

UNIVERSITE DE STRASBOURG

FACULTE DE CHIRURGIE DENTAIRE

Année 2015

N°31

THESE

Présentée pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Chirurgie Dentaire

par

ANDRIANASOLO Tatiana

née le 27/04/1987 à Antananarivo

Développement d'un modèle *in vitro* de la vascularisation tumorale

Président : Professeur TENENBAUM Henri
Asseseurs : Docteur BAH-GROSS Sophie
Docteur FIORETTI Florence
Docteur BENKIRANE-JESSEL Nadia
Docteur KELLER Laetitia

A Monsieur le Professeur TENENBAUM Henri,

Nous sommes honorés de votre présence et par votre accord de présider notre jury de thèse. Nous vous assurons nos sincères remerciements et notre profond respect. Merci pour votre disponibilité pour répondre aux différents e-mails.

A Madame le Docteur FIORETTI Florence,

Veillez trouver ici l'expression de notre reconnaissance d'avoir spontanément accepté de diriger ce travail ainsi que pour votre implication. Malgré l'éloignement, merci pour votre précieuse collaboration, votre patience et la bienveillance que vous nous avez offertes.

A Madame le Docteur BAHI-GROSS Sophie,

Nous vous remercions pour l'intérêt spontané que vous avez porté à notre travail et pour avoir accepté de siéger dans ce jury. Votre enthousiasme quotidien dans l'exercice de votre activité est une inspiration à nos yeux. Nous vous exprimons notre profonde estime et notre sympathie.

A Madame le Docteur BENKIRANE-JESSEL Nadia,

Tous nos remerciements pour votre participation à ce jury. Nous avons été très touchés de votre accueil et de vos encouragements au sein du laboratoire. Nous gardons un souvenir chaleureux et mémorable de votre équipe.

A Madame le Docteur KELLER Laetitia,

Nous vous remercions d'avoir accepté de faire partie des membres du jury. Nous témoignons notre profonde gratitude pour vos compétences et vos qualités humaines durant l'encadrement au laboratoire. Merci pour vos conseils, votre patience et votre gentillesse.

A mes parents et à mes frères, Rodisse Michel, Marie Antoinette, Michael Tiavina, Rhoddy Tanjona, *je vous remercie de tout mon cœur pour vos prières, vos encouragements et votre soutien infaillible durant toutes mes études et ma vie en générale.*

A Dimby Niaina, *je te remercie pour ton amour et ta patience. Tu y es aussi pour beaucoup dans la réussite dans mes études. Sans toi, je n'aurai pu arriver aux termes de la PACES et de l'équivalence du Diplôme. Tu as su me guider et me remonter le moral. Nous avons de la chance de t'avoir dans notre vie et de prendre soin de nous.*

Aux autres membres de ma famille, oncles, tantes, cousins, cousines, *merci sincèrement pour vos prières et vos encouragements.*

A la grande famille Andrianasolo et Rakotondrasoa,... *merci pour votre accueil toujours chaleureux.*

La grande famille Razafintsambaina, Robin, Harisoa, Felana et Ambinintsoa,... *merci de m'avoir accepté à bras ouvert dans votre famille.*

A mes amis d'enfance, Miarilanja, Olga, Zo, Santatra,... *merci pour vos prières et pour avoir gardé le contact malgré l'éloignement.*

A mes amis d'Algérie, Mihaja, Anja, Zo, Joe, Judicaël, Nassima, ... A mes amis en France, Juliette et Jean-Michel, Olivier, Nadine, Marie-Charlotte, Mélanie, Timothé, Tiana et sa maman, Annic et Roméo, Valérie, Léa, Déborah, Fadila,... *merci pour vos encouragements.*

A Andriamanitra, *merci infiniment. Pour Ta présence dans nos vies. Pour tout.*

TABLES DES MATIERES

INTRODUCTION.....	8
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	11
1 Tumeurs solides.....	12
1.1 Données épidémiologiques.....	12
1.2 Définition et classification.....	12
1.3 Diagnostic.....	14
1.4 Environnement tumoral.....	15
1.4.1 Angiogenèse.....	15
1.4.2 Particularités des vaisseaux tumoraux.....	17
1.4.3 Cellules souches cancéreuses.....	21
1.5 Facteurs influençant la progression tumorale.....	24
1.5.1 Développement des métastases.....	24
1.5.2 Obstacles entravant les thérapeutiques.....	25
1.5.3 Résistance aux médicaments.....	25
1.6 Traitements des tumeurs solides.....	27
1.6.1 Traitement conventionnel.....	27
1.6.2 Traitements novateurs.....	29
2 Ostéosarcomes.....	38
2.1 Caractéristiques histologiques.....	38
2.2 Localisation.....	39
2.3 Incidence.....	39
2.4 Pronostic.....	39
2.5 Etiopathogénie.....	40
2.6 Diagnostic.....	41
2.6.1 Symptômes et signes cliniques.....	41
2.6.2 Examens radiologiques.....	41
2.6.3 Examen de la biopsie.....	42
2.7 Classification.....	43
2.8 Différentes formes.....	45
2.9 Ostéosarcome de la tête et du cou.....	46
2.9.1 Ostéosarcome des maxillaires.....	46
2.9.2 Etude de cas.....	47
2.9.3 Ostéosarcome du larynx.....	48
2.10 Développement des métastases.....	48

2.11	Traitements	49
2.11.1	Evaluation des risques	50
2.11.2	Chirurgie.....	50
2.11.3	Chimiothérapie	50
PARTIE RECHERCHE		52
1	Introduction	53
2	Objectif.....	54
3	Matériels et méthode	54
3.1	Formation des membranes nanofibreuses par electrospinning.....	54
3.2	Cultures cellulaires	56
3.2.1	Lignée tumorale issue d'ostéosarcome MG-63	56
3.2.2	Cellules endothéliales primaires HUVEC	56
3.2.3	Décongélation des cellules	56
3.3	Co-culture.....	56
3.3.1	Trypsinisation et ensemencement.....	56
3.3.2	Protocole expérimental.....	57
3.4	Etude de la culture cellulaire des MG-63 sur les membranes de PCL par Alamar Blue ®...	58
3.5	Immunofluorescence indirecte	59
4	Résultats et discussion.....	60
4.1	Analyse de la prolifération cellulaire des MG-63 sur membrane de PCL.....	60
4.2	Analyse de la morphologie cellulaire des HUVEC cultivées sur membrane de PCL	61
4.3	Organisation cellulaire des co-cultures sur membranes de PCL	62
4.4	Organisation cellulaire des co-cultures sur lamelle de verre	63
5	Conclusion et perspective.....	65
CONCLUSION.....		66
BIBLIOGRAPHIE.....		71

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
BMP	bone morphogenetic protein
CIRC	centre international de la recherche sur le cancer
CO ₂	dioxyde de carbone
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DMEM	dulbecco's modified eagle medium
DMSO	diméthylsulfoxyde
FACS	fluorescence activated cell sorter
FDA	food and drug administration
Ga ⁶⁷	gallium 67
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
INSERM	institut national de la santé et de la recherche médicale
INVS	institut national de veille sanitaire
IRM	imagerie par résonance magnétique
MEC	matrice extracellulaire
MMP	métalloprotéase
MG-63	cellule humaine issue d'ostéosarcome
ORL	oto-rhino-laryngologie
PBS	phosphate buffered saline
PCL	polycaprolactone
PEDF	pigment epithelium-derived factor
PFA	paraformaldéhyde
SVF	sérum de veau fœtal
TNM	tumor nodes metastasis
UMR	unité mixte de recherche
UV	ultra-violet
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor

INTRODUCTION

Le cancer est une maladie particulièrement complexe et est l'une des principales causes de mortalité dans les pays développés. Selon les estimations de l'institut national de veille sanitaire (INVS), les cancers représentent globalement 27 % de l'ensemble des causes de décès. Chez l'homme, ils occupent la première cause de mortalité et chez la femme la deuxième après les maladies cardio-vasculaires [Cherie, 1999]. L'incidence du cancer est en augmentation, le centre international de la recherche sur le cancer (CIRC) évalue à 21,4 millions le nombre de nouveaux cas de cancer dans le monde pour 2030 et à 13,2 millions celui des décès dus au cancer en raison de la croissance et du vieillissement de la population et de la réduction de la mortalité infantile et des décès par les maladies infectieuses [Ferlay, 2010]. La survie des patients varie considérablement selon le type et la localisation du cancer.

Des recherches récentes ont montré que le cancer a l'impact économique le plus dévastateur de toutes les causes de décès confondus dans le monde. En effet, les coûts financiers du cancer sont élevés tant pour le patient que la société dans son ensemble [Yabroff, 2011]. En effet, un diagnostic tardif conduit non seulement à des coûts plus élevés de traitement mais expose aussi à une issue plus négative. L'amélioration du diagnostic précoce et des traitements est un véritable enjeu de santé publique.

Les événements qui conduisent une cellule normale à se transformer en cellule tumorale sont encore mal connus. Des facteurs exogènes, des causes environnementales et des facteurs endogènes telles que des modifications moléculaires ou des altérations cellulaires multiples peuvent en être responsables [Herino, 2007]. Les chercheurs font continuellement des découvertes qui enrichissent notre compréhension du cancer et qui permettent des avancées en matière de détection et de prévention, d'identification de nouvelles approches thérapeutiques. A cet effet, la médecine personnalisée encourage la prise en charge de chaque patient de façon individualisée en fonction des spécificités génétiques et biologiques de sa tumeur [Goupillon-Senghor, 2012].

Dans le premier temps, une analyse bibliographique sera effectuée sur le développement des lésions tumorales solides et leur environnement moléculaire et cellulaire qui influence leur malignité et leur vascularisation. Celle-ci s'interrogera sur l'implication de cette vascularisation dans le mécanisme de croissance des tumeurs solides, dans le développement des métastases et des récidives et dans la réponse aux traitements. Les différentes stratégies prometteuses ciblant la vascularisation tumorale seront étudiées. Par ailleurs, un exposé sera proposé sur l'ostéosarcome, la plus fréquente des tumeurs osseuses primitives malignes qui touchent essentiellement les enfants et adolescents

Dans un deuxième temps, les résultats d'une étude réalisée au laboratoire « NanoMédecine Régénérative Ostéoarticulaire et Dentaire » UMR INSERM 1109 seront présentés ayant pour but le développement d'un modèle *in vitro* de la vascularisation des tumeurs solides à partir d'une membrane nanostructurée de polycaprolactone.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Tumeurs solides

1.1 Données épidémiologiques

Il y a une tendance à la hausse de l'incidence du cancer, c'est une des principales causes de mortalité infantile [Rossleigh, 1990]. Sur 58 millions de décès à travers le monde, 7,6 millions de personnes sont mortes du cancer en 2005. Les décès suite aux cancers vont continuer à augmenter : d'environ 9 millions en 2015 et 11,4 millions en 2030 [Gavhane, 2011].

Plus de 85% des cancers sont des tumeurs solides [Jain, 2010]. La fréquence de la méningite carcinomateuse a augmenté au cours des deux dernières décennies, il s'agit d'une complication rare des tumeurs solides. La survie est d'environ 2 à 3 mois en moyenne, le traitement actuel combine une radiothérapie et une chimiothérapie systémique ou intraveineuse. [Jayson, 1996]

1.2 Définition et classification

Les tumeurs solides sont des masses anormales de tissus qui en général ne contiennent pas de kystes ou de zones liquides, elles peuvent être bénignes (non cancéreuses) ou malignes (cancéreuses). Il existe différentes types de tumeurs solides en fonction du type de cellules qui la compose :

- Les sarcomes sont composés de tissus conjonctifs ou de tissus de soutiens tels que les os ou les muscles.
- Les carcinomes sont des tumeurs composées de cellules épithéliales.
- Les lymphomes sont des tumeurs des organes lymphoïdes tels que les ganglions lymphatiques, la rate et le thymus qui produisent et stockent les cellules immunitaires. Ces cellules étant présentes dans presque tous les tissus du corps, les lymphomes peuvent donc se développer dans une grande variété d'organes. Les lymphomes de Hodgkin touchent les ganglions lymphatiques périphériques, surviennent le plus souvent chez les patients de 20 à 30 ans. Les lymphomes non hodgkiniens surviennent chez l'enfant le plus souvent au niveau de l'intestin, en particulier dans la région adjacente à l'appendice, et dans la partie centrale supérieure de la poitrine. D'autres organes peuvent être touchés, le foie, la rate, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques, le système nerveux central et les os.

Il existe de nombreux types de tumeurs solides différentes notamment de par l'origine de leurs cellules, de leur localisation (tableau 1, Figure 1).

Tumeur	Type cellulaire	Localisation	Incidence
Neuroblastome	Cellules nerveuses	Glandes surrénales	
Tumeur de Wilms	Cellules rénales	Rein les deux reins touchés dans 5% des cas	De l'enfance jusqu'à 15 ans
Rétinoblastome	Cellules somatiques Cellules germinales Cellules rétinienne	Œil les deux yeux touchés dans 1/3 des cas	Facteur héréditaire en cause
Rhabdosarcome	Cellules musculaires	Tête++, cou++ Bassin Au niveau des extrémités	Homme ++
Ostéosarcome	Cellules ostéoblastiques	Extrémité des os : fémur++, humérus++, tibia++	10 à 25 ans Homme ++
Sarcome d'Ewing	Cellules mésenchymateuses	Os, exceptés les os longs des membres	10 à 25 ans

Tableau 1 Types de tumeurs solides [Gavhane, 2011].

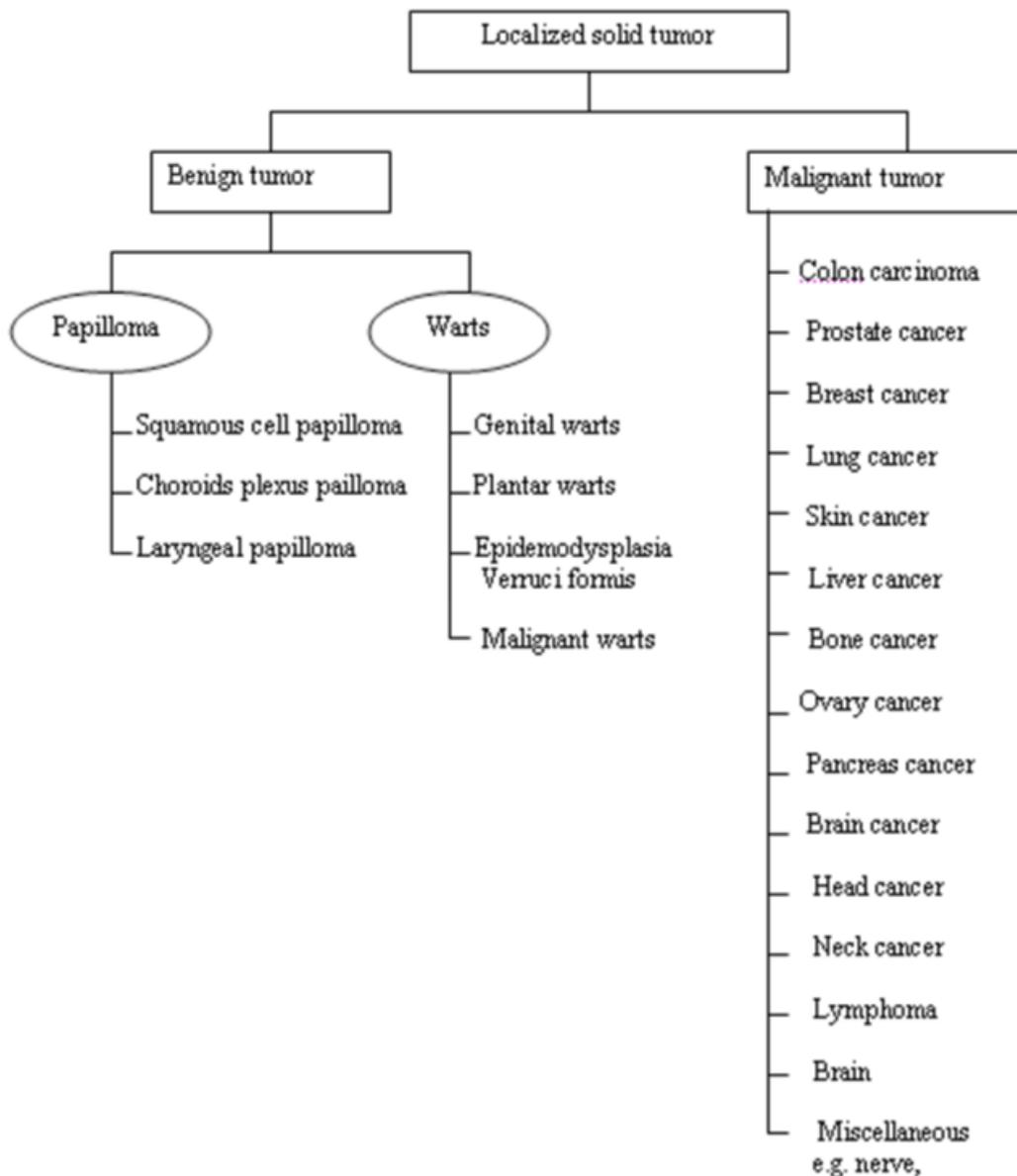


Figure 1 Différents types de tumeurs solides [Gavhane, 2011].

1.3 Diagnostic

La détection précoce et la stadification précise sont essentielles pour la guérison et le contrôle adéquat de la maladie et ont un effet positif sur la survie [Rossleigh, 1990], l'évaluation commence par une anamnèse, un examen physique et des radiographies standards.

Une étude rétrospective réalisée chez des enfants atteints de tumeurs solides a montré que la scintigraphie au Ga^{67} associée à une tomographie à émission photon unique offre plusieurs avantages : d'abord une meilleure localisation anatomique grâce une amélioration de la visualisation en trois dimensions, ensuite une meilleure définition de la lésion grâce à un contraste plus marqué et enfin une meilleure délimitation du site [Rossleigh, 1990]. Ces

améliorations sont très utiles dans la population pédiatrique où l'interprétation des imageries standards peut être difficile en raison de leur petite taille.

L'imagerie par résonance magnétique est le meilleur moyen pour évaluer les tissus mous, la relation de la tumeur avec les tissus environnants, les vaisseaux et les nerfs, et son extension médullaire, la qualité de cet examen radiologique est essentielle pour une exérèse chirurgicale plus sûre [Ritter, 2010].

1.4 Environnement tumoral

L'environnement cellulaire et la vascularisation des tumeurs solides constituent le « microenvironnement tumoral » [Trédan, 2007]. Ce microenvironnement est hétérogène et complexe, il comprend les cellules cancéreuses et les cellules hôtes du stroma (tels que les cellules endothéliales, les fibroblastes, les diverses cellules du système immunitaire, les cellules inflammatoires...) incorporées dans une matrice extracellulaire et nourries par un réseau vasculaire. La tumeur détourne le potentiel des cellules immunitaires de l'hôte car elles produisent des signaux proangiogéniques, pro-invasifs et pro-tumorigènes au lieu d'initier et d'activer une réponse immunitaire antitumorale puissante [Wojton, 2010].

La matrice extracellulaire dans les tumeurs solides est composée de sécrétions variées de protéines et de protéoglycanes produites par les cellules stromales normales et les cellules néoplasiques [Wojton, 2010]. Le nombre de fibroblastes qui synthétisent les facteurs de croissance, des chimiokines et des molécules d'adhérence est augmenté [Trédan, 2007]. Ce taux élevé de facteurs de croissance stimule alors les cellules cancéreuses, d'où une augmentation exponentielle de l'activité et des sécrétions cellulaires, ainsi que des composants de la matrice extracellulaire [Wojton, 2010]. L'altération dans la régulation du cycle cellulaire est en faveur de la prolifération cellulaire [PosthumaDeBoer, 2011].

1.4.1 Angiogenèse

Le mécanisme qui implique la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux sanguins préexistants est appelé angiogenèse [Chandolu, 2012]. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins est indispensable pour la croissance tumorale et facilite sa progression. Ainsi le degré de l'angiogenèse est associé à l'agressivité de la tumeur et permet d'évaluer le pronostic [Matsuda, 2013].

Les cellules endothéliales tumorales possèdent un phénotype et un comportement bien distincts de ceux des cellules saines [Bussolati, 2010]. Elles contribuent par leur prolifération rapide à une angiogenèse intense. Elles se détachent du vaisseau préexistant, migrent dans l'espace

périvasculaire et prolifèrent pour former de nouvelles structures vasculaires matures. Ce processus est régulé par des facteurs de croissance, des protéases, des molécules d'adhésion et d'autres médiateurs angiogéniques [Ahlskog, 2006]. Le microenvironnement tumoral constitue ainsi un stimulus pour l'angiogénèse.

La vascularisation tumorale est composée de deux types de vaisseaux : les vaisseaux pré-existants avant l'envahissement tumoral, et les microvaisseaux tumoraux provenant de la néovascularisation suite d'une expression accrue de facteurs proangiogéniques produites par les cellules tumorales. Les deux types de vaisseaux présentent des anomalies structurales et physiologiques, qui sont caractéristiques de la microvascularisation tumorale [Brown, 1998].

Les attributs du microenvironnement tumoral tels que l'hypoxie et l'acidose perturbent le maintien de l'homéostasie entre les facteurs pro et antiangiogéniques [Wojton, 2010]. Dans les tumeurs, les molécules proangiogéniques (tel le facteur de croissance vasculaire endothélial A VEGF-A) sont généralement surexprimées. Ce qui fait pencher la balance vers le côté proangiogénique et provoque la formation de vaisseaux sanguins chaotiques (Figure 2). Ce dérèglement de l'angiogénèse est l'une des caractéristiques de l'environnement tumoral [Jain, 2011 ; Goel, 2011]. Le facteur de croissance vasculaire endothélial A VEGF-A est capable d'induire une perméabilité vasculaire ; cette perméabilité accrue rend la vascularisation tumorale inefficace, chaotique [Rosen, 2005] et conduit à un dépôt de fibrine dans la matrice extracellulaire, servant d'échafaudage pour la migration des cellules endothéliales. L'hypoxie stimule la sécrétion de VEGF, le plus important facteur stimulant l'angiogénèse. Le VEGF induit la prolifération et la migration des cellules endothéliales et maintient leur survie, recrute les cellules souches et les cellules progénitrices hématopoïétiques provenant de la moelle osseuse [Peng, 2010]. L'expression du VEGF dans l'environnement constitue un moyen objectif d'évaluer l'importance de l'angiogénèse et le pronostic [Dubois, 2007].

