquille des oeufs**



**Annexe 10 : La révélation de la membrane chorioallantoïdienne**



**Annexe 11 : Le déroulement du test CAM.**





**Annexe 12 : Observation du CAM sous stéréomicroscope.**

