

**LES ANTICANCEREUX NOUVELLES
APPROCHES THERAPEUTIQUES**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le:.....

PAR

Mr. BENZAOUZ Abdelhamid

Né le 30/10/1988 à Rabat

Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie

MOTS CLES: Anticancéreux, sénescence, molécules pro-apoptotiques, virus oncolytique, thérapie génique, thérapies ciblées.

MEMBRES DU JURY

Pr. S. HAMZAOUI

Professeur de Microbiologie

Pr. S.TELLAL

Professeur de Biochimie

Pr. A. LAATIRIS

Professeur de Pharmacie Galénique

Pr. M. ICHOU

Professeur d'Oncologie médicale

Pr. N. MESSAOUDI

Professeur d'Hématologie biologique

PRESIDENT

RAPPORTEUR

JUGES

سُبْحَانَكَ

لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا بِمَا عَلَّمْتَنَا

إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ

(البقرة: من الآية 32)



UNIVERSITE MOHAMMED V- SOUISSI
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT

DOYENS HONORAIRES :

1962 – 1969 : Professeur Abdelmalek FARAJ
 1969 – 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH
 1974 – 1981 : Professeur Bachir LAZRAK
 1981 – 1989 : Professeur Taieb CHKILI
 1989 – 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
 1997 – 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI
 2003 – 2013 : Professeur Najia HAJJAJ – HASSOUNI

2

ADMINISTRATION :

Doyen : Professeur Mohamed ADNAOUI
 Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et estudiantines
 Professeur Mohammed AHALLAT
 Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération
 Professeur Jamal TAOUFIK
 Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie
 Professeur Jamal TAOUFIK
 Secrétaire Général : Mr. El Hassane AHALLAT

PROFESSEURS :

Mai et Octobre 1981

Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih	Chirurgie Cardio-Vasculaire
Pr. TAOBANE Hamid*	Chirurgie Thoracique

Mai et Novembre 1982

Pr. ABROUQ Ali*	Oto-Rhino-Laryngologie
Pr. BENSOUA Mohamed	Anatomie
Pr. BENOSMAN Abdellatif	Chirurgie Thoracique
Pr. LAHBABI Naïma	Physiologie