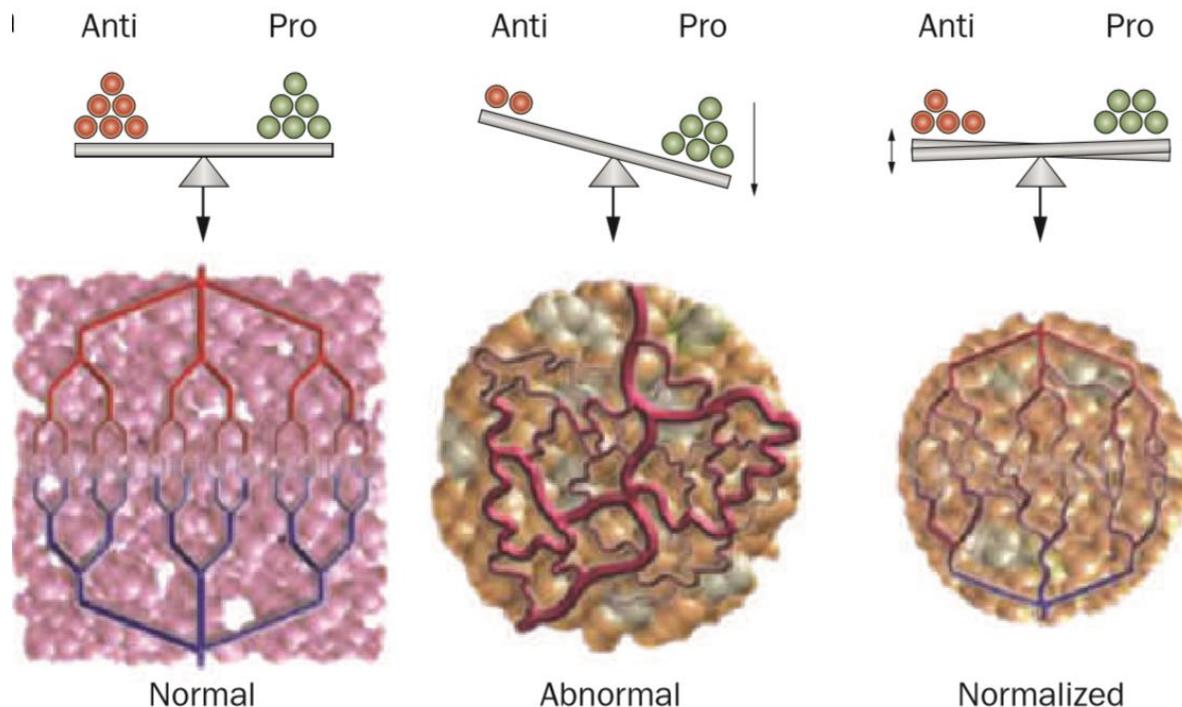


Figure 2 Effet de normalisation vasculaire [Jain, 2010]. L'angiogenèse tumorale est le résultat d'un déséquilibre entre les facteurs proangiogéniques et antiangiogéniques. Restaurer cet équilibre permet d'apporter une normalisation au système vasculaire de la tumeur.

1.4.2 Particularités des vaisseaux tumoraux

Les vaisseaux sanguins tumoraux diffèrent significativement de vaisseaux normaux par leur structure et les propriétés de leurs cellules endothéliales. Les péricytes sont moins nombreuses, et de forme anormale. Elles sont faiblement attachées aux cellules endothéliales et présentent de longs prolongements cytoplasmiques éloignés de la paroi vasculaire. Les cellules endothéliales tumorales présentent une instabilité chromosomique telle que l'aneuploïdie [Bussolati, 2010] et des anomalies de leur forme cellulaire [Wojton, 2010].

Les vaisseaux sont désorganisés, irréguliers, tortueux, dilatés. Leur perméabilité est accrue par : l'augmentation de l'expression de médiateurs de perméabilité sur la surface des cellules, les revêtements endothéliales et membranes basales discontinus, et les fenestrations. Par ailleurs, ils présentent de nombreux shunts artério-veineuses et moins de vaisseaux lymphatiques fonctionnels. La paroi vasculaire présente un manque de muscles lisses périvasculaires. Par conséquent le flux sanguin est irrégulier souvent lent. Parfois le sens d'écoulement est inversé. L'altération du drainage lymphatique rend inefficace le drainage des fluides, l'augmentation de la pression au sein de la matrice extracellulaire rend difficile la diffusion. La pression du liquide interstitielle élevée réduit le transport convectif et comprime les vaisseaux sanguins, le sang est poussé du centre de la tumeur vers la périphérie. [Jain, 2010 ; Goel, 2011]

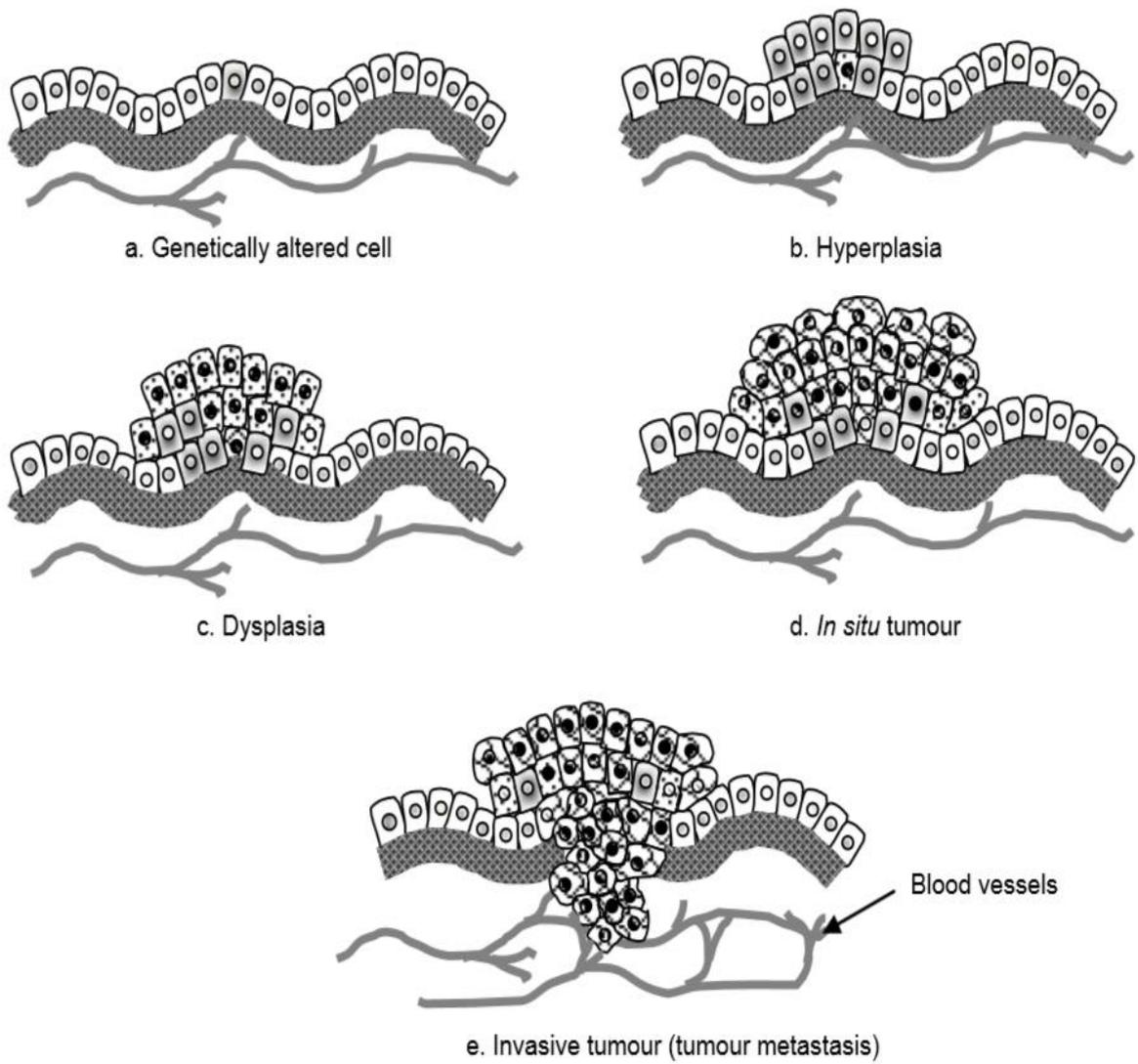


Figure 3 Mécanisme et différents stades du développement tumoral. Cellules ayant subi une altération génétique (a), hyperplasie (b), dysplasie (c), tumeur in situ (d), tumeur invasive/métastase (e) [Jain, 2011].

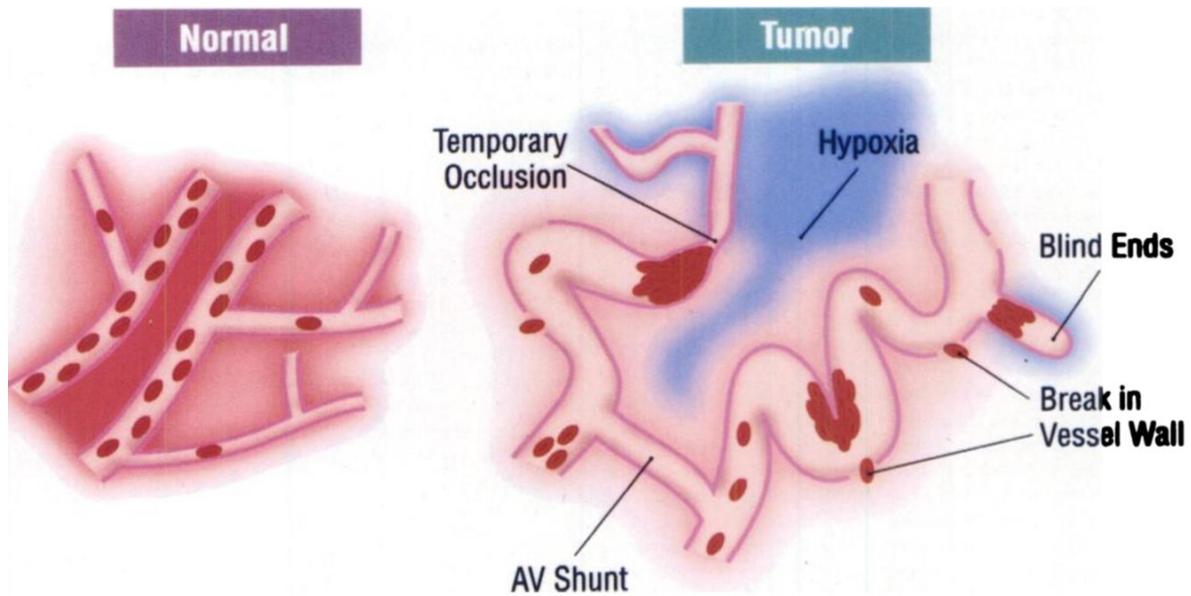


Figure 4 Les principales différences entre la vascularisation des tissus normaux et tumoraux. Vaisseaux sanguins normaux relativement uniformes et bien ordonnés qui sont suffisamment rapprochés pour oxygéner tous le tissu (à gauche). Les vaisseaux sanguins tumoraux tortueux, avec des parois discontinues, le flux sanguin lent et irrégulier, zone d'hypoxie entre les vaisseaux (à droite) [Brown, 1998].

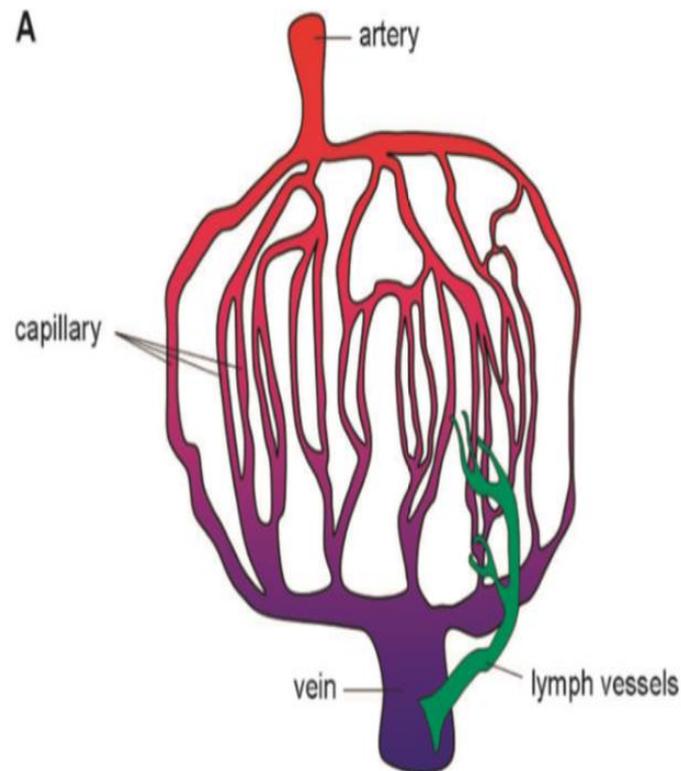


Figure 5 Représentation du système vasculaire. Tissu normal (A) [Trédan, 2007].

B

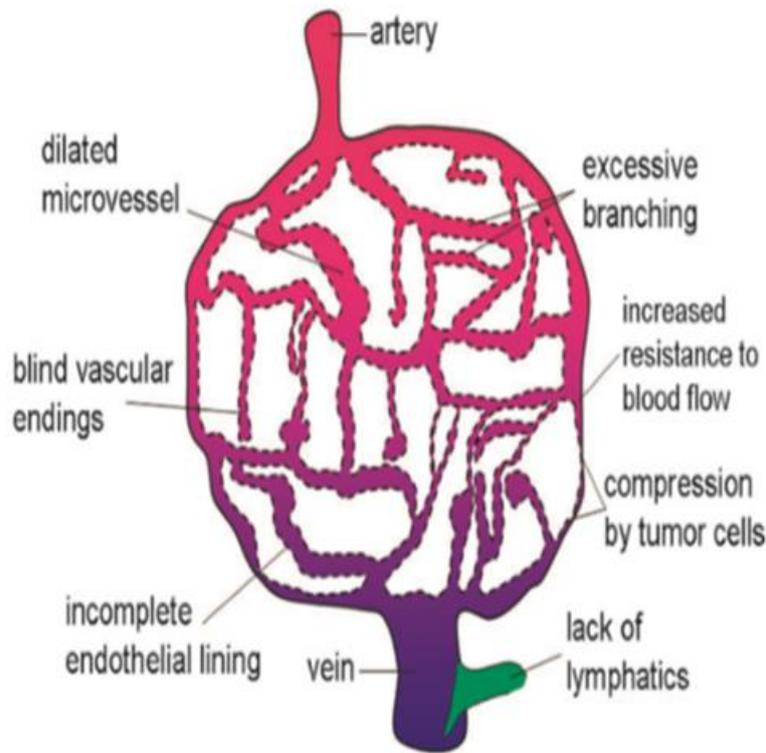


Figure 6 Représentation du système vasculaire. Tumeur solide (B) [Trédan, 2007].

Malgré l'augmentation de la densité des vaisseaux sanguins, les anomalies vasculaires ainsi que la compression des vaisseaux sanguins par les cellules cancéreuses augmentent la résistance à l'écoulement du sang et diminuent l'apport sanguin au niveau de la tumeur, la perfusion est peu efficace et engendre un appauvrissement en substances nutritives (par exemple le glucose) et une extrême hypoxie [Ahlskog, 2006 ; Goel, 2011]. L'hypoxie est un phénomène courant dans les tumeurs solides, elle peut être aiguë lorsque la perfusion en oxygène est sévèrement restreinte. L'hypoxie chronique est relative à l'inégalité de la densité des vaisseaux sanguins par rapport à la croissance rapide de la tumeur [Peng, 2010]. Au fur et à mesure de l'éloignement des vaisseaux sanguins, l'hypoxie et la privation des éléments nutritifs provoquent un dérèglement du cycle cellulaire, une diminution de la vitesse de prolifération des cellules tumorales voire une apoptose et nécrose [Trédan, 2007]. Par ailleurs, pour obtenir l'énergie nécessaire à leur survie et à leur prolifération, les cellules tumorales utilisent plus souvent la glycolyse anaérobie qui conduit à la production de lactate, de CO₂ et d'acide carbonique. Ces produits acides du métabolisme ont pour conséquence l'abaissement du pH interstitiel de l'environnement tumoral [Trédan, 2007].

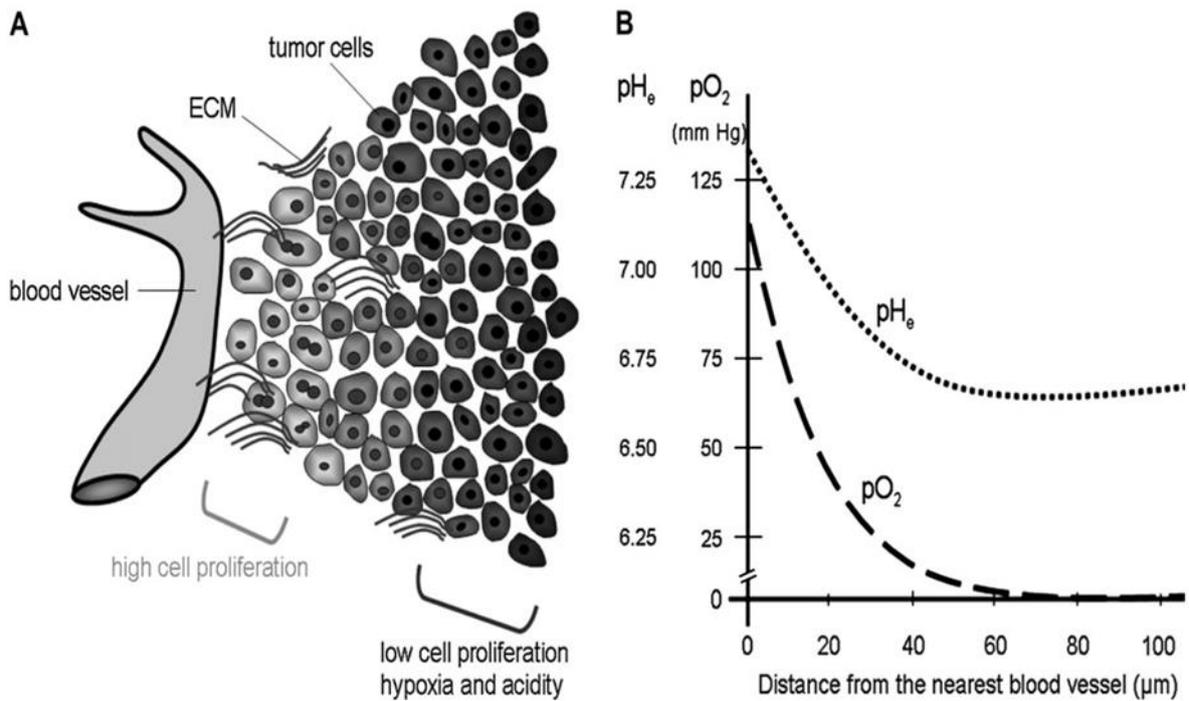


Figure 7 Relation entre le microenvironnement tumoral et les vaisseaux sanguins (A). Le pH et la concentration en oxygène en fonction de la proximité vasculaire (B) [Trédan, 2007].

1.4.3 Cellules souches cancéreuses

Des découvertes récentes s'interrogent sur l'hypothèse de l'existence des cellules souches cancéreuses dans les tumeurs solides et suggèrent qu'elles proviennent soit de la transformation maligne de cellules somatiques normales ou de cellules progénitrices (Figure 8) [Welte, 2010].

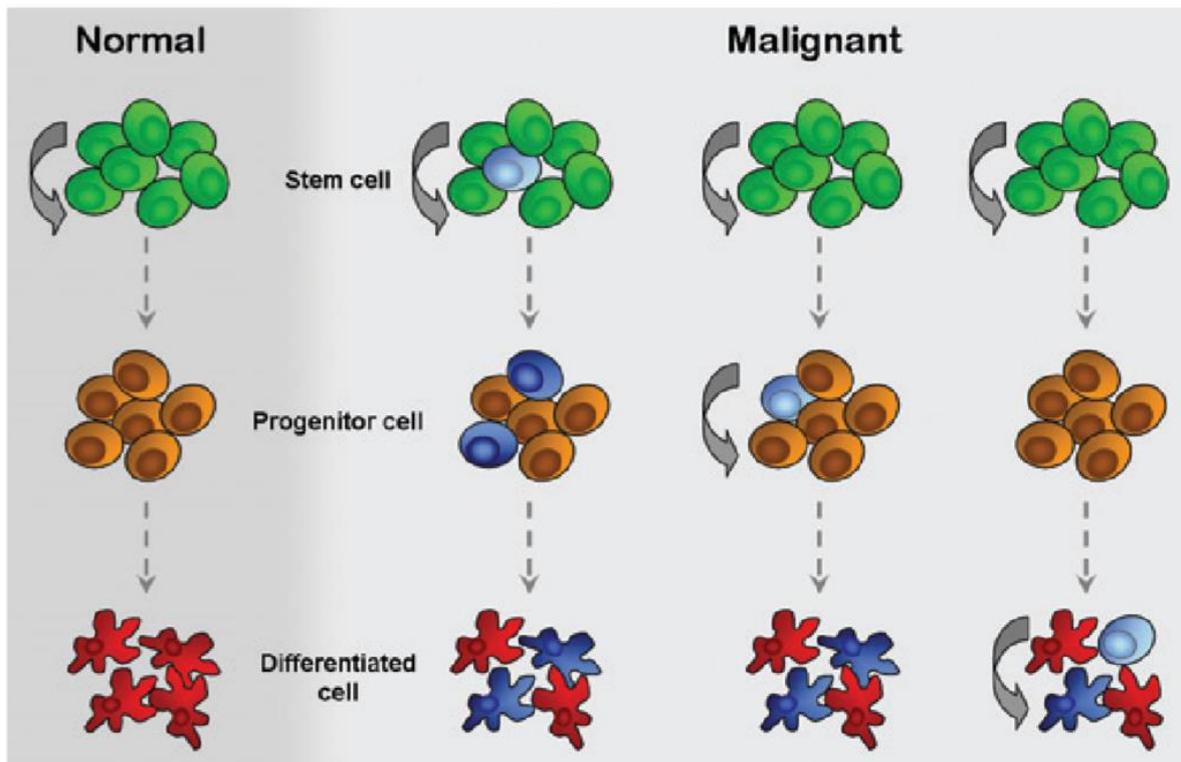


Figure 8 Origine des cellules souches cancéreuses. Il y a une cascade de différenciation soit à partir des cellules souches (vert), de cellules progénitrices (orange) ou de cellules différenciées (bleu foncé) [Welte, 2010].

Dans le tissu normal, les cellules souches se divisent en cellules progénitrices (orange) puis finalement en cellules différenciées (rouge). Des mutations peuvent transformer les cellules souches en cellules souches cancéreuses (bleu claire) qui engendrent ensuite des cellules progénitrices cancéreuses et cellules cancéreuses différenciées (bleu foncé) ; qui par ailleurs peuvent réacquérir les propriétés de cellules souches et se transformer de nouveau en cellules souches cancéreuses [Welte, 2010].

Les cellules souches cancéreuses dans les tumeurs solides ont une capacité d'auto-renouveaulement, véritable élément de croissance de la tumeur. Elles présentent des antigènes spécifiques et peuvent résister à la radiation et aux médicaments, ces caractéristiques favorisent la progression tumorale mais peuvent aussi servir de cibles potentielles thérapeutiques. [Ailles,

2007]

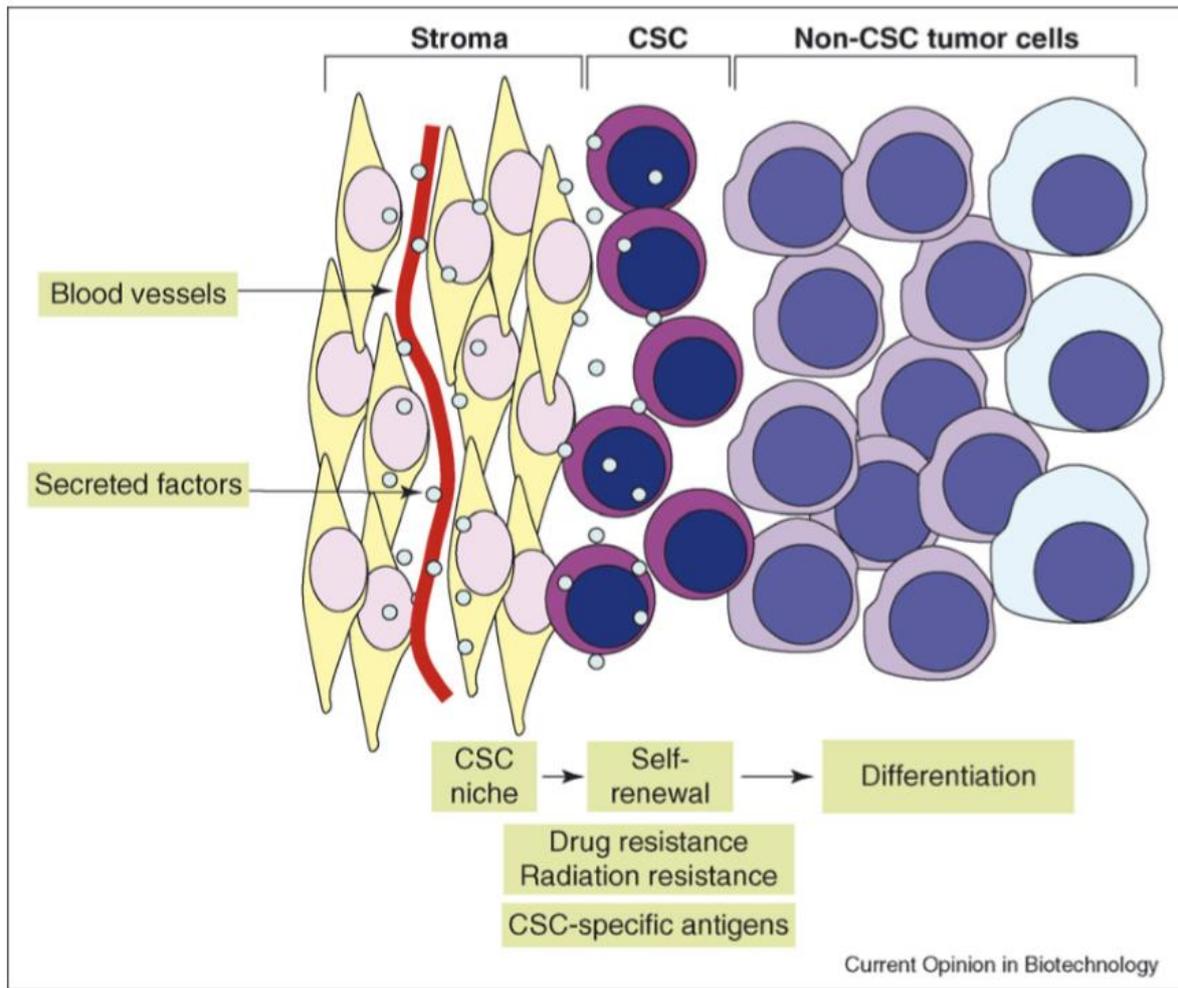


Figure 9 La « niche » des tumeurs solides. Elle est composée des cellules souches tumorales, des fibroblastes, des cellules vasculaires ainsi que des facteurs favorisant l'autorecruitment des cellules souches cancéreuses [Ailles, 2007].

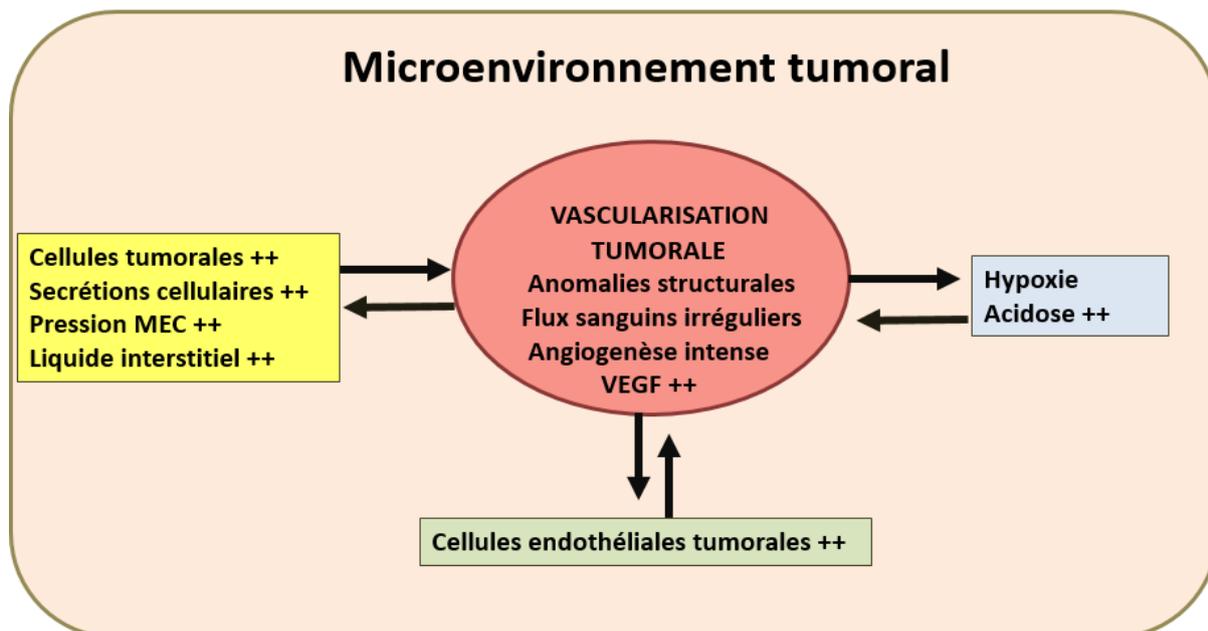


Figure 10 Schéma de synthèse de l'environnement tumoral.

1.5 Facteurs influençant la progression tumorale

1.5.1 Développement des métastases

La métastase est définie comme la dissémination des cellules néoplasiques à des sites secondaires voisins contigus ou lointains où elles prolifèrent pour former une masse extravasculaire de cellules incomplètement différenciées. Le développement des métastases est considéré comme l'étape critique finale dans la progression tumorale. Les cellules se détachent de la tumeur primitive comme suit : d'abord elles envahissent la matrice extracellulaire de l'hôte et entrent dans la circulation, ensuite elles survivent dans la circulation et envahissent le système immunitaire pour finalement s'arrêter et s'extravaser à un organe cible. Elles adhèrent et survivent dans le microenvironnement de l'organe cible, après quoi la formation de néo-vaisseaux se fait pour permettre la croissance des cellules métastatiques au sein de l'organe cible [PosthumaDeBoer, 2011].

Les cellules tumorales arrivent à survivre et à croître malgré les changements du microenvironnement. La modification du comportement biologique des cellules métastatiques est le résultat de changements moléculaires spécifiques. Le stroma tumoral joue un rôle important dans le développement des métastases et peut influencer la transformation maligne [Trédan, 2007]. L'hypoxie induit une instabilité génétique et confère aux cellules un potentiel accru pour les métastases. Cette hypoxie et l'acidité du milieu compromettent les fonctions cytotoxiques des cellules immunitaires. Par ailleurs, la fragilité des vaisseaux peut également faciliter les métastases par le passage des cellules cancéreuses dans la circulation [Jain, 2010].

Les cellules hypoxiques répondent à la contrainte de l'hypoxie en sécrétant des cytokines qui permettent d'augmenter la croissance des vaisseaux sanguins vers ces cellules. Dans les tumeurs, l'hypoxie stimule l'angiogénèse en augmentant la production de VEGF. Le VEGF est un puissant facteur de perméabilité vasculaire d'où son influence importante sur la croissance tumorale et le développement des métastases. [Brown, 1998]

1.5.2 Obstacles entravant les thérapeutiques

Le transport d'un agent thérapeutique est un processus suivant trois étapes : circulation dans les vaisseaux sanguins, diffusion à travers la paroi vasculaire et enfin pénétration dans l'espace interstitiel pour atteindre les cellules cibles. Les hétérogénéités spatiales et temporelles de l'approvisionnement en sang, l'hyperperméabilité des vaisseaux ainsi que le pauvre drainage lymphatique créent un microenvironnement anormal qui altère la délivrance uniforme et l'efficacité des agents thérapeutiques. Ce microenvironnement de la tumeur est très hétérogène et en constante évolution : l'hypoxie, un pH bas et la présence de tissu nécrotique. Ces facteurs favorisent la progression tumorale et conduisent à une résistance aux médicaments et aux radiothérapies. [Jain, 2010]

Les protéines sécrétées par les cellules accroissent la rétention d'eau, un facteur important dans l'augmentation de pression du liquide interstitiel, de plus elles présentent une barrière physique qui interfère avec la dispersion efficace des agents thérapeutiques au sein même de la tumeur solide [Wojton, 2010]. L'hypoxie engendre une résistance à la radiothérapie et à certains médicaments [Brown, 1998], elle reste un obstacle considérable dans le traitement anticancéreux [Peng, 2010].

1.5.3 Résistance aux médicaments

Les interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement jouent un rôle très important dans la progression et le caractère invasif d'un cancer. Ces interactions tumeur-stroma sont capables de modifier la distribution et de l'efficacité des agents thérapeutiques et d'influer aussi bien sur la résistance aux médicaments que sur la récurrence après traitement [Wojton, 2010]. La progression tumorale, la formation de métastase et la mauvaise réponse à la chimiothérapie, la récurrence et la faible survie sont corrélées à un taux élevé de VEGF [PosthumaDeBoer, 2011].

Une hypoxie aussi accentuée est associée à un pronostic plus mauvais. En effet, elle augmente à long terme la probabilité de mutations qui confèrent aux cellules la capacité de tolérer cette hypoxie, de surmonter la pauvreté en nutriments, voire de se soustraire à ce

microenvironnement sévère et donc d'exacerber leur malignité par l'invasion et les métastases [Peng, 2010]. Plus les cellules sont à distance des vaisseaux, plus le milieu s'appauvrit en oxygène. D'une part, l'hypoxie est un facteur important dans la résistance des cellules tumorales à la radiothérapie car la sensibilité des cellules et des tissus dépend de la présence d'oxygène au moment de l'irradiation. La résistance à la chimiothérapie est liée à une difficulté de diffusion des agents thérapeutiques au sein de la tumeur [Brown, 1998]. D'autre part, l'hypoxie peut conduire à l'activation de gènes favorables à l'angiogenèse et à la survie cellulaire, et donc au développement de populations cellulaires ayant un phénotype résistant aux médicaments [Trédan, 2007]. L'acquisition de différentes mutations permettant de résister aux effets de médicaments antiangiogéniques est un facteur important de malignité [Gavhane, 2011].

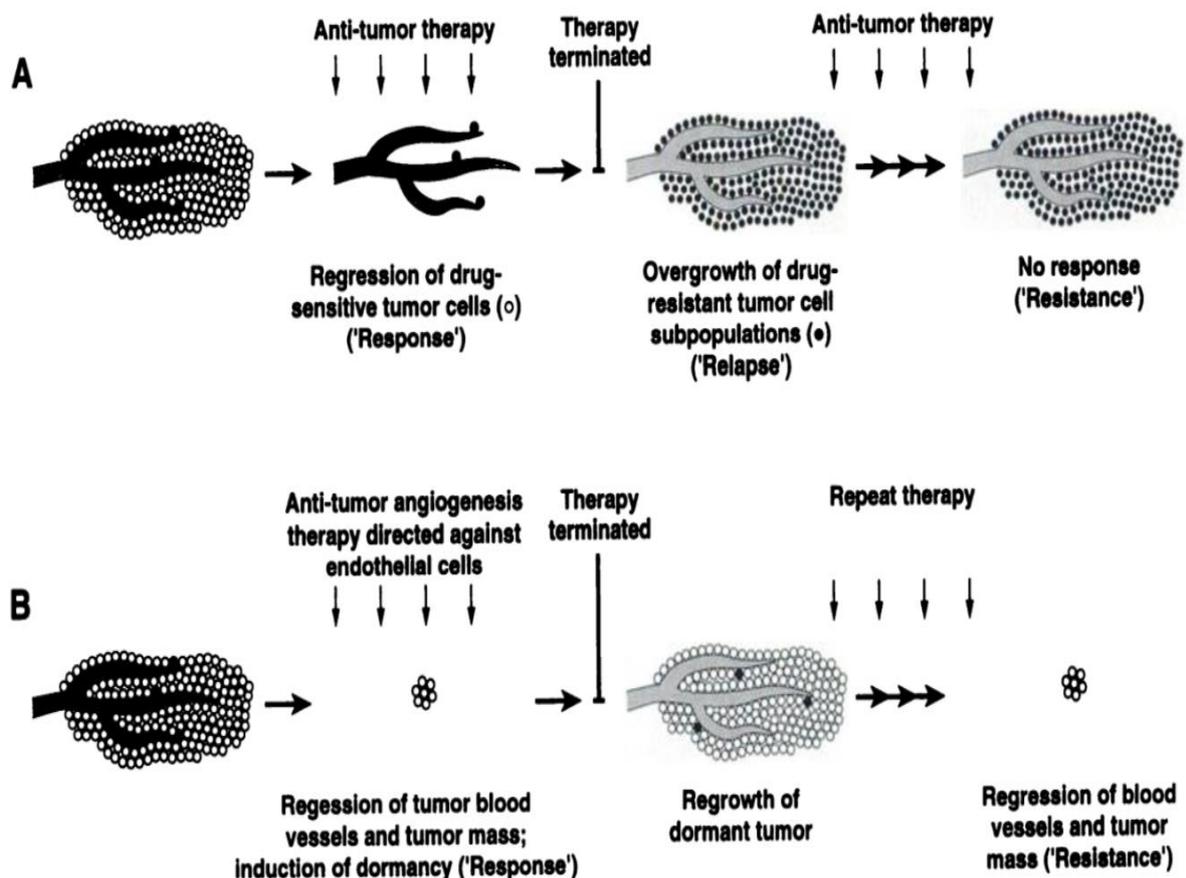


Figure 11 Mécanisme par lequel un traitement anticancéreux conduit au développement des cellules tumorales résistantes contrairement à une thérapie antiangiogénique [Brown, 1998].

L'acidité du milieu influence la sensibilité des cellules tumorales à la chimiothérapie et peut aussi inhiber le transport actif de certains médicaments, y compris le méthotrexate. La composition et la structure des composants du stroma tumoral affaiblissent la pénétration des molécules actives à travers les tissus. En outre, la structure tridimensionnelle elle-même peut

influencer la sensibilité des cellules à la radiothérapie et à la chimiothérapie. Les interactions intercellulaires, le phénotype des cellules tumorales affectent également la pénétration des médicaments ; une forte densité des cellules, un espace interstitiel réduit et le volume de la matrice extracellulaire gênent la pénétration du médicament. Par ailleurs, les anomalies structurelles des vaisseaux sanguins favorisent l'extravasation du médicament à la périphérie de la tumeur et diminuent son efficacité. [Trédan, 2007]

1.6 Traitements des tumeurs solides

1.6.1 Traitement conventionnel

Les traitements des tumeurs solides les plus couramment utilisés sont de la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie [Gavhane, 2011].

1.6.1.1 Chirurgie

Le choix de la procédure chirurgicale est déterminé en fonction de l'âge et l'état général du patient, du site anatomique de la tumeur primitive, de sa relation avec les structures voisines, telles que les vaisseaux et les nerfs, et également par la réponse de la tumeur à la chimiothérapie préopératoire [Ritter, 2010]. Les objectifs de la chirurgie visent à retirer en toute sécurité la totalité de la tumeur et à préserver la fonction autant que possible [Carrle, 2006]. C'est pourquoi les marges chirurgicales doivent être larges c'est-à-dire délimitées par un manchon de tissu sain [Ritter, 2010]. En effet le risque de récurrence locale augmente si les marges chirurgicales sont restreintes [Bielack, 2009].

Actuellement, la radiographie, la tomodensitométrie, la scintigraphie au thallium et l'angiographie sont les plus utilisées pour évaluer la réponse de la tumeur à la chimiothérapie néoadjuvante et estimer le pronostic. Ces examens contribuent à faciliter la planification chirurgicale. Les patients qui présentent une mauvaise réponse nécessitent une plus grande marge de résection. Les options pour la reconstruction après la résection des tumeurs sont multiples et comprennent des dispositifs d'endoprothèses, la reconstruction biologique ou la combinaison des deux. [Wittig, 2002]

1.6.1.2 Radiothérapie

Elle est utilisée pour le traitement de tumeurs solides localisées lorsque la chirurgie n'est pas appropriée ou impossible (par exemple, un cancer du poumon inopérable) [Gavhane, 2011].

1.6.1.3 Chimiothérapie

La plupart des agents chimiothérapeutiques ciblent les cellules malignes qui se répliquent activement. De nombreux médicaments endommagent directement l'ADN en interférant avec

la division cellulaire et en activant la mort cellulaire programmée ou apoptose. D'autres agents agissent indirectement en interférant avec la mitose ou en bloquant l'utilisation de nucléotides nécessaires à la synthèse de l'ADN pour la réplication des cellules tumorales [Gavhane, 2011].

1.6.1.4 Traitement combiné

Au cours des dernières années, l'efficacité de la chirurgie est améliorée en la combinant avec d'autres traitements comme les chimiothérapies, la radiothérapie. Une chimiothérapie préopératoire ou néoadjuvante suivie d'une chimiothérapie postopératoire ou adjuvante sont privilégiées [Gavhane, 2011]. Pour de nombreuses tumeurs solides, la chirurgie suivie de chimiothérapie produit un meilleur taux de survie à long terme que la chirurgie seule. La chimiothérapie adjuvante est nécessaire car le plus souvent au moment où la tumeur est diagnostiquée, quelques cellules malignes se sont déjà propagées à des sites distants, ce qui rend peu probable la guérison par un traitement chirurgical seul. Pour certains cancers avancés qui ont largement envahi les tissus environnants, une chimiothérapie ou une thérapie génique avant la chirurgie tumorale est entamée afin de simplifier l'excision et les thérapeutiques ultérieures.

La chimiothérapie préopératoire permet une réduction de la taille de la tumeur et le développement d'une capsule de collagène avasculaire. Par conséquent les tumeurs ainsi prétraitées sont mieux délimitées par rapport aux tissus sains environnants et donc plus faciles à opérer. La chimiothérapie néoadjuvante efficace est associée à des taux de récurrence locale réduits et permet de réaliser une chirurgie conservatrice plus sûre. Une évaluation histologique (Figure 12 a, b) de la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante est possible. C'est un des indicateurs de pronostic le plus fiable disponible à ce jour qui se base sur la quantité restante de tumeur viable dans la pièce de résection [Carrle, 2006]. En effet, le taux de nécrose tumorale obtenue avec une chimiothérapie néoadjuvante est évalué systématiquement pour tous les échantillons après résection chirurgicale. Quant à la chimiothérapie postopératoire, elle permet de détruire les cellules cancéreuses restantes et de réduire le risque de récurrence.

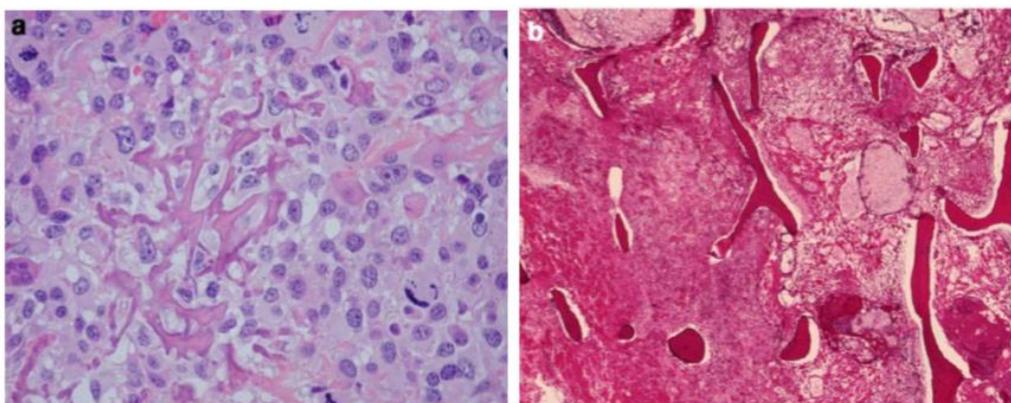


Figure 12 Coupe histologique d'un ostéosarcome avant (a) et après (b) chimiothérapie préopératoire (réponse favorable) [Carrle, 2006].

1.6.1.5 Suivi et maintenance

Une surveillance étroite pendant la chimiothérapie permet de détecter les complications et les effets secondaires et d'adapter de manière appropriée le traitement concerné. Le défi reste à réduire davantage les effets secondaires tardifs sans compromettre l'efficacité du traitement anticancéreux. Par la suite, un suivi à long terme est nécessaire non seulement pour surveiller l'état de rémission mais aussi la survenue tardive de métastase, jusqu'au-delà de 10 ans [Bielack, 2009].

1.6.2 Traitements novateurs

1.6.2.1 Régénération tissulaire

La régénération des tissus dysfonctionnels ou endommagés pour restaurer leur structure et leur fonction constitue un défi majeur dans la médecine moderne [Ferrand, 2014]. L'ingénierie tissulaire met en œuvre une variété de méthodes et traitements pour fournir des biomatériaux innovants. Elle permet de développer des substituts biologiquement actifs afin de régénérer les tissus et les organes. Ainsi des membranes nanofibreuses constituées de polymères poly- ϵ -caprolactones sont obtenues par électrospinning, un procédé qui permet de synthétiser des fibres de moins de 10 nm de diamètre [Ferrand, 2014]. Ces biomatériaux fournissent un support tridimensionnel provisoire et guident les interactions cellulaires complexes pour restaurer la structure et la fonction des tissus endommagés ou dysfonctionnels [Mendoza, 2012]. Pour une régénération efficace, les cellules ciblées nécessitent une exposition continue au facteur de croissance sur une longue période. Des facteurs de croissance peuvent être confinés sur les nanofibres par la méthode layer-by-layer [Ferrand, 2014].

La nanobiotechnologie a permis l'émergence d'une toute nouvelle classe de dispositifs bioactifs [Ferrand, 2014 ; Mendoza, 2012] destinés à la délivrance ciblée de médicaments pour plus

d'efficacité et moins de toxicité. Elle promet un impact clinique plus grand grâce à la libération contrôlée et prolongée de médicaments. Elle soutient la conception d'implants complexes de thérapie cellulaire capables de régénérer durablement une grande variété de tissus. Les nanotechnologies permettent de piéger, protéger et stabiliser les agents thérapeutiques dans des revêtements de polymères qui constituent des nanoréservoirs bioérodables pour guider la régénération tissulaire. La nanoingénierie vise à améliorer l'efficacité thérapeutique et le ciblage spécifique par le biais de médicaments véhiculés dans des nanoparticules, réduisant ainsi les effets secondaires. Ces nanomatériaux sophistiqués permettent de réaliser des implantations chirurgicales moins invasives et diminuent les risques d'infections post-opératoires ou d'autres complications, ces innovations contribuent à l'amélioration considérable la qualité de vie [Mendoza, 2012].

1.6.2.2 Ciblage thérapeutique

Une thérapie anti-cancéreuse plus sélective consiste en l'administration ciblée de molécules au sein de l'environnement de la tumeur [Ahlskog, 2006]. Pour une efficacité optimale, l'agent thérapeutique doit traverser la paroi vasculaire ainsi que le tissu tumoral puis atteindre les cellules tumorales dans des quantités suffisantes et uniformes pour tuer les cellules cancéreuses. Il ne doit pas avoir d'effets défavorables sur les tissus normaux.

1.6.2.2.1 Stratégies pour la distribution des agents thérapeutiques

La diffusion d'un médicament est déterminée par son gradient de concentration dans le tissu tumoral ainsi que par ses diverses propriétés intrinsèques : sa forme moléculaire, sa composition, sa solubilité dans l'eau et les lipides, son métabolisme et sa capacité de liaison aux composants du tissu tumoral, et à la structure de la matrice extracellulaire [Trédan, 2007]. De récents progrès en nanotechnologie offrent de nombreux espoirs pour le traitement en oncologie. L'apparition dans l'arsenal thérapeutique de nanotransporteurs permet de véhiculer des agents traitants au niveau des cellules cibles. [Jain, 2010]

La taille des particules thérapeutiques affecte leur temps de circulation dans le courant sanguin, l'hyperperméabilité des vaisseaux des zones tumorales favorise la diffusion et l'accumulation de nanoparticules. La charge de surface et la forme des nanoparticules jouent également un rôle crucial dans l'extravasation et le transport interstitiel. La pégylation, un procédé de liaison avec des polyéthylènes glycols permettent de stabiliser les nanoparticules et de prolonger leur demi-vie dans le sang pour un temps de circulation plus élevé [Jain, 2010]. Des petits liposomes (de ~ 100 nm de diamètre) peuvent être spécialement modifiés afin de leur conférer une longue demi-vie intravasculaire ou leur permettre de s'accumuler de manière sélective au niveau de la

zone ciblée. C'est le cas par exemple de la doxorubicine encapsulée dans des liposomes qui sont stabilisés stériquement. [Brown, 1998 ; Jain, 2010]

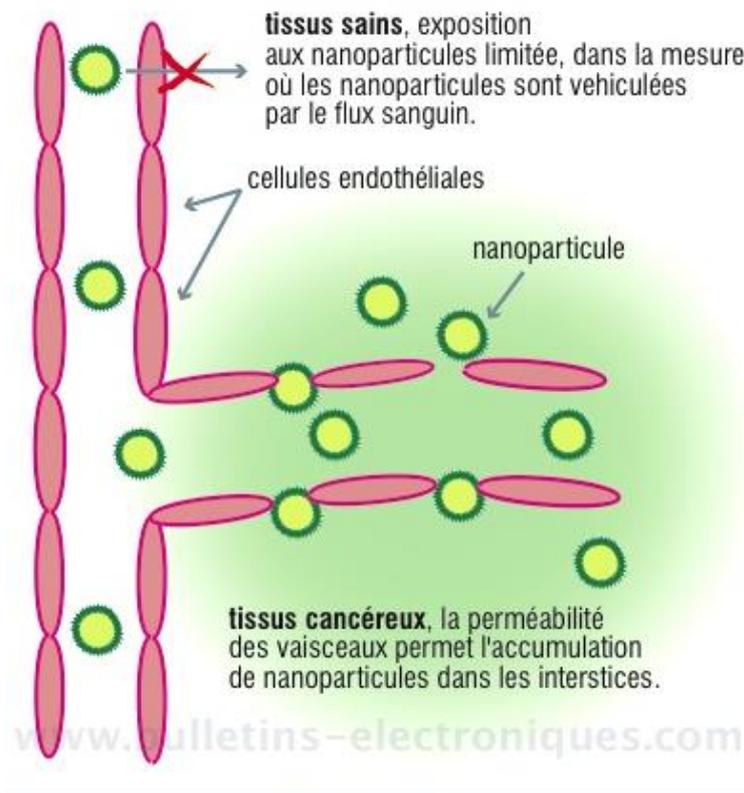


Figure 13 Ciblage passif [Herino, 2007].

Une autre stratégie thérapeutique pour améliorer la délivrance de médicaments consiste à « normaliser » l'environnement matriciel tumoral de sorte que les nanoparticules pénètrent rapidement et plus profondément à l'intérieur de la tumeur [Jain, 2010]. Cette nomination consiste à modifier la circulation sanguine et en moduler la pression interstitielle. Afin d'améliorer le flux sanguin, une stratégie consiste à normaliser la vascularisation de la tumeur, à cet effet le trastuzumab réduit significativement le diamètre, le volume, la perméabilité des vaisseaux sanguins tumoraux et promouvoit ainsi des réseaux vasculaires plus normaux [Jain, 2010].

Une nouvelle génération de système d'administration de médicament appelée « ciblage actif » consiste en l'association de la nanoparticule avec une composante favorisant l'accumulation dans l'organe atteint. En couplant de groupements de ciblage à la surface de liposomes, les ligands vont promouvoir la liaison sélective des liposomes à des antigènes spécifiques de la tumeur et faciliter l'acheminement des paquets de liposomes sur les cellules tumorales. [Wu, 2008]

Le pH peut influencer la cytotoxicité des médicaments anticancéreux. L'alcalinisation du milieu extracellulaire augmente l'absorption de certains médicaments (par exemple, la doxorubicine et mitoxantrone) et ainsi leur cytotoxicité au sein de la tumeur [Trédan, 2007]. Un autre facteur déterminant de la distribution du médicament dans les tissus est sa demi-vie dans la circulation, plus un médicament a une demi-vie longue plus il aura une distribution uniforme [Trédan, 2007].

1.6.2.2 Thérapeutiques antiangiogéniques

Afin de bloquer la croissance tumorale et la formation de métastases, une approche thérapeutique est d'interférer avec l'apport sanguin et d'entraver l'approvisionnement en oxygène et éléments nutritifs, autrement dit d'inhiber l'angiogenèse ou la néovascularisation. Le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) et ses récepteurs sont des régulateurs clés du processus de l'angiogenèse, ce qui en fait des cibles thérapeutiques intéressantes et les antigènes exprimés au niveau des vaisseaux sanguins tumoraux des cibles vasculaires potentielles [Ahlskog, 2006]. Le mode d'action des thérapeutiques antiangiogéniques s'effectue soit en inhibant la synthèse des protéines angiogéniques par les cellules cancéreuses, soit en neutralisant les protéines angiogéniques secrétées ou en inhibant leurs récepteurs. Ils peuvent aussi directement induire l'apoptose des cellules endothéliales (Figure 14) [Wu, 2008].

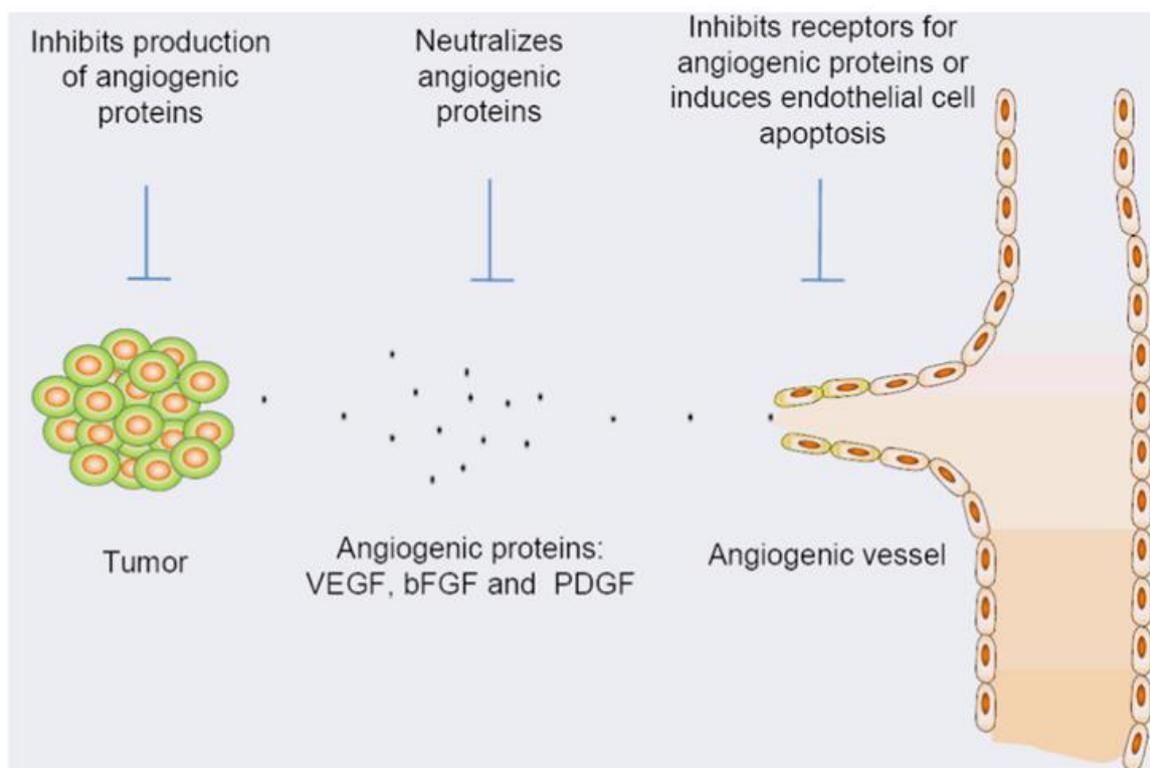


Figure 14 Stratégies pour l'inhibition de la croissance tumorale par des thérapeutiques antiangiogéniques [Wu, 2008].

L'angioprévention est le concept de prévention de développement ou de la progression de la maladie par l'inhibition de l'angiogenèse [Tosseti, 2002]. Elle est envisageable à un stade précoce de la tumorigenèse en bloquant la progression de la tumeur précancéreuse, et à d'autres stades en limitant le développement des foyers hyperplasiques ou en empêchant le l'expansion des micrométastases.

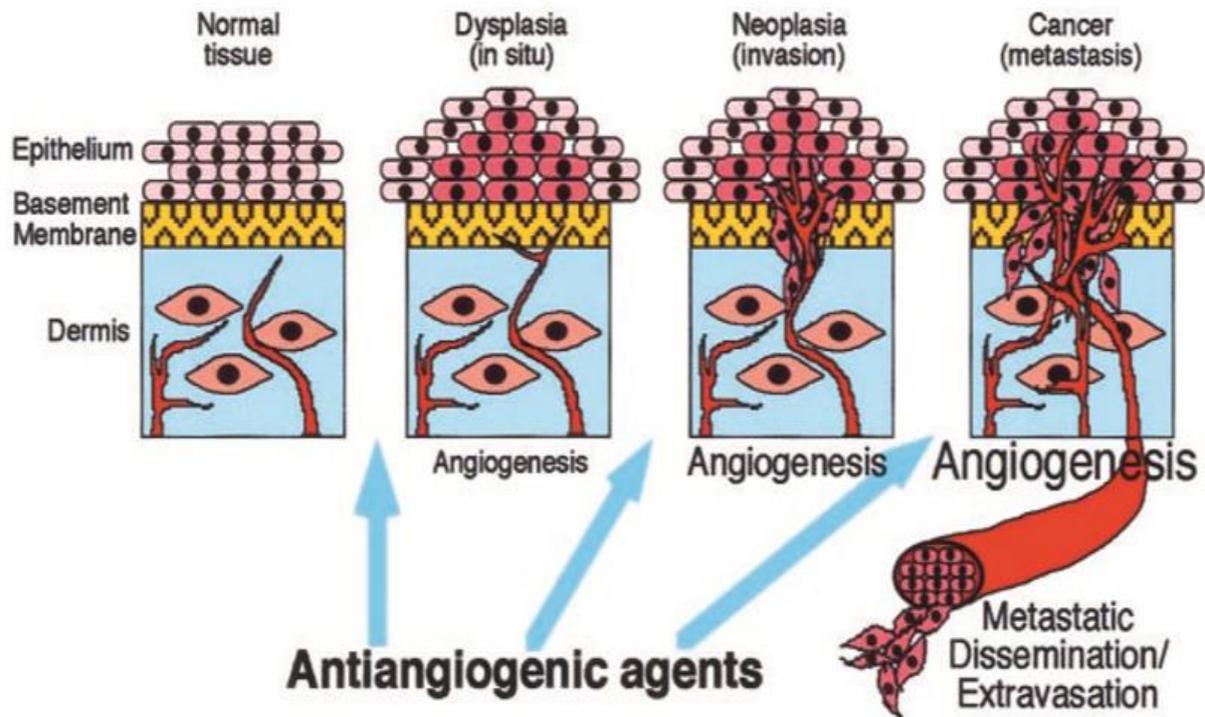


Figure 15 Stades d'intervention d'agents antiangiogéniques [Tosseti, 2002].

Les agents antiangiogéniques peuvent être classés en deux catégories: ceux qui inhibent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et ceux qui ciblent et endommagent les vaisseaux déjà existants [Peng, 2010].

Des études précliniques ont montré que la thérapie anti-VEGF rétablit l'équilibre entre les facteurs pro et antiangiogéniques et de ce fait modifie le phénotype des vaisseaux tumoraux en plus « mature » ou « normal » [Goel, 2011]. Cela se traduit par des vaisseaux moins perméables avec la membrane basale plus régulière et les péricytes plus nombreuses. Des essais cliniques révèlent que la combinaison de la thérapie anti-VEGF avec une chimiothérapie conventionnelle améliore davantage la survie par rapport à une chimiothérapie seule. Cependant une monothérapie anti-VEGF seule n'a pas donné de résultats positifs en termes d'efficacité. Ces bons résultats s'expliquent par le fait que cette « normalisation vasculaire » permet une

meilleure libération de l'oxygène et des agents médicamenteux vers la tumeur améliorant ainsi l'efficacité des traitements conventionnels [Rosen, 2005].

Le SU5416 est une molécule inhibitrice du récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGFR-2), ce récepteur joue un rôle crucial dans le processus de l'angiogenèse. Une étude de phase I, ayant pour objectif principal d'évaluer l'innocuité du SU5416 lorsqu'il est administré deux fois par semaine par perfusion intraveineuse, a révélé que la molécule est bien tolérée et la dose recommandée a été estimée. [O'Donnell, 2005]

Une étude de phase I sur l'ombrabulin, un agent perturbateur vasculaire, administré en perfusion intraveineuse chez des patients japonais atteints de tumeurs solides avancées, a été réalisée afin de déterminer la dose maximale tolérée et la dose recommandée, d'évaluer son activité antitumorale et la pharmacocinétique. L'ombrabulin a été bien toléré, avec des effets indésirables cardiovasculaires limités, la dose recommandée est de 50 mg/m², les profils d'innocuité et de pharmacocinétique étaient comparables entre les patients japonais et caucasiens. [Murakami, 2014]

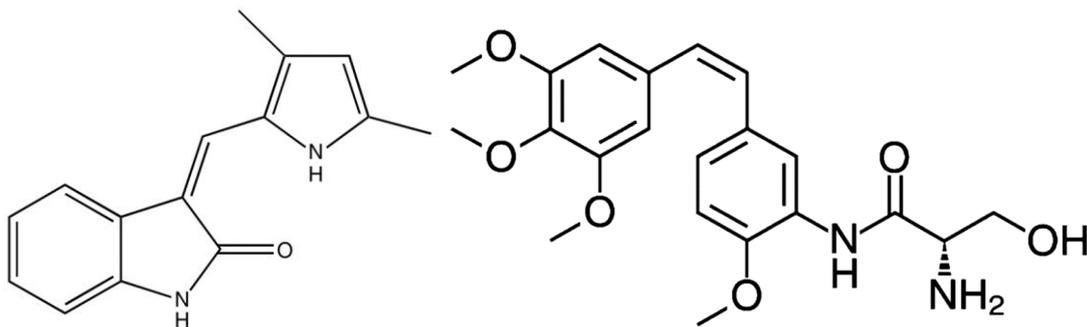


Figure 16 Structure chimique SU5416 [O'Donnell, 2005]. Structure chimique Ombrabulin (en gras) [Murakami H, 2014].

Le Bevacizumab (Avastin®) est un anticorps monoclonal anti-VEGF approuvé par la FDA en 2004 pour une utilisation en clinique et agit comme un inhibiteur puissant de l'angiogenèse [Wu, 2008 ; Peng, 2010].

Des antagonistes naturels de l'angiogenèse entre autre l'angiostatine et l'endostatine pourraient être utilisés en conjonction avec des inhibiteurs de facteurs angiogéniques ou des inhibiteurs de leurs récepteurs [Brown, 1998]. En effet, une hypothèse suggère que l'endostatine, un inhibiteur endogène de l'angiogenèse qui peut également induire l'apoptose des cellules endothéliales, pourrait nuire à la croissance tumorale et aux métastases [PosthumaDeBoer, 2011].

La Nestine, une protéine de filament intermédiaire exprimée lors la prolifération des cellules endothéliales vasculaires, peut être utilisée pour évaluer avec plus de précision la densité des

microvaisseaux au niveau de la tumeur. C'est un nouveau indicateur pronostic et marqueur de l'angiogenèse. Elle constitue une potentielle cible des thérapeutiques antiangiogéniques. [Matsuda, 2013]

Le PEDF, une protéine multifonctionnelle est un puissant antiangiogénique et un antitumoral prometteur capable d'inhiber la prolifération, la migration des cellules endothéliales, la métastase, la croissance de la tumeur mais également d'induire l'apoptose des cellules tumorales [Chandolu, 2012].

Les avantages thérapeutiques de ces molécules antiangiogéniques s'expliquent par le fait qu'elles ciblent principalement les vaisseaux sanguins en vue de faciliter la délivrance des agents thérapeutiques au sein de la tumeur. Elles sont peu susceptibles d'induire une toxicité systémique par rapport aux traitements anticancéreux conventionnels. Par ailleurs les mutations au niveau des cellules endothéliales vasculaires sont rares et il y a peu de risque de développer une résistance aux médicaments du fait de la stabilité génétique des cellules endothéliales. Ces dernières se trouvant au sein même des vaisseaux, constituent des cibles sûres où la concentration des agents thérapeutiques est assurée. Il est possible de combiner ce ciblage vasculaire avec d'autres stratégies telles que la chimiothérapie. Cependant ces molécules antiangiogéniques ont un effet thérapeutique lent, une administration continue et à long terme est alors nécessaire. Puisqu'elles n'ont pas d'effets directs sur les cellules tumorales, la combinaison avec les traitements antitumoraux conventionnels apporte un effet synergique. [Peng, 2010 ; Brown, 1998]

Néanmoins, les inhibiteurs de l'angiogenèse présentent de nombreuses contraintes et peuvent provoquer des saignements, une thrombose, une hypertension, une hypothyroïdie et une asthénie, une protéinurie, un œdème, une leucopénie, une lymphopénie, une immunomodulation, une cicatrisation perturbée et une toxicité cutanée [Wu, 2008].

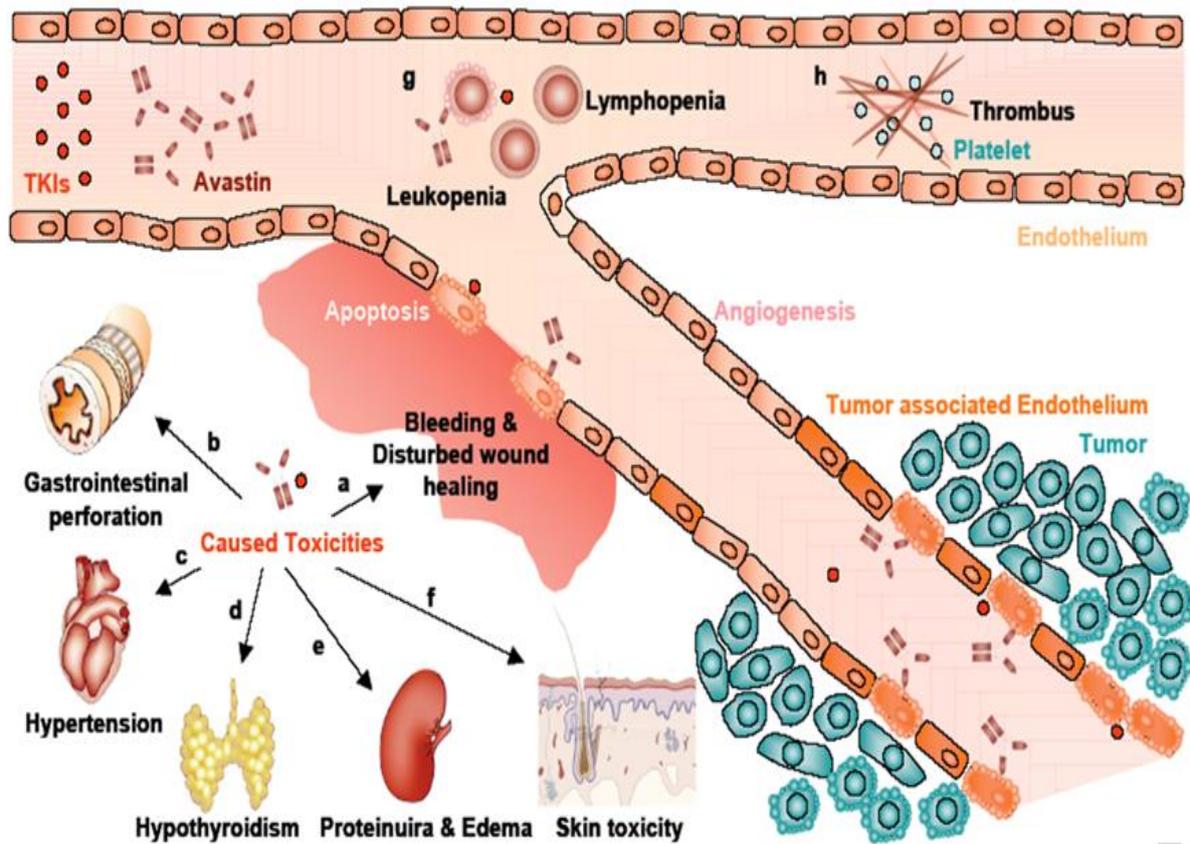


Figure 17 Les toxicités induites par une thérapie antiangiogénique (inhibiteurs de tyrosine kinase et Avastin®/Bevacizumab). Complications hémorragiques et perturbation de la cicatrisation (a), perforations gastro-intestinales (b), hypertension et éjection ventriculaire gauche réduite (risque de décès) (c), hypothyroïdie et fatigue (d), protéinurie et léger œdème (e), toxicité cutanée (f), leucopénie et lymphopénie (g), thromboses (h) [Wu, 2008].

Molécule/ action	Résultats	Publication/Année
SU5416 anti-VEGFR-2	Etude de phase 1 : bonne tolérance, dose recommandée estimée	O'Donnell, 2005
Omrabulin agent perturbateur vasculaire	Etude de phase 1 : bonne tolérance, dose recommandée déterminée, effets indésirables cardio-vasculaires limités	Murakami, 2014
Bevacizumab anticorps monoclonaux anti-VEGF	Utilisation clinique approuvée par la FDA en 2014 : inhibiteur puissant de l'angiogenèse	Wu, 2008 Peng, 2010
Angiostatine, Endostatine antagonistes naturelles de l'angiogenèse	Hypothèse : inhibition des facteurs angiogéniques et de leurs récepteurs	PosthumaDeBoer, 2011
PEDF protéine multifonctionnelle puissant antiangiogénique et antitumoral-++	Inhibition de la prolifération des cellules endothéliales, métastase, croissance de la tumeur, apoptose des cellules tumorales	Chandolu, 2012

Tableau 2 Récapitulatif des molécules inhibant l'angiogenèse.

2 Ostéosarcomes

2.1 Caractéristiques histologiques

L'ostéosarcome ou sarcome ostéogénique est une tumeur maligne primitive de l'os et représente 20% des sarcomes. Il se caractérise par la présence de cellules mésenchymateuses malignes qui produisent de l'ostéoïde et/ou de l'os immature. [Ritter, 2010 ; Soares, 2005]

L'ostéosarcome pénètre dans le cortex osseux, comprime les tissus mous environnants, puis se développe localement de manière radiale. Il forme une masse entourée par une couche pseudocapsulaire dénommée « zone réactive ». Les nodules tumoraux qui sont des microextensions de la masse primaire et envahissent la zone réactive sont appelés « satellites ». Les nodules qui se développent en dehors du bord réactif mais au sein du même os ou de l'articulation adjacente sont appelés « sauts de lésions » et représentent les métastases régionales (intra-osseuses ou transarticulaires). [Wittig, 2002]

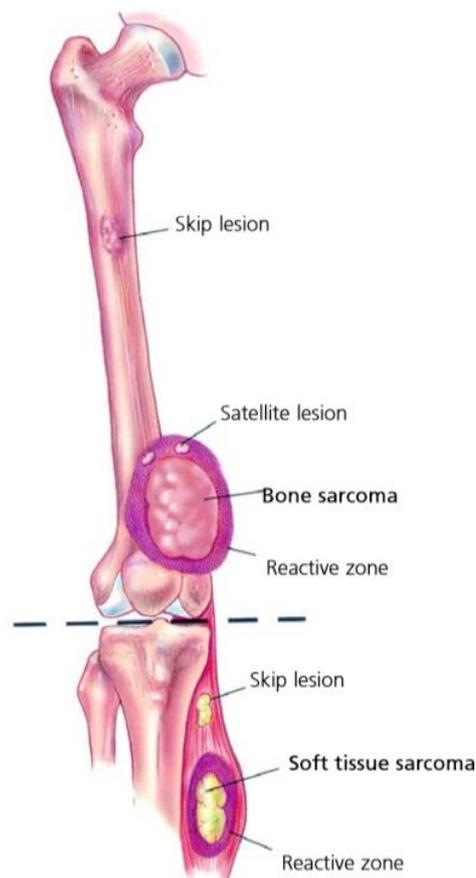


Figure 18 Modèle de croissance biologique des ostéosarcomes [Wittig, 2002].

Les ostéosarcomes se caractérisent par des zones ostéoblastiques, ostéolytiques ou mixtes. Ils ont souvent une composante de tissu mou dans lequel des calcifications résultant de la formation d'os ou spicules peuvent être observés. Le « triangle de Codman » est une zone triangulaire de

calcification périostée typique des ostéosarcomes qui se situe à la frontière entre la tumeur et les tissus sains. [Ritter, 2010]

2.2 Localisation

L'ostéosarcome touche généralement les os longs. Les sites les plus fréquents sont les régions métaphysaires distales du fémur, les régions métaphysaires proximales du tibia et de l'humérus [Wittig, 2002]. Bien que la tumeur puisse se développer dans n'importe quel os, le squelette axial est touché dans 10% des cas, le plus souvent le bassin [Ritter, 2010]. Les os du squelette cranio-faciale ou axial sont impliqués principalement chez l'adulte [Bielack, 2009].

2.3 Incidence

L'ostéosarcome est la tumeur osseuse maligne primaire la plus fréquente de l'os [Ritter, 2010]. C'est le plus courant des sarcomes osseux et le troisième cancer le plus fréquent chez les enfants et les adolescents [Wittig, 2002]. L'incidence dans la population générale est de 2 à 3 cas par million par an, les pics d'incidence annuelle à 8 à 11 cas par million chez les 15-19 ans. L'ostéosarcome représente pour 15 % de toutes les tumeurs solides extra-crâniennes dans ce groupe d'âge. Les hommes sont touchés 1,4 fois plus que les femmes. [Ritter, 2010]

2.4 Pronostic

Le volume, la localisation, la présence de métastases, l'augmentation du taux de phosphatases alcalines et la faible réponse à une chimiothérapie préopératoire sont des indicateurs d'un pronostic défavorable. Le risque d'échec local c'est d'environ trois fois plus important chez les patients qui présentent une mauvaise réponse à la chimiothérapie néoadjuvante et cinq fois plus si les marges chirurgicales sont insuffisantes. Ces deux facteurs de risque interagissent et, associés ils augmentent d'un facteur de près de 50 le risque d'échec local. [Carrle, 2006]

Les métastases aggravent considérablement le pronostic [Wittig, 2002]. La plupart des décès liés à l'ostéosarcome sont le résultat des développements de métastases en général pulmonaires qui génèrent une insuffisance respiratoire [Tang, 2008]. Le taux de survie à 5 ans est à 65% lorsque la tumeur est localisée contre 20% en cas de métastases. Les métastases pulmonaires des ostéosarcomes ont un comportement biologique différent des tumeurs primaires et présentent une résistance plus importante à la chimiothérapie conventionnelle [PosthumaDeBoer, 2011].

2.5 Etiopathogénie

Chez la plupart des patients, l'étiologie reste obscure [Ritter, 2010]. La plupart des ostéosarcomes sont sporadiques sans antécédents familiaux [Tang, 2008]. Il n'existe aucun test de laboratoire spécifique. Des niveaux élevés de phosphatase alcaline et de lactate déshydrogénase sont non-spécifiques [Bielack, 2009]. Les données existantes indiquent que les ostéosarcomes présentent parfois un large éventail d'altérations génétiques et moléculaires : des gains, des pertes, des arrangements de régions chromosomiques, des inactivations de gènes suppresseurs de tumeur, des dérèglements des principales voies de signalisation [Tang, 2008]. Une augmentation de l'incidence de l'ostéosarcome parmi plusieurs maladies héréditaires telles que le rétinoblastome et le syndrome de Li-Fraumeni existe [Ritter, 2010].

La différenciation terminale des ostéoblastes, qui sont dérivés de cellules souches mésenchymateuses multipotentes, est un processus bien orchestré et contrôlé par une cascade de signalisations. L'ostéogenèse implique des séquences d'événements bien coordonnés : interaction mésenchymateuse-épithéliale, condensation et différenciation (Figure 19). Les caractéristiques pathologiques et moléculaires de la majorité des ostéosarcomes suggèrent qu'ils peuvent être causés par des perturbations des voies de différenciation ostéoblastique. En effet, des stimuli ostéogéniques tels que les BMPs ont plutôt tendance à stimuler la croissance des cellules au dépend de leur différenciation. [Tang, 2008]

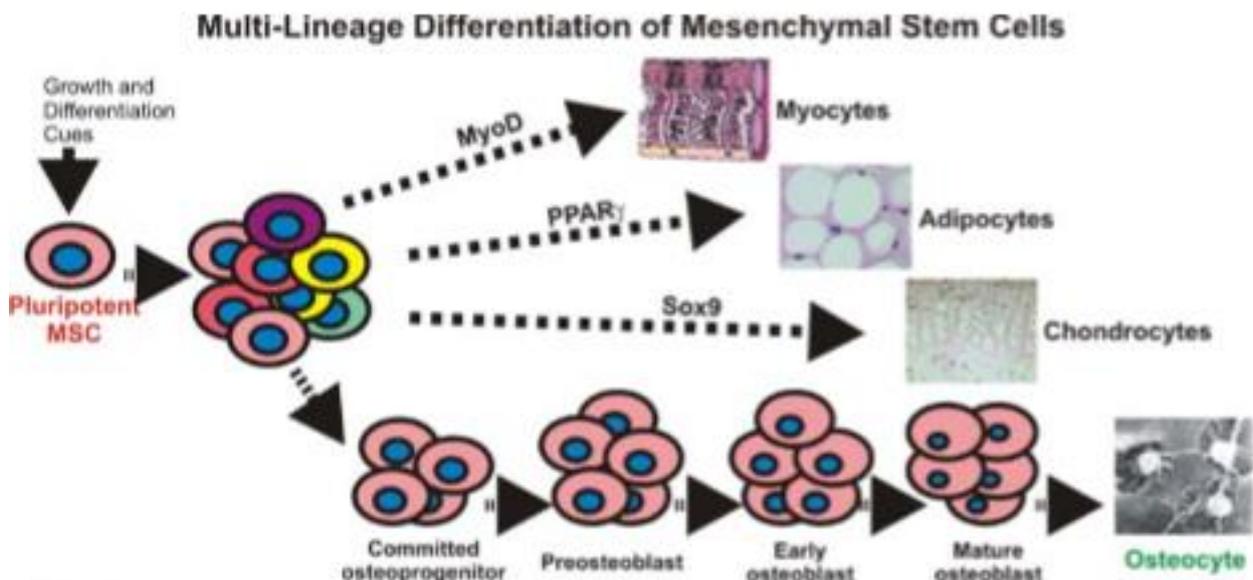


Figure 19 La différenciation ostéogénique. Avec des stimuli appropriés, les cellules souches mésenchymateuses peuvent donner lieu à plusieurs lignées, telles que les myocytes, les adipocytes, les chondrocytes et les ostéocytes, [Tang, 2008].

L'exposition aux rayonnements ionisants et à des agents alkylants peuvent également contribuer au développement de l'ostéosarcome sauf s'il existe un long intervalle entre cette exposition et l'apparition de la tumeur [Bielack, 2009].

2.6 Diagnostic

2.6.1 Symptômes et signes cliniques

Pour la plupart des patients les symptômes et signes cliniques sont localisés. Une douleur locale, suivie d'un gonflement et d'une limitation des mouvements articulaires localisés sont les signes et des symptômes typiques de l'ostéosarcome. Dans de rare cas, en particulier chez les patients atteints de tumeurs ostéolytiques, une fracture pathologique peut être le premier signe [Ritter, 2010]. Une douleur chronique de plusieurs mois peut soudainement devenir plus sévère. L'augmentation de l'intensité de la douleur peut alors être corrélée avec la pénétration de la tumeur dans l'os cortical et l'irritation du périoste ou une fracture pathologique. La douleur nocturne est fréquente et peut réveiller pendant le sommeil. Par conséquent, une douleur chronique la nuit ne doit pas être confondue avec une « douleur de croissance », surtout quand elle est unilatérale. Les patients ont souvent des blessures mineures, des entorses ou des tractions musculaires lors d'un sport. L'examen physique peut révéler une sensibilité localisée, un mouvement restreint de l'articulation adjacente, une atrophie musculaire ou une claudication, ou la présence d'une masse, d'un gonflement ou d'une déformation. Aussi, il est essentiel de procéder à un examen complet de l'articulation au-dessus et en dessous de la zone douloureuse, ainsi que des examens systématiques de la colonne vertébrale. [Wittig, 2002]

2.6.2 Examens radiologiques

Les radiographies standard sont d'une grande utilité pour évaluer les changements osseux mais aussi pour détecter l'ostéosarcome et identifier des fractures pathologiques [Wittig, 2002]. Elles sont complétées idéalement par l'imagerie en coupe et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) qui permettent d'évaluer la tumeur avant la biopsie. La détermination systématique du stade se concentre sur les poumons et le squelette, lieux de formation de la majorité des métastases. Des radiographies de la poitrine, un scanner du thorax et une scintigraphie osseuse, complétés par une IRM des zones touchées par les métastases sont également réalisés. [Bielack, 2009]



Figure 10 Radiographie d'un ostéosarcome à la fois sclérotique et lytique, au niveau proximal de l'humérus droit, montrant une ossification dans les tissus mous environnants (flèches). Radiographie d'un ostéosarcome sclérotique dans la région métaphysaire proximale du tibia droit. IRM en coupe sagittale, ostéosarcome au niveau distal du fémur droit. [Wittig, 2002]

Les analyses IRM incluent l'ensemble des os concernés ainsi que les articulations voisines afin de ne pas manquer les sauts de lésions [Ritter, 2010]. L'IRM est la plus utilisée pour déterminer l'étendue intra-osseuse et extra-osseuse de la tumeur (Figure 20) et facilite la localisation des sauts de lésions. Une image IRM au moment de la résection chirurgicale permet une planification exacte de l'ostéotomie, de 2 à 3 cm autour de la tumeur, dans le but de parvenir à une grande marge chirurgicale [Wittig, 2002]. Quand une nécrose extensive et un œdème environnant sont présents, la tomodynamométrie est mieux que l'IRM pour déterminer avec précision le degré d'implication des tissus mous et de la proximité de la tumeur aux structures neuro-vasculaires. Ceci grâce à l'utilisation des produits de contraste qui mettent en évidence les structures vasculaires adjacentes. La tomodynamométrie est aussi recommandée pour la détection des métastases pulmonaires [Wittig, 2002]. La scintigraphie est préconisée pour détecter les métastases osseuses, elle permet également la mesure intra-osseuse de la tumeur et de détecter les sauts de lésions. Même si l'IRM est plus précise à cet effet, la scintigraphie au thallium est utile pour évaluer la réponse de la tumeur à la chimiothérapie néoadjuvante et déceler la récurrence locale [Wittig, 2002].

2.6.3 Examen de la biopsie

La biopsie est une étape clé pour établir le diagnostic de l'ostéosarcome. Mal réalisée elle est une cause fréquente d'erreur de diagnostic et de récurrence locale [Wittig, 2002]. La technique la plus appropriée afin d'obtenir un échantillon suffisant pour un examen histologique adéquate est la biopsie ouverte. La cytoponction à l'aide d'une aiguille très fine n'est pas appropriée [Ritter, 2010]. La cytoponction avec une aiguille de plus gros calibre peut être réalisée, à condition qu'un échantillon suffisant puisse être obtenu. Les avantages de cette technique est

qu'elle est peu invasive, ne nécessite pas d'incision et les risques d'infection, de contamination ou de fracture post-biopsie sont réduits alors [Wittig, 2002]. Les paramètres du diagnostic sont la prolifération de cellules tumorales malignes mésenchymateuses et la production en quantité variable de tissu ostéoïde et/ou d'os par les cellules tumorales. Une matrice fibreuse et cartilagineuse peut également être présente [Santos-Silva, 2011]. La biopsie permet de confirmer le diagnostic, de délimiter les zones touchées ainsi que de déterminer le stade de la maladie pour orienter la thérapeutique, planifier l'approche chirurgicale et évaluer le pronostic.

2.7 Classification

Actuellement, le système le plus souvent utilisé pour décrire l'étendue de nombreuses tumeurs solides est la classification TNM (tableaux 3 et 4) [Ritter, 2010]. T (tumeur) prend en compte la taille de la tumeur primitive et le degré de propagation dans les tissus voisins (envahissement local). N (ganglions lymphatiques) décrit le nombre et emplacement de ganglions lymphatiques régionaux qui contiennent des cellules cancéreuses. M (métastases) correspond à la propagation du cancer vers des organes éloignés. La classification histologique de la tumeur se base sur l'aspect et le comportement des cellules cancéreuses observées au microscope : bien différenciées (bas grade), indifférenciées (haut grade). Les caractéristiques TNM attribuées au cancer, peuvent être regroupées en différents stades. Les stades sont exprimés par un chiffre allant de I (le moins avancé) à IV (le plus avancé).

T	Tumeur primitive
TX	Impossible d'évaluer la tumeur primitive
T0	Aucun signe de tumeur primitive
T1	Tumeur dont le diamètre est égal ou inférieur à 8 cm
T2	Tumeur dont le diamètre est supérieur à 8 cm
T3	Présence de tumeurs à plusieurs emplacements dans le même os
N	Ganglions lymphatiques régionaux
NX	Impossible d'évaluer les ganglions lymphatiques régionaux
N0	Absence de métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux
N1	Présence de métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux
M	Métastases à distance
MX	Impossible d'évaluer les métastases à distance
M0	Absence de métastases à distance
M1a	Présence de métastases seulement au poumon
M1b	Présence de métastases à d'autres emplacements
G	Grade
GX	Impossible d'évaluer le grade
G1-G2	Bas grade
G3-G4	Haut grade

Tableau 3 Classification TNM du sarcome osseux [Ritter, 2010].

Stade	TNM			Grade
IA	T1	N0	M0	Bas
IB	T2	N0	M0	Bas
IIA	T1	N0	M0	Haut
IIB	T2	N0	M0	Haut
III	T3	N0	M0	Tout grade
IVA	Tout T	N0	M1a	Tout grade
IVB	Tout T	N1	Autre M	Tout grade
	Tout T	Tout N	M1b	Tout grade

Tableau 4 Un regroupement des données de la classification TNM pour former des stades [Ritter, 2010].

En chirurgie orthopédique, la classification selon Enneking est la plus courante (tableau 5) [Wittig, 2002]. Elle tient compte du grade de la tumeur (bas grade ou haut grade), de l'emplacement de la tumeur soit à l'intérieur de l'os (intracompartimentale) soit à l'extérieur

de la paroi osseuse (extracompartimentale), de la présence ou de l'absence de métastases. Le stade IIB concerne la grande majorité des ostéosarcomes [Bielack, 2009], peu d'ostéosarcome sont de malignité de bas de grade [Carrle, 2006].

Stade	Grade et extension anatomique
I	Tumeur de bas grade
IA	Intracompartimentale
IB	Extracompartimentale
II	Tumeur de haut grade
IIA	Intracompartimentale
IIB	Extracompartimentale
III	Autre grade avec métastases

Tableau 5 Classification selon Enneking [Wittig, 2002].

2.8 Différentes formes

Il existe plusieurs variantes d'ostéosarcomes selon l'aspect histologique, clinique, le comportement biologique, le site, le degré de différenciation allant de très différencié à indifférencié et l'atypie [Soares, 2005]. La tendance destructrice ou constructive de la tumeur permet de distinguer les sarcomes ostéolytiques et ossifiants.

Sur le plan histologique, d'après le principal type de matrice au sein de la tumeur, trois principaux sous-types d'ostéosarcome sont décrits. L'ostéoblastique qui représente environ 70% des ostéosarcomes, le chondroblastique et le fibroblastique qui représentent environ chacun 10%. D'autres variétés histologiques comprennent : l'ostéosarcome télangiectasique, l'ostéosarcome anaplasique, l'ostéosarcome riche en cellules géantes, l'ostéosarcome à petites cellules rondes qui est une forme rare (1,3% des ostéosarcomes). Cette tumeur ressemble au sarcome d'Ewing du point de vue histologique mais produit une matrice ostéoïde [Tang, 2008].

Habituellement trois types d'ostéosarcome sont décrits selon le point de départ de la tumeur :

- L'ostéosarcome central qui est dû au développement anarchique des cellules de la moelle osseuse.
- L'ostéosarcome périphérique ou périostéal qui se développe à partir des diaphyses et de la face profonde du périoste.
- L'ostéosarcome parostéal qui prend origine à la face externe du périoste [Carrle, 2006]. La masse tumorale partiellement minéralisée se développe en surface puis s'étend dans les tissus mous [Ritter, 2010].

Les ostéosarcomes peuvent être classés en fonction de leur localisation : l'ostéosarcome crâniofacial ; l'ostéosarcome extra-squelettique (ou extra-osseux) qui est rare (moins de 5 % des ostéosarcomes) et l'ostéosarcome en tant que tumeur maligne secondaire. L'ostéosarcome extra-squelettique fait partie des tumeurs qui produisent de l'ostéoïde mais provenant d'organes autre que l'os [Carrle, 2006].

2.9 Ostéosarcome de la tête et du cou

Les ostéosarcomes de la tête et du cou sont rares et représentent moins de 10% de tous les ostéosarcomes et moins de 1% de tous les cancers en ORL. Les hommes sont autant touchés que les femmes et la moyenne d'âge est de 40 ans. Il y a environ 2 à 3 cas pour 1 million de personnes par an et le taux de survie à 5 ans est entre 60 % à 70 %. Les symptômes dépendent de la localisation de la tumeur et ont une durée variable. Patel et coll. ont évoqué un cas de parésie du nerf sous-orbitaire (V2). Par rapport aux ostéosarcomes des os longs, ces tumeurs sont plus susceptibles de récidiver localement après 5 ans mais le risque de développement de métastases est moins important. [Mendenhall, 2010]

Les ostéosarcomes de la tête et du cou sont localisés par ordre de fréquence comme suit : d'abord au niveau de la mandibule, puis au niveau du maxillaire, de la région zygomatique, de la base du crâne et enfin des autres os. Certains facteurs de risque tels que des antécédents de traitement par les rayonnements ionisants, le rétinoblastome, la maladie de Paget et la dysplasie fibreuse des os ont été associés au développement de ces ostéosarcomes [Santos-Silva, 2011].

2.9.1 Ostéosarcome des maxillaires

Les ostéosarcomes des maxillaires représentent environ 5% des ostéosarcomes et affectent généralement les adultes entre 30 et 40 ans. La mandibule est le site le plus touché. La plupart de ces ostéosarcomes est de type ostéoblastique produisant une matrice ostéoïde en quantité variable. Les ostéosarcomes des maxillaires sont moins agressifs que ceux des os longs car ils génèrent rarement des métastases et le pronostic est nettement meilleur. De plus, des motifs esthétiques ou fonctionnels poussent les patients à consulter assez tôt ce qui favorise un diagnostic précoce. [Soares, 2005]

Dans le monde, une augmentation de l'incidence des cancers de la bouche chez les jeunes patients a été constatée. Ceci souligne le rôle essentiel du praticien pour la détection précoce et la prévention en faisant un examen oral complet et systématique lors de la prise en charge d'un patient. En effet, plusieurs lésions buccales, y compris les tumeurs malignes peuvent être asymptomatiques ou avoir des manifestations souvent non spécifiques. Ce qui explique le retard

considérable avant que le diagnostic correct soit établi et le faible pronostic. En général, les signes et symptômes de l'ostéosarcome dans la région buccale sont discrets : un gonflement régional, une douleur de faible intensité, une paresthésie, une mobilité dentaire, un changement dans l'adaptation des prothèses. Les signes radiologiques sont variables : des lésions lytiques, condensantes ou mixtes, une image en « motif rayon de soleil » résultat d'une réaction périostée par des dépôts de spicules osseux en surface de la lésion, un élargissement du ligament alvéolodentaire et du canal mandibulaire. Ces aspects radiologiques ne sont pas pathognomoniques et sont difficiles à interpréter ou à distinguer des images de dysplasie fibreuse ou d'une ostéomyélite. Ainsi, un examen histologique est essentiel pour établir le diagnostic final et la figure thérapeutique. [Santos-Silva, 2011]

2.9.2 Etude de cas

Santos-Silva et coll. décrivent les différentes étapes de diagnostic et de prise en charge d'une patiente atteinte d'ostéosarcome du maxillaire. Leur patiente s'est présentée en consultation motivée par un inconfort lié à une tuméfaction au niveau du maxillaire gauche depuis quelques mois. Les examens cliniques et radiologiques ainsi que l'étude de la biopsie ont permis d'établir le diagnostic. La prise en charge a consisté : en l'exérèse chirurgicale suivie d'une radiothérapie post-opératoire, avec au final une réhabilitation prothétique (Figures 21 et 22) [Santos-Silva, 2011].

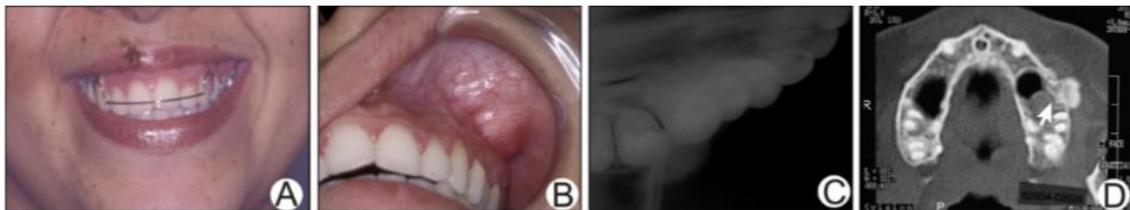


Figure 21 Photographie d'une patiente atteinte d'ostéosarcome maxillaire impliquant le sinus : lésion crouteuse au niveau de la lèvre supérieure assimilable à une herpès labiale récurrente (A), un nodule dans le vestibule supérieure couverte par une muqueuse normale (B), une image radio-opaque discrète en « motif rayon de soleil » (C), tomographie en coupe axiale montrant un effacement partiel du sinus maxillaire gauche et une formation d'un tissu dur exophytique dans la paroi latérale du sinus maxillaire gauche (flèche) (D) [Santos-Silva, 2011].



Figure 22 Photographie de la prise en charge d'une patiente atteinte d'ostéosarcome maxillaire. Coupe histologique montrant des cellules atypiques avec des tailles et des formes variables, et un composant ostéoïde (*) visible avec le dépôt d'une matrice osseuse irrégulière dans les cellules atypiques (A). Pièce de résection (B) présentant des marges macroscopiques exemptes de tumeur. Prothèse amovible partielle oblitérant le sinus maxillaire (D) [Santos-Silva, 2011].

Soares et coll. font part du cas d'un patient âgé de 20 ans atteint d'ostéosarcome d'une grande sévérité. Le diagnostic a été précoce, l'examen anatomo-pathologique de la tumeur a révélé un polymorphisme cellulaire et de vastes zones de dépôt d'ostéoïde typique ostéoblastique. Le traitement a consisté en une héli-mandibulectomie associée à une chimiothérapie. Malgré ce diagnostic et cette prise en charge précoces, la récurrence est survenue quelques mois, conduisant au décès. [Soares, 2005]

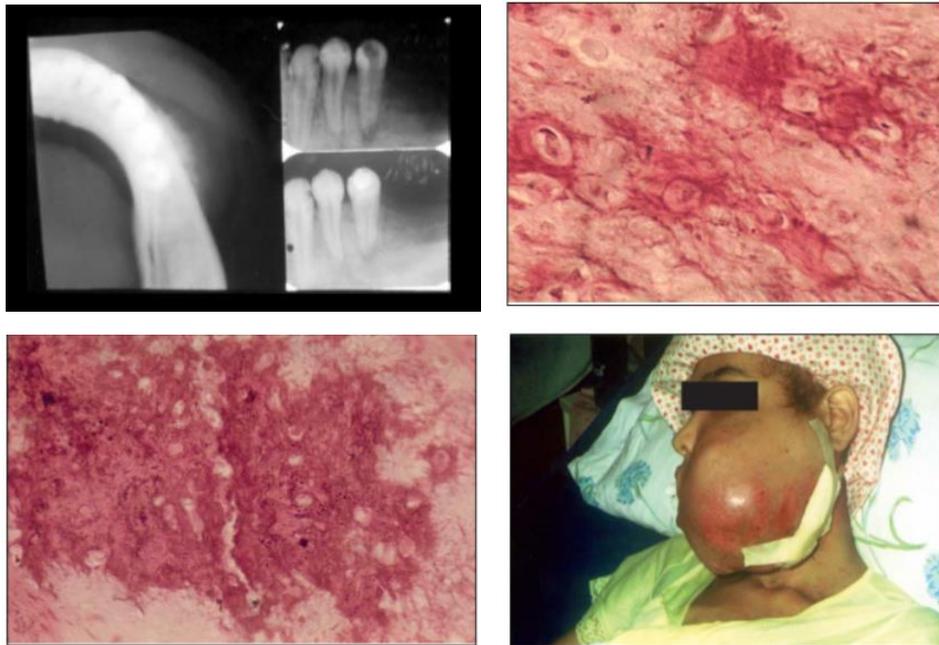


Figure 23 Radiographies : occlusale montrant la corticale externe avec une radio-opacité semblable à « rayons de soleil », rétro-alvéolaires montrant une image périapicale de la deuxième prémolaire. Coupe histologique montrant une zone ostéoïde et pléomorphisme cellulaire (en haut). Coupe histologique montrant une vaste zone de dépôt ostéoïde (en bas). Photographie montrant l'aspect clinique extraoral de la récurrence 8 mois après [Soares, 2005].

2.9.3 Ostéosarcome du larynx

Les études de cas sur l'ostéosarcome du larynx sont limitées à 15 cas dans la littérature. L'étiologie de l'ostéosarcome du larynx reste obscure et de diagnostic difficile. Il n'y a pas de corrélation directe avec la consommation d'alcool et de tabac. Le patient peut se plaindre d'un enrouement, d'une dyspnée ou d'une obstruction aiguë des voies respiratoires. Un examen histologique est nécessaire pour confirmer le diagnostic. Le pronostic dépend de la taille de la tumeur. Le taux de survie à 5 ans en fonction du degré de différenciation de la tumeur est de 50% pour une tumeur différenciée contre 5% pour une tumeur peu différenciée. Le traitement est essentiellement chirurgical. [Sanaat, 2009]

2.10 Développement des métastases

Plusieurs facteurs sont impliqués, certaines enzymes tels les métalloprotéases (MMP-2 et 9), m-Calpaïne jouent un rôle dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Les voies de

signalisations telles que la Wnt/caténine-b et la Src-kinase sont des inducteurs de la migration, Notch est un promoteur de l'invasion [PosthumaDeBoer, 2011]. Les BMPs-2 ont été détectées dans les métastases, ce qui suggère que la voie de la BMP peut participer à la progression et à l'agressivité de la tumeur [Guo, 1999]. Ces molécules peuvent être synthétisées par les cellules tumorales, mais également par les cellules endothéliales de l'hôte pendant la néoangiogénèse.

L'ostéosarcome a une forte tendance au développement de métastases. Environ 20% des patients présentent des métastases pulmonaires au moment du diagnostic initial et 40% d'entre eux les auront à un stade ultérieur [PosthumaDeBoer, 2011]. Plus de 90% des patients meurent de ces métastases pulmonaires. Des études récentes indiquent cependant que l'incidence des métastases extra-pulmonaires a augmenté [Misra, 2001]. L'os est le deuxième site le plus fréquent et n'est impliqué généralement qu'après qu'une métastase pulmonaire a eu lieu. Les métastases orbitaires [Misra, 2001] et les métastases au niveau des ganglions lymphatiques sont décrites mais rares [Ritter, 2010]. Le larynx peut être aussi le siège de métastase [Sanaat, 2009].

Newman et DiLoreto ont signalé le seul cas de métastase au niveau de l'orbite chez un enfant. Le fond d'œil et les mouvements oculaires étaient normaux mais une protrusion de l'œil droit a été observée. Une échographie puis une tomодensitométrie ont été réalisées et enfin une biopsie pour établir le diagnostic. Ces examens ont révélé une masse dense de tissus mous dans l'orbite droite déplaçant le globe oculaire et le nerf optique. Une zone de nécrose et des cellules fusiformes malignes ont été constatées dans la masse mais pas de calcifications [Misra, 2001].



Figure 24 Photographie d'un patient montrant une exophtalmie de l'œil droit. Echographie montrant une masse rétrobulbaire [Misra, 2001].

2.11 Traitements

Non traitée, la plupart des ostéosarcomes se développent et se propagent rapidement. La prise en charge des patients nécessite la coopération étroite au sein d'une équipe multidisciplinaire expérimentée qui englobe les oncologues, les pédiatres, les chirurgiens, les pathologistes et les

radiologiques. Avant 1970, l'amputation a été la principale alternative et la survie était faible, 80% des patients sont décédés à la suite de métastases. Le traitement actuel comprend en plus de la chirurgie, une chimiothérapie pré et postopératoire [Tang, 2008].

2.11.1 Evaluation des risques

Une série d'examen est nécessaire avant le début du traitement afin d'évaluer l'état de santé générale et l'état de fonctionnement des organes : des analyses de sang, les bilans de la fonction rénale et hépatique ainsi que le dépistage du VIH et de l'hépatite. Etant donné que la chimiothérapie peut entraîner un dysfonctionnement cardiaque et auditif, une évaluation de base par une échocardiographie ou ventriculographie radionucléide ainsi qu'un audiogramme sont réalisés. Le stockage du sperme peut être recommandé. [Bielack, 2009]

2.11.2 Chirurgie

Le développement des médicaments anticancéreux, les progrès des techniques chirurgicales et les améliorations en radiologie ont permis le traitement chirurgical conservateur et la reconstruction du membre chez 90 à 95% des patients. La guérison et le taux de survie à long terme ont augmenté, entre 60 et 80% chez les patients présentant une maladie localisée [Wittig, 2002].

2.11.3 Chimiothérapie

Seulement environ 20% des patients peuvent être guéris sans chimiothérapie. Le traitement chirurgical seul est insuffisant puisque 80% des patients atteints d'ostéosarcome en apparence localisé développent des métastases si la chimiothérapie n'est pas incluse dans le traitement [Ritter, 2010]. De plus il y a 30% de risque de récurrence dans les 5 ans, associée à une survie moyenne inférieure à 1 an [Tang, 2008]. Les agents chimiothérapeutiques les plus souvent employés sont les suivants : la doxorubicine, le cisplatine, l'ifosfamide et le méthotrexate [Tang, 2008]. Un certain nombre d'agents ont été développés pour aider à réduire la toxicité liée à la chimiothérapie. L'introduction des antagonistes de la sérotonine seuls ou combinés au dexaméthasone ont considérablement réduit les vomissements induits par une chimiothérapie hautement émétisante, en particulier le cisplatine [Ritter, 2010]. Les mécanismes d'action de ces agents chimiothérapeutiques et leurs effets secondaires sont résumés dans le tableau ci-dessous [Wittig, 2002].

Agent	Mécanisme d'action	Effets secondaires
Doxorubicine Adriamycine®	Liaison aux points de déroulement de la double hélice de l'ADN Inhibition de la synthèse de l'ADN et de l'ARN	Cardiomyopathie Anomalie électrocardiographique Vomissement Alopécie Mucite Myélosuppression
Cisplatine Platinol®	Inhibition de la synthèse de l'ADN Liaison directe à l'ADN de la tumeur Dénaturation de la double hélice	Insuffisance rénale aiguë et chronique Neuropathie périphérique Ototoxicité Vomissement Myélosuppression Alopécie Hypomagnésémie.
Ifosfamide Ifex®	Réticulation des brins d'ADN Inhibition de la synthèse de l'ADN	Cystite hémorragique Insuffisance rénale Myélosuppression Alopécie Vomissement Encéphalopathie
Méthotrexate Rheumatrex®	Inhibition de la synthèse de la purine et de l'acide thymidylique	Insuffisance rénale Mucite Myélosuppression Effet sur le système nerveux central rare

Tableau 6 Agents thérapeutiques utilisés pour la chimiothérapie de l'ostéosarcome [Wittig, 2002].

PARTIE RECHERCHE

1 Introduction

Le développement de projets de recherches et d'innovations en oncologie vise à faire progresser la prise en charge et le traitement des cancers, tout en réduisant leurs effets secondaires à court terme et à long terme. Dans ce contexte, l'amélioration du ciblage thérapeutique par différentes stratégies innovantes est une voie très prometteuse. [Ahlskog, 2006] La mise au point et la validation de ces ciblage de principes actifs, moléculaires, nécessitent une bonne compréhension de la complexité de l'environnement tumoral et le développement de modèles *in vitro* de cet environnement. [Xu, 2012] Pour répondre à la complexité de cet environnement, ces modèles tumoraux doivent contenir des co-cultures cellulaires. La variabilité des procédures de co-cultures cellulaires peut influencer les résultats expérimentaux et rend la constitution de ces modèles de co-cultures difficile. Ainsi différents paramètres rendent ces co-cultures très sensibles : la différence des types cellulaires co-cultivés, les méthodes d'ensemencement, le choix d'ensemencer en même temps ou successivement les types cellulaires, le choix du premier type cellulaire ensemencé, la combinaison de milieux de culture adaptés à chaque type cellulaire, le ratio du nombre de cellules de chaque type évoluant au cours du temps, la séparation des types cellulaires au cours et à la fin des co-cultures [Ma, 2011].

Une grande partie des travaux consacrés à l'identification des voies et des molécules de signalisations impliquées dans les comportements de cellules normales et malignes, a été réalisée en utilisant des modèles de co-cultures bidimensionnelles qui permettent une manipulation facilitée des cellules [Xu, 2012]. Les progrès technologiques ont favorisé le développement de systèmes *in vitro* qui reflètent plus l'architecture des tissus biologiques par le biais de l'utilisation de la co-culture tridimensionnelle. [Sampson, 2013] Dans ce contexte, le support matriciel a un rôle primordial car il module l'adhésion et l'étalement des différents types cellulaires. Les co-cultures peuvent être réalisées sur une surface bidimensionnelle par exemple une surface en titane [Zhang, 2010] ou un vitrigel de collagène [Wang, 2005] mais aussi au sein d'un échafaudage tridimensionnelle comme une éponge à base d'amidon [Santos, 2009].

L'interaction des ostéoblastes et des cellules endothéliales a été étudiée en utilisant leur co-culture directe *in vitro*, constituant un modèle type de l'étude de l'ostéogenèse et l'angiogenèse [Zhang, 2010]. Cependant, la distinction est rarement claire entre les deux types de cellules lorsqu'elles sont mélangées. Ainsi, des études de co-culture de cellules osseuses MG-63 et de cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale (HUVEC) ont proposé l'analyse au cours du temps des deux types cellulaires en terme de prolifération et de différenciation en utilisant

un tri de cellules par FACS [Zhang, 2010] et en terme de migration par l'utilisation de microélectrodes [Kaji, 2011].

L'interaction entre les cellules endothéliales et les ostéoblastes est variable dans le temps. Le choix du type des cellules endothéliales est crucial, elles peuvent avoir des propriétés différentes selon leur origine. En outre, les cellules endothéliales non humaines montrent un comportement différent de celui des cellules humaines. Le comportement des cellules endothéliales varie quand elles étaient co-cultivées avec des ostéoblastes ou sur les biomatériaux seuls. [Cenni, 2011] Les cellules endothéliales peuvent être isolées à partir de nombreuses sources de tissus tels que le cordon ombilical (HUVEC ou cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale), le tissu cutané et la veine saphène [Rao, 2013]. Les comportements cellulaires peuvent être antagonistes, compétitifs (concurrence sur les nutriments et l'inhibition de la croissance) ou synergiques (coopération métabolique). Une espèce va envahir, produire de composés inhibiteurs, consommer des nutriments essentiels. [Elias, 2012]

2 Objectif

Une étude a été menée au laboratoire « NanoMédecine Régénérative Ostéoarticulaire et Dentaire » UMR INSERM 1109 dont le but est d'initier la mise au point d'un modèle de vascularisation tumoral *in vitro* mimant l'environnement naturel d'une tumeur solide dans la perspective de tester des molécules anti-cancéreuses. La base de ce modèle est une co-culture de cellules tumorales et de cellules vasculaires soutenues par une matrice tridimensionnelle.

3 Matériels et méthode

La stratégie est de valider une co-culture de cellules tumorales issues d'ostéosarcomes humains (MG-63) et des cellules endothéliales humaines issues du cordon ombilical (HUVEC) soutenues par une membrane fine fibreuse de polycaprolactone (PCL).

3.1 Formation des membranes nanofibreuses par electrospinning

L'electrospinning est une méthode de production de nanofibres à partir d'une large variété de polymères naturels et synthétiques. La solution de polymères est injectée à flux constant à travers une seringue chargée à haut voltage (entre 10 et 30 kW en général). Le voltage appliqué induit une charge à la surface de la gouttelette de liquide. Lorsque la charge est suffisamment élevée, la surface hémisphérique du liquide s'allonge et un cône de Taylor se forme. En augmentant encore le voltage, un jet de liquide est éjecté du cône de Taylor et est attiré par le collecteur lié à la terre (Figure 25). Pendant ce procédé, les solvants s'évaporent de la solution

de polymère, laissant des fibres de polymères sèches sur le collecteur. Suivant la durée du procédé les membranes fibreuses peuvent être plus ou moins épaisses. Les membranes nanofibreuses électrospinnées sont obtenues en utilisant du PCL dissous dans du dichlorométhane et du diméthylformamide (Figure 26).

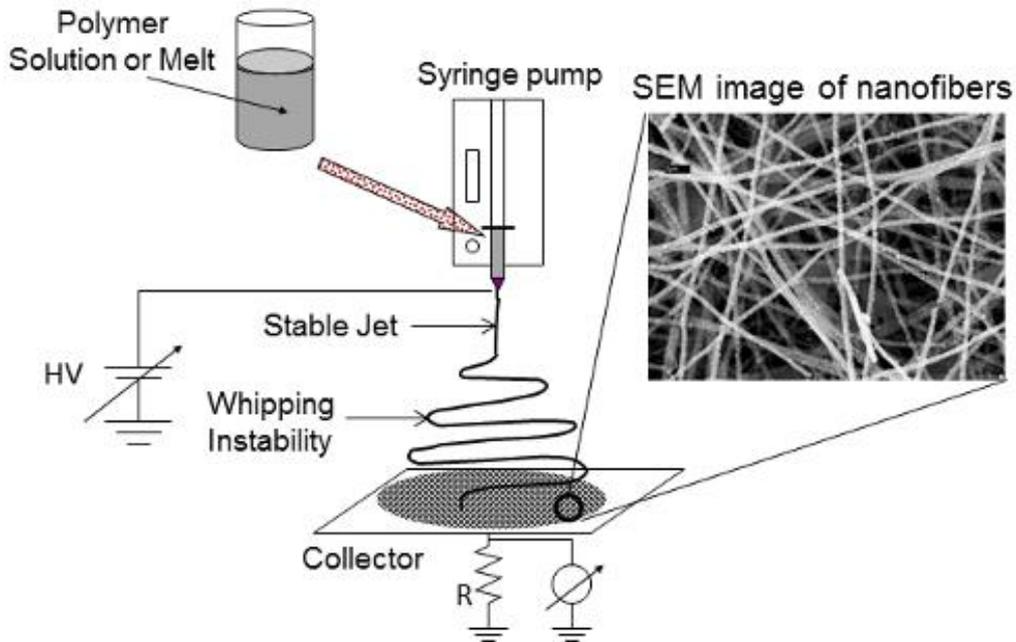


Figure 25 Principe de l'electrospinning [Joo Group, 2011].

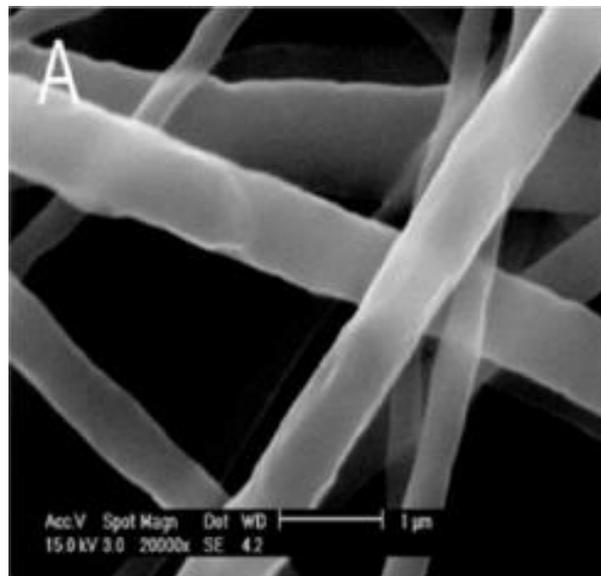


Figure 26 Microphotographie d'une membrane de PCL électrospinnée montrant l'architecture des fibres à l'échelle du nano (microscopie électronique à balayage) [Mendoza, 2012].

3.2 Cultures cellulaires

3.2.1 Lignée tumorale issue d'ostéosarcome MG-63

Les cellules MG-63 (CRL-1427, ATCC®) sont des cellules humaines issues d'un ostéosarcome, prélevées sur un jeune garçon caucasien âgé de 14 ans. Leur morphologie est de type fibroblastique. Ces cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF), 2mM de glutamine, 1mM de sodium-pyruvate, 250µg/ml de fungizone et 10µg/ml de pénicilline/streptomycine. Le milieu de culture est changé deux fois par semaine.

3.2.2 Cellules endothéliales primaires HUVEC

Les HUVEC sont des cellules endothéliales humaines matures isolées à partir de la veine de cordon ombilical. Elles ont donc les caractéristiques de cellules endothéliales de types veineux. Elles expriment par ailleurs l'ensemble des marqueurs spécifiques des cellules endothéliales, dont l'antigène de surface CD31. Ces cellules sont cultivées dans du milieu « Endothelial Cell Growth Medium » (Promocell), complémentées par du « suplement mix » (Promocell), 250 unités/ml d'une solution de fungizone et 10 unités/ml d'une solution de pénicilline-streptomycine. Le milieu de culture est changé deux fois par semaine.

3.2.3 Décongélation des cellules

Pour la décongélation, la suspension cellulaire conservée à -80°C est réchauffée rapidement dans un bain marie à 37°C pendant 1 à 2 minutes. La suspension cellulaire est diluée dans du milieu complet afin de préserver les cellules de l'effet toxique du DMSO qui est le milieu de congélation. Après centrifugation (220g, 5min), le culot cellulaire est récupéré et suspendu dans un nouveau milieu complet et cultivé dans les flasques.

3.3 Co-culture

3.3.1 Trypsinisation et ensemencement

Les cellules cultivées dans les flasques sont récupérées, le culot cellulaire est suspendu dans du milieu de culture complet. Afin de discriminer les cellules cancéreuses des cellules endothéliales lors de l'analyse des co-cultures par fluorescence. Les MG-63 ont été préalablement marquées au PKH26, molécule fluorescent dans la couleur rouge. Pour cela, les cellules sont rincées avec du milieu sans sérum, puis incubées durant 5 minutes avec une solution de PKH26 diluée à 1/500 (Sigma). Le marquage membranaire au PKH26 est inhibé ensuite par un ajout de sérum pour arrêter la montée excessive du colorant dans les membranes cellulaires.

Pour les co-cultures, les cellules sontensemencées à une densité de 10000 cellules/cm² pour les HUVEC et 1000 cellules/cm² pour les MG-63, sur lamelles de verre dans des plaques de 24 puits et sur membranes de PCL dans des plaques de 48 puits. Cet ensemencement fait suite à une stérilisation à l'alcool et un traitement aux UV des supports de culture. Au cours de la co-culture, le milieu est constitué par le mélange du même volume de milieu complet pour HUVEC et de milieu complet pour MG-63. Les plaques de culture sont placées à l'incubateur à 37°C, sous atmosphère humide avec 5% de CO₂. Le changement de milieu est effectué deux fois par semaine.

3.3.2 Protocole expérimental

Deux méthodes ont été choisies pour la réalisation de la co-culture, en choisissant un temps de culture plus longtemps afin que la monocouche d'HUVEC soit bien installée, réduisant ainsi l'invasion de la monocouche de cellules endothéliales par les cellules cancéreuses. La méthode 1 consiste à ensemer les cellules HUVEC et MG-63 au même moment (J0). Les co-cultures sont ensuite fixées à différents temps (J7, J14) après réalisation d'immunofluorescence indirecte puis analysées au microscope à fluorescence (Figure 27). La méthode 2 quant à elle, consiste à ensemer d'abord les cellules HUVEC (J0) et ensuite les cellules MG-63 (J7). Les cultures sont également fixées à différents temps (J14, J21 et J28), la même analyse pour l'analyse de l'organisation cellulaire par fluorescence (Figure 27). Au cours de chaque culture, une culture témoin constituant a été réalisée en l'ensemencement de cellules HUVEC seules (Figure 27).

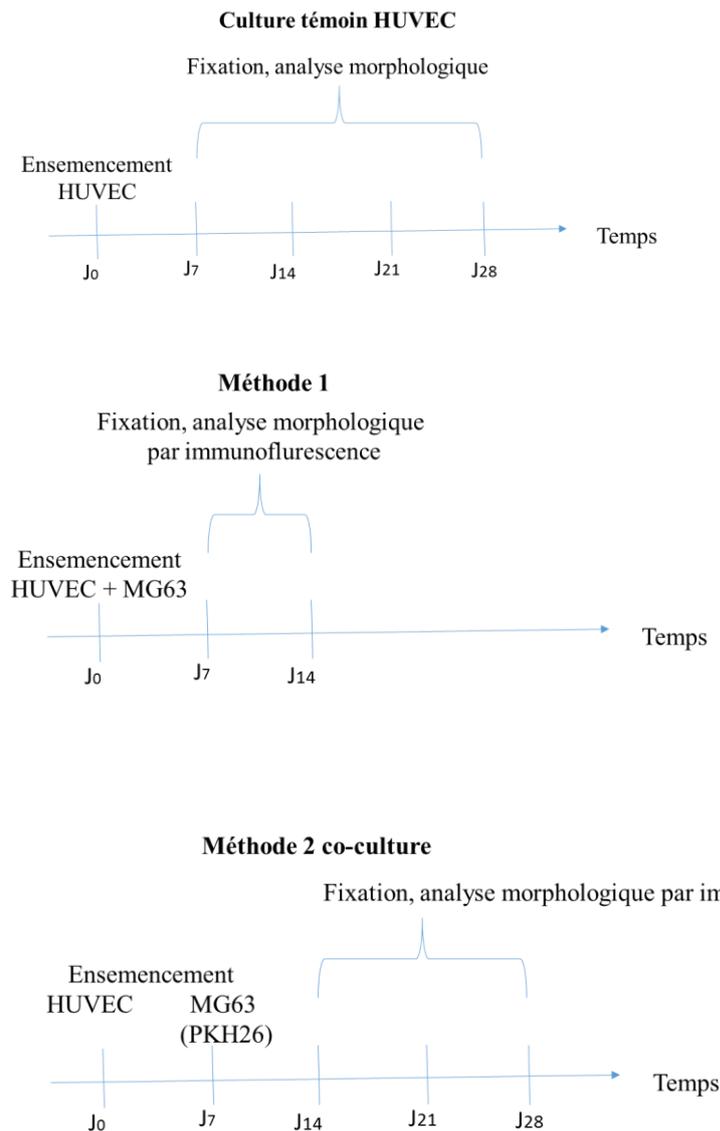


Figure 27 Schémas de synthèse des protocoles expérimentaux des co-cultures et de la culture témoin.

3.4 Étude de la culture cellulaire des MG-63 sur les membranes de PCL par Alamar Blue®

L'activité et la prolifération des cellules sont évaluées par le test « Alamar Blue® » (AbD Serotec). Celui-ci comprend un indicateur de croissance colorimétrique basé sur la détection de l'activité métabolique : la résazurine, indicateur d'oxydoréduction.

Les puits de culture sont lavés, avec du PBS, deux fois, pour éliminer le milieu de croissance contenant du rouge de phénol. Un milieu de culture sans rouge de phénol avec 10% de solution d' « Alamar Blue® » est ajouté dans chaque puits. Les plaques de culture sont placées dans l'incubateur pendant 4 heures à 37°C, 5% de CO₂. Parallèlement aux échantillons cellulaires, des puits servant de témoins sans cellules sont incubés dans les mêmes conditions. A l'issue du

temps d'incubation, le surnageant est récupéré dans une plaque 96 puits, placée ensuite dans un spectrophotomètre. La densité optique est mesurée à $\lambda = 570\text{nm}$ (absorbance du composé réduit) et $\lambda = 595\text{nm}$ (absorbance du composé oxydé). Les puits de culture sont lavés avec du PBS pour éliminer le milieu avec l' « Alamar Blue ® », puis du nouveau milieu de culture complet est ajouté dans ces puits.

3.5 Immunofluorescence indirecte

Afin de permettre l'observation au microscope et d'identifier les cellules endothéliales, un marquage spécifique de celles-ci par CD31 a été réalisé.

Les cellules sont fixées avec du PFA (paraformaldéhyde) à 4% pendant 10 minutes à 4°C, puis rincées 3 fois au PBS pendant 5 minutes à température ambiante. Une perméabilisation et saturation sont ensuite réalisées avec une solution composée de 0,1% de Triton X-100, 1% de BSA (albumine de sérum bovin) pendant 30 minutes à température ambiante. L'anticorps primaire lapin anti-CD31 est ensuite appliqué (tableau 7), à une concentration de 1/400 (200µl/puits) pendant 2 heures à température ambiante. Les puits sont rincés au PBS à température ambiante. L'anticorps secondaire chèvre anti-lapin couplé à l'Alexa fluor 488 est ajouté à une concentration 1/200 (200µl/puits) pendant une heure, à l'abri de la lumière et à température ambiante. Après cette incubation, les cellules sont rincées au PBS, puis incubées avec le DAPI (200ng/ml) (tableau 7), pendant 10 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Un dernier rinçage au PBS est enfin réalisé. Les échantillons marqués sont montés sur une lame de verre recouverte par une autre lamelle, avec un milieu de montage préservant la fluorescence (DAKO ®) et permettant l'observation au microscope. Les images sont obtenues avec un microscope à épifluorescence (DM 4000B, Leica), équipé d'une caméra (DFC 300FX, Leica), et le logiciel Pixia est utilisé pour l'acquisition des images. Les images sont traitées avec le logiciel Fiji.

Produit	Détection	Concentration	Couleur
DAPI	Noyau	200	Bleu
Ac I lapin	CD31	1/400	-
Ac II chèvre	Ac I lapin	1/200	Vert

Tableau 7 Colorants de suivi cellulaire.

4 Résultats et discussion

4.1 Analyse de la prolifération cellulaire des MG-63 sur membrane de PCL

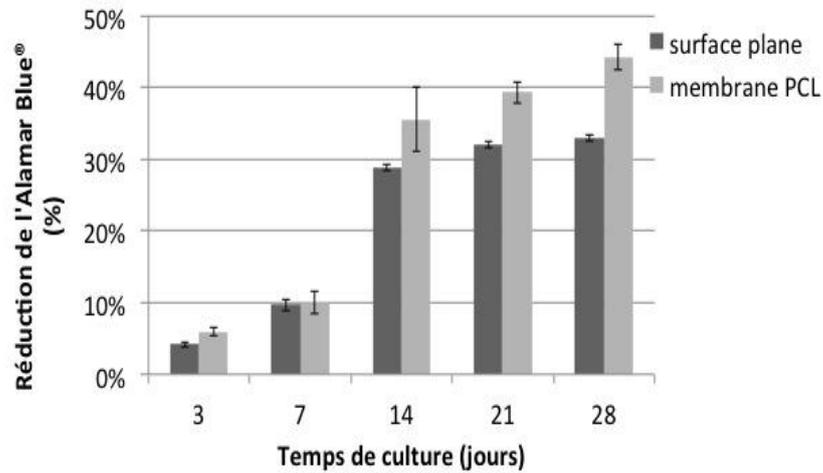


Figure 28 Analyse de l'activité mitochondriale des MG-63 par « Alamar Blue® ». Comparaison de l'activité mitochondriale des cellules MG-63 sur membrane nanofibreuse de PCL et sur lamelle de verre. Barres = erreur standard.

La biocompatibilité des MG-63 cultivées sur les membranes nanofibreuses de PCL a été vérifiée en mesurant leur activité métabolique. Les tests ont été effectués dans les mêmes puits à 3, 7, 14, 21 et 28 jours et montrent une augmentation du métabolisme cellulaire en fonction du temps (Figure 28). De plus, le taux d'activité cellulaire mitochondriale est supérieur sur les membranes de PCL par rapport aux lamelles de verres. Cette prolifération cellulaire constante au cours de la culture témoigne de la biocompatibilité des MG-63 cultivées sur les membranes de PCL.

4.2 Analyse de la morphologie cellulaire des HUVEC cultivées sur membrane de PCL

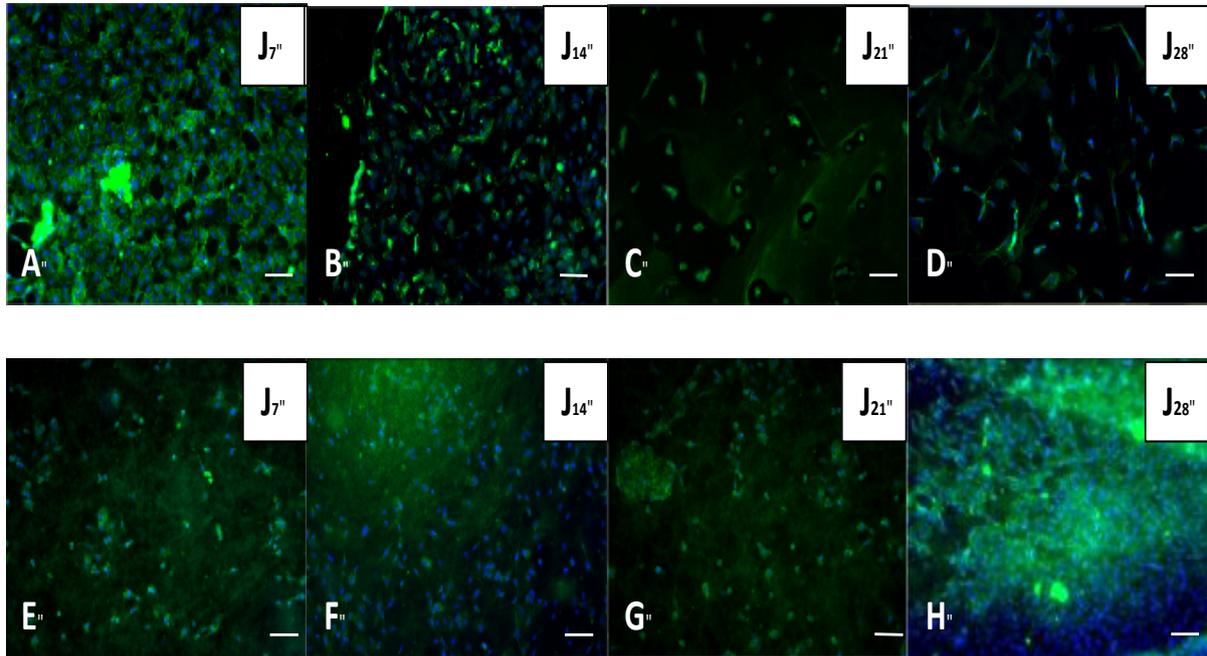
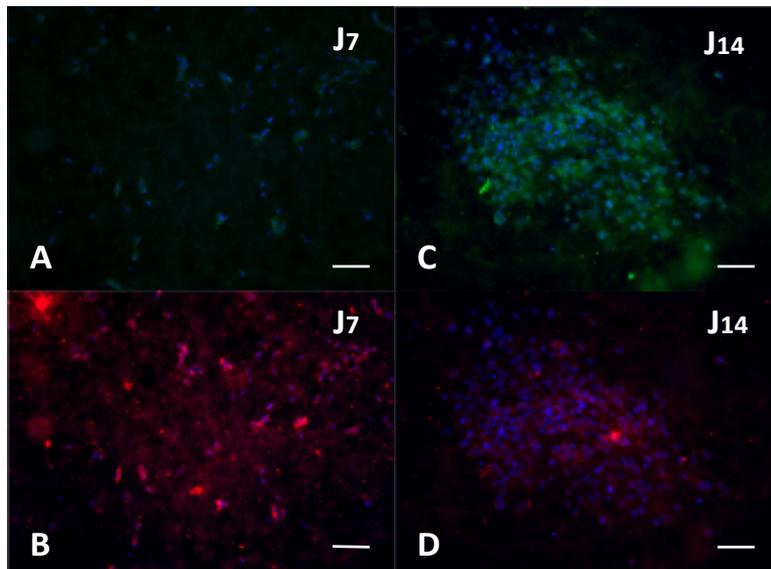


Figure 29 Microphotographies. Morphologie des cellules endothéliales (HUVEC) cultivées sur lamelle de verre et sur membrane de PCL. Les HUVEC ont étéensemencées sur lamelle de verre (A-D), en tant que contrôle positif, et sur membranes nanofibreuses de PCL (E-H). Les cultures ont été fixées à différents temps et les cellules ont été observées grâce à un immunomarquage de CD31 (vert) et un marquage des noyaux au Dapi (Bleu). Echelle = 50µm.

Après observation des cellules HUVECensemencées sur lamelles de verre (Figure 29 A-D) et sur membranes de PCL (Figure 29 E-H), il a été observé que celles-ci sont plus nombreuses 7 et 14 jours aprèsensemencement sur lamelles de verre (Figure 29 A, B) que sur membranes de PCL (Figure 29 E, F). Cependant après 21 jours et 28 jours de culture, une augmentation du nombre de cellules sur les membranes de PCL est observée (Figure 29 G, H). Après 28 jours, un nombre de cellules moins important est observée sur le support de verre (Figure 29 C, D). Enfin, la persistance et la prolifération des cellules cultivées sur les membranes de PCL montrent que cette dernière n'interfère pas dans l'activité des cellules et qu'elle est biocompatible avec les HUVEC et MG-63.

4.3 Organisation cellulaire des co-cultures sur membranes de PCL

Méthode 1



Méthode 2

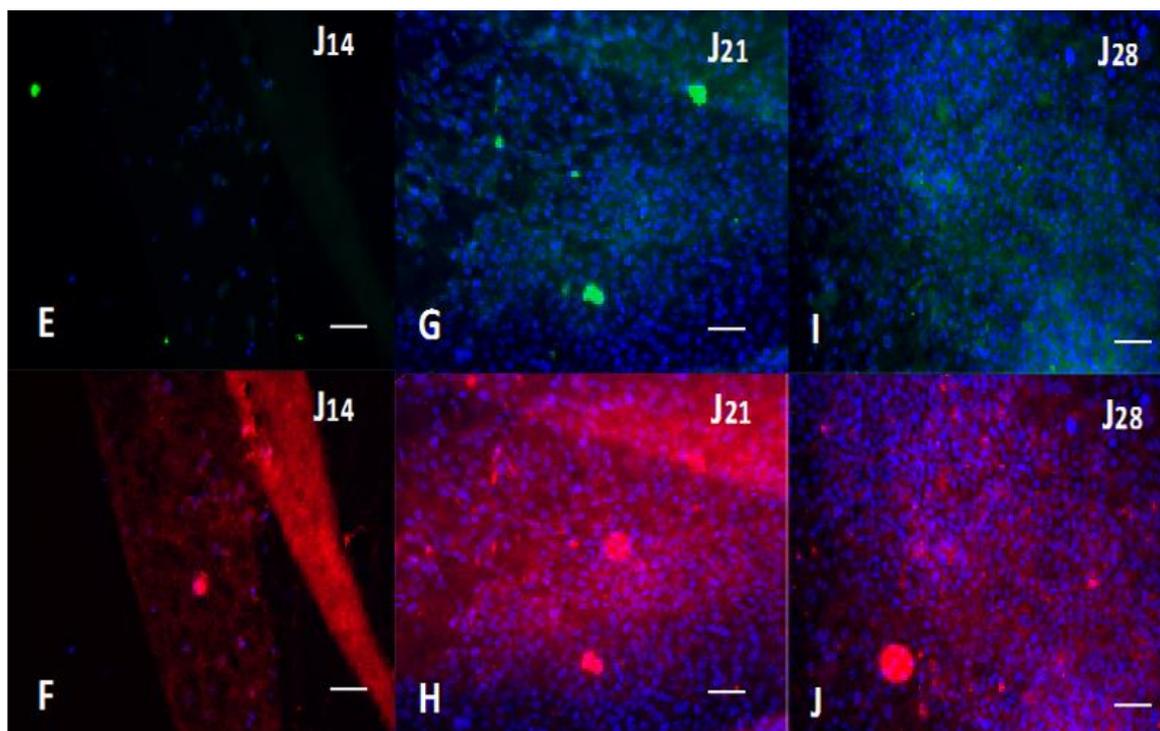


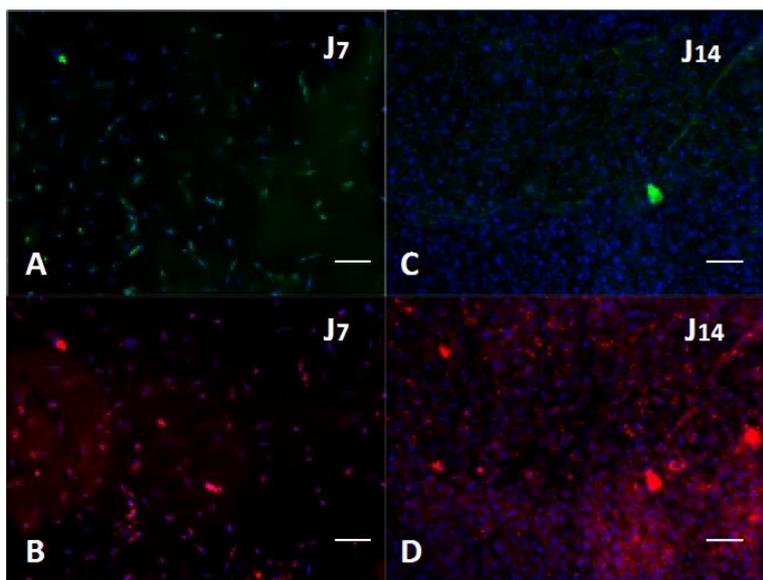
Figure 30 Microphotographies. Observation des co-cultures sur membrane nanofibreuse de PCL selon la méthode 1 (A-D) ou la méthode 2 (E-J). Après différents temps de culture J7 (A, B), J14 (C-F), J21 (G-H), J28 (I, J), les cellules ont été fixées et observées au microscope à épifluorescence. Les MG-63 sont visibles grâce au marquage intramembranaire au PKH26 (rouge) et les HUVEC par un immunomarquage dirigé contre CD31 (vert). Les noyaux sont observés par un marquage au DAPI (Bleu). Echelle = 50 μ m.

Concernant la méthode 1, co-culture selon laquelle les deux types cellulaires sont ensemencés en même temps (Figure 30 A-D), il est à noter une coexistence des cellules tumorales et des

cellules endothéliales. Les cellules sont réparties sur la surface de la membrane nanofibreuse 7 jours après l'ensemencement (Figure 30 A, B). A 14 jours, une prolifération des deux populations cellulaires est observée (Figure 30 C, D). Par ailleurs, les cellules semblent se condenser (Figure 30 C, D). Une interaction entre les deux types cellulaires peut donc se produire. Concernant la méthode 2 (Figure 30 E-J), la dissémination des cellules tumorales parmi les cellules endothéliales cellulaire est également visible 7 jours après leur ensemencement à 14 jours de cultures (Figure 30 E, F). Après 21 et 28 jours de la culture d'HUVEC (Figure 30 G-J), une accentuation de la prolifération cellulaire est observée, les cellules cancéreuses étant prédominantes. De plus, à ces temps avancés de la co-culture, des ilots d'HUVEC se retrouvent entourés de cellules MG-63 (Figure 30 G-J). L'ensemencement différé des cellules tumorales sur la culture de cellules endothéliales supportées par les membranes de PCL n'interfère pas avec leur viabilité.

4.4 Organisation cellulaire des co-cultures sur lamelle de verre

Méthode 1



Méthode 2

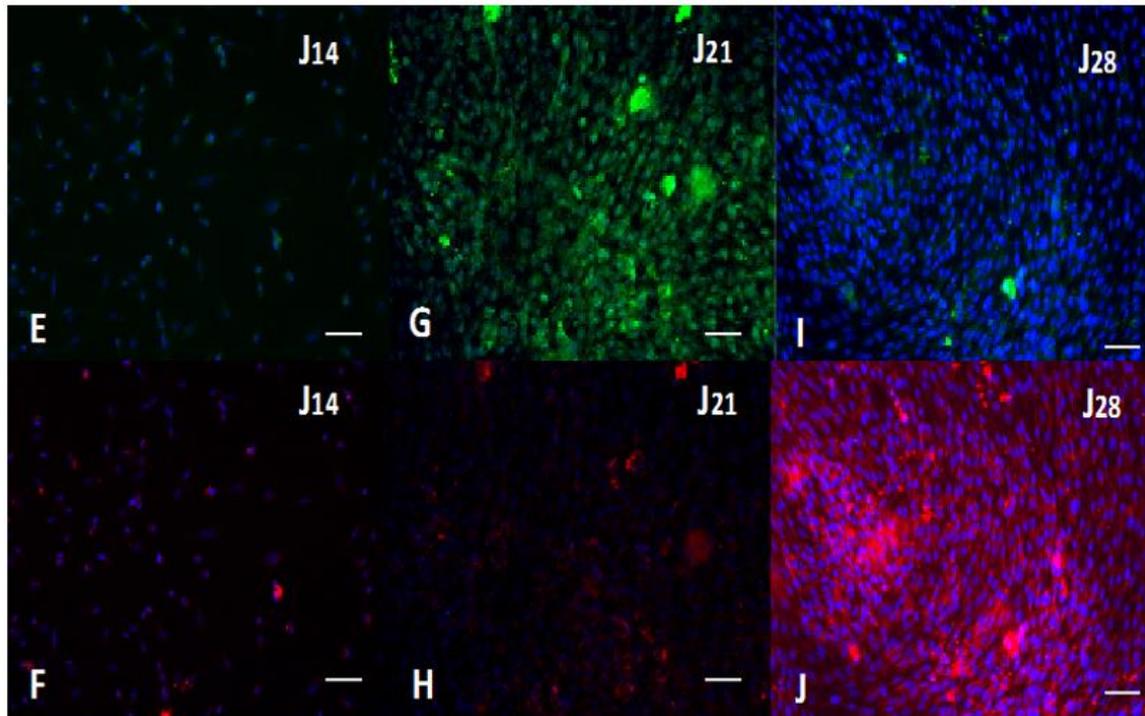


Figure 31 Microphotographies. Observation des co-cultures sur lamelle de verre selon la méthode 1 (A-D) ou la méthode 2 (E-J). Après différents temps de culture J7 (A, B), J14 (C-F), J21 (G-H) et J28 (I, J), les cellules ont été fixées et observées au microscope à épifluorescence. Les MG-63 sont visibles grâce au marquage intramembranaire au PKH26 (rouge) et les HUVEC par un immunomarquage dirigé contre CD31 (vert). Les noyaux sont observés par un marquage au DAPI (Bleu). Echelle = 50µm.

Concernant la méthode 1 (Figure 31 A-D), 7 jours après l'ensemencement, les cellules tumorales et les cellules endothéliales sont dispersées sur la surface de verre (Figure 31 A, B). Après 14 jours, la prolifération cellulaire est accentuée, les cellules endothéliales se regroupent entre elles et formant des amas entourés de cellules tumorales (Figure 31 C, D). Cette organisation particulière fait penser à la formation d'un réseau de cellules HUVEC au sein des cellules de MG-63. Concernant la méthode 2, une dissémination cellulaire est retrouvée après 14 jours (Figure 31 E, F). A 21 et à 28 jours, une importante prolifération cellulaire est observée (Figure 31 G-J) surtout pour les cellules endothéliales avec quelques cellules de MG-63 qui se trouvent parmi cet amoncellement. A 28 jours, les cellules HUVEC présentait un changement de forme, elles se sont allongées avec des prolongements de leurs membranes cytoplasmiques. D'autre part, elles forment un réseau concentrique adoptant une forme en arc de cercle (Figure 31 I, J). Quelques cellules tumorales sont dispersées au sein de cet amas quel que soit le moment d'ensemencement (méthode 1 ou 2). Une réorganisation cellulaire de la co-culture est observée au cours du temps. Cette co-culture sur un support en verre révèle que la contribution de la membrane de polycaprolactone est supérieure pour maintenir la croissance cellulaire et la viabilité des cellules, elle fournit un environnement approprié pour des interactions cellule-cellule et soutient leur adhésion et leur prolifération.

5 Conclusion et perspective

Le but de ce travail était d'initier un modèle de vascularisation *in vitro* de tumeur solide type, ostéosarcome, en combinant une membrane nanofibreuse de polycaprolactone et deux types cellulaires : les cellules endothéliales HUVEC et les cellules d'ostéosarcome humain MG-63. Après l'étude de l'organisation cellulaire de ces co-cultures au sein du biomatériau, sa biocompatibilité a pu être mise en évidence. L'intérêt de cette membrane nanofibreuse est d'être un bon support pour la co-culture de ces deux types cellulaires très différents et de mimer la matrice extracellulaire pour se rapprocher des conditions physiologiques de la tumeur vascularisée. Des interactions entre les deux types cellulaires ont pu être appréciées au vu des populations cellulaires disséminées au départ de la culture et se condensant par la suite. Ces résultats préliminaires de co-cultures supportées par une matrice tridimensionnelle biomimétique permettent d'envisager la constitution d'un modèle de vascularisation *in vitro* des tumeurs solides. En effet, la fonctionnalisation de ces membranes de polycaprolactone devrait permettre de reproduire au mieux l'environnement tumoral, telle l'incorporation de nanoréservoirs de VEGF dans le but de tester les molécules anticancéreux ciblant la vascularisation.

CONCLUSION

Ces dernières années, l'incidence des cancers a augmenté. C'est l'une des principales causes de mortalité notamment chez l'enfant. Plus de 85% des cancers sont des tumeurs solides [Rossleigh, 1990]. Il en existe différents types en fonction des cellules qui les composent. Un diagnostic précoce et une stadification améliorent le pronostic [Rossleigh, 1990]. Des examens radiologiques de qualité sont essentiels. La tomographie améliore la visualisation tridimensionnelle et l'imagerie par résonance magnétique est le meilleur moyen pour évaluer la relation de la tumeur avec les tissus environnants [Ritter, 2010].

Le microenvironnement tumoral est hétérogène et complexe. La tumeur détourne les cellules immunitaires de l'hôte pour produire des signaux proangiogéniques et pro-invasifs. De plus, le nombre de fibroblastes qui synthétisent les facteurs de croissance est augmenté [Trédan, 2007]. L'hypoxie et l'acidose, caractéristiques des tumeurs solides, perturbent le maintien de l'homéostasie. Les molécules proangiogéniques (tel que le facteur de croissance vasculaire endothélial VEGF) y sont généralement surexprimés [Wojton, 2010]. Ce taux élevé de facteurs de croissance stimule à son tour l'activité et les sécrétions cellulaires. Les cellules endothéliales tumorales contribuent par leur prolifération rapide à une angiogenèse intense. Ce mécanisme qui implique la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants est également sous contrôle des facteurs de croissance surexprimés par les cellules tumorales [Chandolu, 2012]. L'environnement tumoral se caractérise donc par des vaisseaux sanguins désorganisés, irréguliers, tortueux et dilatés. Leur perméabilité accrue et l'altération du drainage lymphatique rendent inefficace le drainage des fluides et augmentent la pression au sein de la matrice extracellulaire et du liquide interstitielle. Ainsi, les vaisseaux sont comprimés, le débit sanguin est réduit et la diffusion à partir de la lumière vasculaire est rendue difficile [Goel, 2011]. La perfusion est peu efficace et engendre un appauvrissement en substances nutritives et en oxygène entretenant l'hypoxie [Ahlskog, 2006]. Les cellules tumorales arrivent à survivre et à croître malgré cet environnement hostile. Les cellules souches cancéreuses au sein des tumeurs solides qui ont une capacité d'auto-renouvellement sont cruciales pour leur croissance [Ailles, 2007]. L'hypoxie stimule l'angiogenèse en augmentant la production de VEGF, induit une instabilité génétique et confère aux cellules un potentiel accru pour le développement de métastases. La fragilité des vaisseaux peut également faciliter le passage des cellules cancéreuses dans la circulation [Jain, 2010].

Ce microenvironnement tumoral anormal altère la délivrance uniforme et l'efficacité des agents thérapeutiques notamment circulants. L'hypoxie engendre une résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie [Brown, 1998] et constitue un obstacle considérable des traitements

anticancéreux actuels. Elle est un marqueur de pronostic défavorable [Peng, 2010]. De même, la progression tumorale, la formation de métastases, la résistance à la chimiothérapie, la récurrence et un faible taux de survie sont corrélés à un taux élevé de VEGF au sein de la masse tumorale [PosthumaDeBoer, 2011]. L'acquisition de différentes mutations permettant aux cellules de résister aux effets de médicaments antiangiogéniques est également un facteur important de malignité [Gavhane, 2011]. Les anomalies structurelles des vaisseaux sanguins favorisent l'extravasation du médicament à la périphérie de la tumeur. Ceci réduit sa perfusion au sein de la masse tumorale et donc diminue son efficacité [Trédan, 2007]. Les traitements conventionnels des tumeurs solides sont l'exérèse chirurgicale, la radiothérapie et la chimiothérapie. La chimiothérapie préopératoire permet une réduction de la taille de la tumeur. Quant à la chimiothérapie postopératoire, elle permet de détruire les cellules cancéreuses restantes et de réduire le risque de récurrences. Le défi reste à diminuer les effets secondaires sans compromettre l'efficacité des traitements anticancéreux.

Les nanotechnologies peuvent contribuer à relever ce défi. La nanoingénierie vise à améliorer l'efficacité thérapeutique et le ciblage spécifique par le biais de médicaments véhiculés à l'échelle nanométrique pour une toxicité moindre [Mendoza, 2012]. L'une des stratégies thérapeutiques novatrices développée pour améliorer la délivrance de médicaments consiste à les lier à des nanoparticules et de prolonger ainsi leur demi-vie dans le sang pour un temps de circulation plus élevé [Jain, 2010]. Une stratégie prometteuse consiste à « normaliser » l'environnement matriciel tumoral de sorte que les nanoparticules pénètrent rapidement et plus profondément à l'intérieur de la tumeur [Jain, 2010]. Afin de bloquer la croissance tumorale et la formation de métastases, une approche thérapeutique novatrice consiste à interférer avec l'apport sanguin. L'action de telles thérapeutiques antiangiogéniques d'avenir peut s'effectuer à plusieurs niveaux. L'inhibition de la synthèse des protéines proangiogéniques par les cellules cancéreuses peut être ciblée soit en neutralisant ces protéines proangiogéniques sécrétées ou en inhibant leurs récepteurs. L'induction directe de l'apoptose des cellules endothéliales peut aussi être ciblée [Wu, 2008]. Des travaux récents ont montrés que rétablir l'équilibre entre les facteurs pro et antiangiogéniques permet de modifier le phénotype des vaisseaux tumoraux en plus « matures » ou « normaux » [Goel, 2011]. Cette « normalisation vasculaire » permet une meilleure libération de l'oxygène et des agents médicamenteux vers la tumeur améliorant ainsi l'efficacité des traitements conventionnels [Rosen, 2005]. La combinaison de ces thérapeutiques antiangiogéniques novatrices avec les traitements antitumoraux conventionnels montre un effet synergique [Rosen, 2005].

Parmi les tumeurs solides, les ostéosarcomes, dont l'environnement est très complexe ont fait l'objet de nombreux travaux [Wittig, 2002]. Ce sont des tumeurs malignes primitives les plus fréquentes de l'os. Elles constituent le troisième cancer le plus fréquent chez l'enfant, au niveau des os longs [Ritter, 2010]. Leur étiologie n'a pas été clairement établie. Des altérations génétiques et moléculaires telles que des perturbations des voies de différenciations ostéoblastiques par les BMPs seraient en cause [Tang, 2008]. Les ostéosarcomes ont une forte tendance au développement de métastases, notamment pulmonaires qui présentent une résistance plus importante à la chimiothérapie. Le pronostic des patients atteints d'ostéosarcome dépend du volume, de la localisation de la tumeur et de la présence de métastases. Les symptômes typiques sont une douleur locale, suivie d'un gonflement et d'une limitation des mouvements articulaires localisés. Des techniques d'imageries conventionnelles permettent de détecter les fractures pathologiques et les métastases, d'évaluer l'étendue de la lésion, la réponse de la tumeur à la chimiothérapie préopératoire et de déceler les récives [Wittig, 2002]. La biopsie est une étape clé pour établir le diagnostic et le stade de la maladie afin d'orienter la thérapeutique, de planifier l'approche chirurgicale et d'évaluer le pronostic. La classification TNM est la plus souvent utilisée. Il existe plusieurs types d'ostéosarcomes selon l'aspect histologique, clinique, le site et le degré de différenciation cellulaire [Soares, 2005].

Les ostéosarcomes de la tête et du cou sont mineurs. Parmi eux, les ostéosarcomes des maxillaires représentent environ 5% des ostéosarcomes [Soares, 2005]. En général, les signes et symptômes de ces ostéosarcomes qui concernent les Chirurgiens-Dentistes au premier titre sont discrets, notamment des lésions buccales. Certaines tumeurs très malignes peuvent être asymptomatiques ou avoir des manifestations non spécifiques. Les signes radiologiques sont variables et ne sont pas pathognomoniques [Santos-Silva, 2011]. L'examen anatomopathologique est essentiel pour confirmer le diagnostic. Le développement des médicaments anticancéreux et les progrès des techniques chirurgicales et radiologiques ont facilité le traitement conservateur et la reconstruction maxillaire [Wittig, 2002]. Les agents chimiothérapeutiques les plus souvent employés sont la doxorubicine, le cisplatine, l'ifosfamide et le méthotrexate [Tang, 2008].

Enfin, une étude a été réalisée au laboratoire « NanoMédecine Régénérative Ostéoarticulaire et Dentaire » UMR INSERM 1109 afin d'initier un modèle de vascularisation *in vitro* de tumeur solide de type ostéosarcome, en combinant une membrane nanofibreuse de polycaprolactone et deux types cellulaires : les cellules endothéliales HUVEC et les cellules d'ostéosarcome humain

MG-63. Après l'étude de l'organisation cellulaire de ces co-cultures au sein du biomatériau, sa biocompatibilité a pu être mise en évidence. L'intérêt de cette membrane nanofibreuse est d'être un bon support pour la co-culture de ces deux types cellulaires très différents et de mimer la matrice extracellulaire pour se rapprocher des conditions physiologiques de la tumeur vascularisée. Des interactions entre les deux types cellulaires ont pu être appréciées au vu des populations cellulaires disséminées au départ de la culture et se condensant par la suite. Ces résultats préliminaires de co-cultures supportées par une matrice tridimensionnelle biomimétique permettent d'envisager la constitution d'un modèle de vascularisation *in vitro* des tumeurs solides. En effet, la fonctionnalisation de ces membranes de polycaprolactone devrait permettre de reproduire au mieux l'environnement tumoral, telle l'incorporation de nanoréservoirs de VEGF. Un tel modèle de tumeur solide *in vitro* permettrait de tester l'efficacité et d'optimiser le ciblage de différents principes actifs innovants.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahlskog J, Paganelli G, Neri D. Vascular tumor targeting. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2006 ; 50 (4) : 296-309
- Ailles LE, Weissman IL. Cancer stem cells in solid tumors. *Curr Opin Biotechnol*. 2007 ; 18 (5) : 460-6
- Bielack S, Carrle D, Casali PG; ESMO Guidelines Working Group. Osteosarcoma : ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2009 ; 20 (4) : 137-9
- Brown JM, Giaccia AJ. The unique physiology of solid tumors : opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res*. 1998 ; 58 (7) : 1408-16
- Bussolati B, Grange C, Camussi G. Tumor exploits alternative strategies to achieve vascularization. *FASEB J*. 2011 ; 25 (9) : 2874-82
- Carrle D, Bielack SS. Current strategies of chemotherapy in osteosarcoma. *Int Orthop*. 2006 ; 30 (6) : 445-51
- Chandolu V, Dass CR. Cell and molecular biology underpinning the effects of PEDF on cancers in general and osteosarcoma in particular. *J Biomed Biotechnol*. 2012 ; 1-9
- Cherie Challine L, Menegoz F. Le cancer en France en 1995 et son évolution durant les deux dernières décennies. *Revue Française des affaires sociales n°2*. 1999 ; 9-24
- DuBois S, Demetri G. Markers of angiogenesis and clinical features in patients with sarcoma. *Cancer*. 2007 ; 109 (5) : 813-9
- Elias S, Banin E. Multi-species biofilms : living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev*. 2012 ; 36 (5) : 990-1004
- Ferrand A, Eap S, Richert L, Lemoine S, Kalaskar D, Demoustier-Champagne S, Atmani H, Mély Y, Fioretti F, Schlatter G, Kuhn L, Ladam G, Benkirane-Jessel N. Osteogenetic properties of electrospun nanofibrous PCL scaffolds equipped with chitosan-based nanoreservoirs of growth factors. *Macromol Biosci*. 2014 ; 14 (1) : 45-55
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008 : GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 ; 127 (12) : 2893-917
- Gavhane YN, Shete AS, Bhagat AK, Shinde VR, Bhong KK, Khairmar GA, Yadav AV. Solid Tumors : Facts, Challenges and Solutions. *Int J Pharm Sci Res*. 2011 ; 2 (1) : 1-12

- Goel S, Duda DG, Xu L, Munn LL, Boucher Y, Fukumura D, Jain RK. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev.* 2011 ; 91 (3) : 1071-121
- Goupillon-Senghor C, Giustranti C. La médecine personnalisée espoir de la lutte contre le cancer. Note de presse, Institut Curie. 2012
- Guo W, Gorlick R, Ladanyi M, Meyers PA, Huvos AG, Bertino JR, Healey JH. Expression of bone morphogenetic proteins and receptors in sarcomas. *Clin Orthop Relat Res.* 1999 ; (365) : 175-83
- Herino Roland, Fayl Romaric. Combattre le cancer à l'aide des nanotechnologies : l'effort américain. *Science physique Etats-Unis.* 2007 ; 1-17
- Jain RK, Stylianopoulos T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010 ; 7 (11) : 653-64
- Jayson GC, Howell A. Carcinomatous meningitis in solid tumours. *Ann Oncol.* 1996 ; 7 (8) : 773-86
- Joo Group. Formation of nanofibers via electrospinning. Cornell university school of chemical and biomolecular engineering. 2011
- Kaji H, Camci-Unal G, Langer R, Khademhosseini A. Engineering systems for the generation of patterned co-cultures for controlling cell-cell interactions. *Biochim Biophys Acta.* 2011 ; 1810 (3) : 239-50
- Ma J, Both SK, Yang F, Cui FZ, Pan J, Meijer GJ, Jansen JA, van den Beucken JJ. Concise review : cell-based strategies in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Stem Cells Transl Med.* 2014 ; 3 (1) : 98-107
- Ma J, van den Beucken JJ, Yang F, Both SK, Cui FZ, Pan J, Jansen JA. Coculture of osteoblasts and endothelial cells : optimization of culture medium and cell ratio. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011 ; 17 (3) : 349-57
- Matsuda Y, Hagio M, Ishiwata T. Nestin : a novel angiogenesis marker and possible target for tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol.* 2013 ; 19 (1) : 42-8
- Mendenhall WM, Fernandes R, Werning JW, Vaysberg M, Malyapa RS, Mendenhall NP. Head and neck osteosarcoma. *Am J Otolaryngol.* 2011 ; 32 (6) : 597-600
- Mendoza-Palomares C, Ferrand A, Facca S, Fioretti F, Ladam G, Kuchler-Bopp S, Regnier T, Mainard D, Benkirane-Jessel N. Smart Hybrid Materials Equipped by Nanoreservoirs of Therapeutics. *ACS Nano.* 2012 ; 6 (1) : 483-90
- Misra A, Misra S, Chaturvedi A, Srivastava PK. Osteosarcoma with metastasis to orbit. *Br J Ophthalmol.* 2001 ; 85 (11) : 1387-8

- Murakami H, Kurata T, Onozawa Y, Watanabe J, Ono A, Takahashi T, Yamamoto N, Fujisaka Y, Kiyota H, Hayashi H, Tanaka K, Nakagawa K, Kuroda S. An open-label, dose-escalation, safety, and pharmacokinetics phase I study of ombrabulin, a vascular disrupting agent, administered as a 30-min intravenous infusion every 3 weeks in Japanese patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014; 73 : 623-30
- O'Donnell A, Padhani A, Hayes C, Kakkar AJ, Leach M, Trigo JM, Scurr M, Raynaud F, Phillips S, Aherne W, Hardcastle A, Workman P, Hannah A, Judson I. A Phase I study of the angiogenesis inhibitor SU5416 (semaxanib) in solid tumours, incorporating dynamic contrast MR pharmacodynamic end points. *Brit J Cancer.* 2005; 93 : 876-83
- Peng F, Chen M. Antiangiogenic therapy : a novel approach to overcome tumor hypoxia. *Chin J Cancer.* 2010 ; 29 (8) : 715-20
- PosthumaDeBoer J, Witlox MA, Kaspers GJ, van Royen BJ. Molecular alterations as target for therapy in metastatic osteosarcoma : a review of literature. *Clin Exp Metastasis.* 2011 ; 28 (5) : 493-503
- Rao RR, Stegemann JP. Cell-based approaches to the engineering of vascularized bone tissue. *Cytotherapy.* 2013 ; 15 (11) : 1309-22
- Ritter J, Bielack SS. Osteosarcoma. *Ann Oncol.* 2010 ; 21 (7) : 320-5
- Rosen LS. VEGF-targeted therapy : therapeutic potential and recent advances. *Oncologist.* 2005 ; 10 (6) : 382-91
- Rossleigh MA, Murray IP, Mackey DW, Bargwanna KA, Nayanar VV. Pediatric solid tumors : evaluation by gallium-67 SPECT studies. *J Nucl Med.* 1990 ; 31 (2) : 168-72
- Rouwkema J, de Boer J, Van Blitterswijk CA. Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct. *Tissue Eng.* 2006 ; 12 (9) : 2685-93
- Sanaat Z, Mohammady G, Esmaili H, Emrani M, Dolatkhah R. Osteosarcoma of the larynx. *Arch Iran Med.* 2009 ; 12 (5) : 499-502
- Santos MI, Unger RE, Sousa RA, Reis RL, Kirkpatrick CJ. Crosstalk between osteoblasts and endothelial cells co-cultured on a polycaprolactone-starch scaffold and the *in vitro* development of vascularization. *Biomaterials.* 2009 ; 30 (26) : 4407-15
- Santos-Silva AR, Ribeiro AC, Furuse CF, Simonato LE, Mattar NJ, Soubhia AM, Miyahara GI. Maxillary osteosarcoma in a young patient undergoing postorthodontic

treatment follow-up : the importance of ongoing oral examinations. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011 ; 139 (6) : 845-8

- Soares RC, Soares AF, Souza LB, Santos AL, Pinto LP. Osteosarcoma of mandible initially resembling lesion of dental periapex : a case report. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2005 ; 71 (2) : 242-5
- Tang N, Song WX, Luo J, Haydon RC, He TC. Osteosarcoma development and stem cell differentiation. *Clin Orthop Relat Res.* 2008 ; 466 (9) : 2114-30
- Tosetti F, Ferrari N, De Flora S, Albini A. Angioprevention : angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents. *FASEB J.* 2002 ; 16 (1) : 2-14
- Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst.* 2007 ; 99 (19) : 1441-54
- Wang PC, Takezawa T. Reconstruction of renal glomerular tissue using collagen vitrigel scaffold. *J Biosci Bioeng.* 2005 ; 99 (6) : 529-40
- Welte Y, Adjaye J, Lehrach HR, Regenbrecht CR. Cancer stem cells in solid tumors : elusive or illusive? *Cell Commun Signal.* 2010 ; 8 (1) : 1-10
- Wittig JC, Bickels J, Priebat D, Jelinek J, Kellar-Graney K, Shmookler B, Malawer MM. Osteosarcoma : a multidisciplinary approach to diagnosis and treatment. *Am Fam Physician.* 2002 ; 65 (6) : 1123-32
- Wojton J, Kaur B. Impact of tumor microenvironment on oncolytic viral therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010 ; 21 (2-3) : 127-34
- Wu HC, Huang CT, and Chang DK. Anti-Angiogenic Therapeutic Drugs for Treatment of Human Cancer. *J cancer molecules.* 2008 ; 4 (2) : 37-45
- Xu K, Buchsbaum RJ. Isolation of mammary epithelial cells from three-dimensional mixed-cell spheroid co-culture. *J Vis Exp.* 2012 ; (62) : 1-5
- Yabroff KR, Lund J, Kepka D, Mariotto A. Economic Burden of Cancer in the US : Estimates, Projections, and Future Research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011 ; 20 (10) : 2006-14
- Zhang Y, Andrukhov O, Berner S, Matejka M, Wieland M, Rausch-Fan X, Schedle A. Osteogenic properties of hydrophilic and hydrophobic titanium surfaces evaluated with osteoblast-like cells (MG-63) in coculture with human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). *Dent Mater.* 2010 ; 26 (11) : 1043-51