Novembre 1983

Pr. BELLAKHDAR Fouad	Neurochirurgie
----------------------	----------------

Pr. HAJJAJ Najia ép. HASSOUNI

Rhumatologie

Décembre 1984

Pr. EL GUEDDARI Brahim El Khalil

Pr. MAAOUNI Abdelaziz

Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi

Pr. SETTAF Abdellatif

Radiothérapie

Médecine Interne

Anesthésie -Réanimation

Chirurgie

Novembre et Décembre 1985

Pr. BENJELLOUN Halima

Pr. BENSALD Younes

Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa

Pr. IRAQI Ghali

Cardiologie

Pathologie Chirurgicale

Neurologie

Pneumo-phtisiologie

Janvier, Février et Décembre 1987

Pr. AJANA Ali

Pr. CHAHED OUAZZANI Houria

Pr. EL YAACOUBI Moradh

Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah

Pr. LACHKAR Hassan

Pr. YAHYAOUI Mohamed

Radiologie

Gastro-Entérologie

Traumatologie Orthopédie

Gastro-Entérologie

Médecine Interne

Neurologie

Décembre 1988

Pr. BENHAMAMOUCHE Mohamed Najib

Pr. DAFIRI Rachida

Pr. HERMAS Mohamed

Pr. TOLOUNE Farida*

Chirurgie Pédiatrique

Radiologie

Traumatologie Orthopédie

Médecine Interne

Décembre 1989 Janvier et Novembre 1990

Pr. ADNAOUI Mohamed

Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali*

Pr. CHAD Bouziane

Pr. CHKOFF Rachid

Pr. HACHIM Mohammed*

Pr. KHARBACH Aïcha

Pr. MANSOURI Fatima

Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda

Pr. TAZI Saoud Anas

Médecine Interne

Cardiologie

Pathologie Chirurgicale

Pathologie Chirurgicale

Médecine-Interne

Gynécologie -Obstétrique

Anatomie-Pathologique

Neurologie

Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AL HAMANY Zaïtounia
Pr. AZZOUZI Abderrahim
Pr. BAYAHIA Rabéa
Pr. BELKOUCHI Abdelkader
Pr. BENABDELLAH Chahrazad
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif
Pr. BENSOUDA Yahia
Pr. BERRAHO Amina
Pr. BEZZAD Rachid
Pr. CHABRAOUI Layachi
Pr. CHERRAH Yahia
Pr. CHOKAIRI Omar
Pr. JANATI Idrissi Mohamed*
Pr. KHATTAB Mohamed
Pr. SOULAYMANI Rachida
Pr. TAOUFIK Jamal

Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation
Néphrologie
Chirurgie Générale
Hématologie
Chirurgie Générale
Pharmacie galénique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Biochimie et Chimie
Pharmacologie
Histologie Embryologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Pharmacologie
Chimie thérapeutique

Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed
Pr. BENSOUDA Adil
Pr. BOUJIDA Mohamed Najib
Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza
Pr. CHRAIBI Chafiq
Pr. DAOUDI Rajae
Pr. DEHAYNI Mohamed*
Pr. EL OUAHABI Abdessamad
Pr. FELLAT Rokaya
Pr. GHAFIR Driss*
Pr. JIDDANE Mohamed
Pr. OUAZZANI TAIBI Med Charaf Eddine
Pr. TAGHY Ahmed
Pr. ZOUHDI Mimoun

Chirurgie Générale
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Gastro-Entérologie
Gynécologie Obstétrique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Neurochirurgie
Cardiologie
Médecine Interne
Anatomie
Gynécologie Obstétrique
Chirurgie Générale
Microbiologie

Mars 1994

Pr. AGNAOU Lahcen
Pr. BENCHERIFA Fatiha

Ophtalmologie
Ophtalmologie

Pr. BENJAAFAR Nouredine
Pr. BEN RAIS Nozha
Pr. CAOUI Malika
Pr. CHRAIBI Abdelmjid
Métaboliques
Pr. EL AMRANI Sabah
Pr. EL AOUAD Rajae
Pr. EL BARDOUNI Ahmed
Pr. EL HASSANI My Rachid
Pr. EL IDRISSE Lamghari Abdennaceur
Pr. ERROUGANI Abdelkader
Pr. ESSAKALI Malika
Pr. ETTAYEBI Fouad
Pr. HADRI Larbi*
Pr. HASSAM Badredine
Pr. IFRINE Lahssan
Pr. JELTHI Ahmed
Pr. MAHFOUD Mustapha
Pr. MOUDENE Ahmed*
Pr. RHRAB Brahim
Pr. SENOUCI Karima

Mars 1994

Pr. ABBAR Mohamed*
Pr. ABDELHAK M'barek
Pr. BELAIDI Halima
Pr. BRAHMI Rida Slimane
Pr. BENTAHILA Abdelali
Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
Pr. BERRADA Mohamed Saleh
Pr. CHAMI Ilham
Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae
Pr. EL ABBADI Najia
Pr. HANINE Ahmed*
Pr. JALIL Abdelouahed
Pr. LAKHDAR Amina

Radiothérapie
Biophysique
Biophysique
Endocrinologie et Maladies

Gynécologie Obstétrique
Immunologie
Traumato-Orthopédie
Radiologie
Médecine Interne
Chirurgie Générale
Immunologie
Chirurgie Pédiatrique
Médecine Interne
Dermatologie
Chirurgie Générale
Anatomie Pathologique
Traumatologie – Orthopédie
Traumatologie- Orthopédie
Gynécologie –Obstétrique
Dermatologie

Urologie
Chirurgie – Pédiatrique
Neurologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie
Gynécologie – Obstétrique
Traumatologie – Orthopédie
Radiologie
Ophtalmologie
Neurochirurgie
Radiologie
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique

Pr. MOUANE Nezha

Pédiatrie

Mars 1995

Pr. ABOUQUAL Redouane

Pr. AMRAOUI Mohamed

Pr. BAIDADA Abdelaziz

Pr. BARGACH Samir

Pr. BEDDOUCHE Amoqrane*

Pr. CHAARI Jilali*

Pr. DIMOU M'barek*

Pr. DRISSI KAMILI Med Nordine*

Pr. EL MESNAOUI Abbas

Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila

Pr. FERHATI Driss

Pr. HASSOUNI Fadil

Hygiène

Pr. HDA Abdelhamid*

Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed

Pr. IBRAHIMY Wafaa

Pr. MANSOURI Aziz

Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia

Pr. SEFIANI Abdelaziz

Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Réanimation Médicale

Chirurgie Générale

Gynécologie Obstétrique

Gynécologie Obstétrique

Urologie

Médecine Interne

Anesthésie Réanimation

Anesthésie Réanimation

Chirurgie Générale

Oto-Rhino-Laryngologie

Gynécologie Obstétrique

Médecine Préventive, Santé Publique et

Cardiologie

Urologie

Ophtalmologie

Radiothérapie

Ophtalmologie

Génétique

Réanimation Médicale

Décembre 1996

Pr. AMIL Touriya*

Pr. BELKACEM Rachid

Pr. BOULANOUAR Abdelkrim

Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan

Pr. GAOUZI Ahmed

Pr. MAHFOUDI M'barek*

Pr. MOHAMMADINE EL Hamid

Pr. MOHAMMADI Mohamed

Pr. MOULINE Soumaya

Pr. OUADGHIRI Mohamed

Pr. OUZEDDOUN Naima

Pr. ZBIR EL Mehdi*

Radiologie

Chirurgie Pédiatrie

Ophtalmologie

Chirurgie Générale

Pédiatrie

Radiologie

Chirurgie Générale

Médecine Interne

Pneumo-phtisiologie

Traumatologie-Orthopédie

Néphrologie

Cardiologie

Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan
Pr. BEN AMAR Abdesselem
Pr. BEN SLIMANE Lounis
Pr. BIROUK Nazha
Pr. CHAOUIR Souad*
Pr. DERRAZ Said
Pr. ERREIMI Naima
Pr. FELLAT Nadia
Pr. GUEDDARI Fatima Zohra
Pr. HAIMEUR Charki*
Pr. KADDOURI Noureddine
Pr. KOUTANI Abdellatif
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
Pr. NAZI M'barek*
Pr. OUAHABI Hamid*
Pr. TAOUFIQ Jallal
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Gynécologie-Obstétrique
Chirurgie Générale
Urologie
Neurologie
Radiologie
Neurochirurgie
Pédiatrie
Cardiologie
Radiologie
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Pédiatrique
Urologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Cardiologie
Neurologie
Psychiatrie
Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

Pr. AFIFI RAJAA
Pr. BENOMAR ALI
Pr. BOUGTAB Abdesslam
Pr. ER RIHANI Hassan
Pr. EZZAITOUNI Fatima
Pr. LAZRAK Khalid *
Pr. BENKIRANE Majid*
Pr. KHATOURI ALI*
Pr. LABRAIMI Ahmed*

Gastro-Entérologie
Neurologie
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Néphrologie
Traumatologie Orthopédie
Hématologie
Cardiologie
Anatomie Pathologique

Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed*
Pr. AIT OUMAR Hassan
Pr. BENCHERIF My Zahid
Pr. BENJELLOUN Dakhama Badr.Sououd
Pr. BOURKADI Jamal-Eddine

Pneumophtisiologie
Pédiatrie
Ophtalmologie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie

Pr. CHAOUI Zineb
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer
Pr. ECHARRAB El Mahjoub
Pr. EL FTOUH Mustapha
Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
Pr. EL OTMANY Azzedine
Pr. HAMMANI Lahcen
Pr. ISMAILI Mohamed Hatim
Pr. ISMAILI Hassane*
Pr. KRAMI Hayat Ennoufouss
Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*
Pr. TACHINANTE Rajae
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Ophthalmologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
Chirurgie Générale
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Traumatologie Orthopédie
Gastro-Entérologie
Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne

Novembre 2000

Pr. AIDI Saadia
Pr. AIT OURHROUI Mohamed
Pr. AJANA Fatima Zohra
Pr. BENAMR Said
Pr. BENCHEKROUN Nabiha
Pr. CHERTI Mohammed
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma
Pr. EL HASSANI Amine
Pr. EL IDGHIRI Hassan
Pr. EL KHADER Khalid
Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*
Pr. GHARBI Mohamed El Hassan

Pr. HSSAIDA Rachid*
Pr. LAHLOU Abdou
Pr. MAFTAH Mohamed*
Pr. MAHASSINI Najat
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
Pr. NASSIH Mohamed*
Maxillo-Faciale
Pr. ROUIMI Abdelhadi

Neurologie
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Ophthalmologie
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie
Oto-Rhino-Laryngologie
Urologie
Rhumatologie
Endocrinologie et Maladies
Métaboliques
Anesthésie-Réanimation
Traumatologie Orthopédie
Neurochirurgie
Anatomie Pathologique
Pédiatrie
Stomatologie Et Chirurgie

Neurologie

Décembre 2001

Pr. ABABOU Adil	Anesthésie-Réanimation
Pr. BALKHI Hicham*	Anesthésie-Réanimation
Pr. BELMEKKI Mohammed	Ophthalmologie
Pr. BENABDELJLIL Maria	Neurologie
Pr. BENAMAR Loubna	Néphrologie
Pr. BENAMOR Jouda	Pneumo-phtisiologie
Pr. BENELBARHDADI Imane	Gastro-Entérologie
Pr. BENNANI Rajae	Cardiologie
Pr. BENOUACHANE Thami	Pédiatrie
Pr. BENYOUSSEF Khalil	Dermatologie
Pr. BERRADA Rachid	Gynécologie Obstétrique
Pr. BEZZA Ahmed*	Rhumatologie
Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi	Anatomie
Pr. BOUHOUCHE Rachida	Cardiologie
Pr. BOUMDIN El Hassane*	Radiologie
Pr. CHAT Latifa	Radiologie
Pr. CHELLAOUI Mounia	Radiologie
Pr. DAALI Mustapha*	Chirurgie Générale
Pr. DRISSE Sidi Mourad*	Radiologie
Pr. EL HIJRI Ahmed	Anesthésie-Réanimation
Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid	Neuro-Chirurgie
Pr. EL MADHI Tarik	Chirurgie-Pédiatrique
Pr. EL MOUSSAIF Hamid	Ophthalmologie
Pr. EL OUNANI Mohamed	Chirurgie Générale
Pr. ETTAIR Said	Pédiatrie
Pr. GAZZAZ Miloudi*	Neuro-Chirurgie
Pr. GOURINDA Hassan	Chirurgie-Pédiatrique
Pr. HRORA Abdelmalek	Chirurgie Générale
Pr. KABBAJ Saad	Anesthésie-Réanimation
Pr. KABIRI EL Hassane*	Chirurgie Thoracique
Pr. LAMRANI Moulay Omar	Traumatologie Orthopédie
Pr. LEKEHAL Brahim	Chirurgie Vasculaire Périphérique
Pr. MAHASSIN Fattouma*	Médecine Interne
Pr. MEDARHRI Jalil	Chirurgie Générale
Pr. MIKDAME Mohammed*	Hématologie Clinique
Pr. MOHSINE Raouf	Chirurgie Générale
Pr. NOUINI Yassine	Urologie

Pr. SABBAH Farid
Pr. SEFIANI Yasser
Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

Chirurgie Générale
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Pédiatrie

Décembre 2002

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
Pr. AMEUR Ahmed *
Pr. AMRI Rachida
Pr. AOURARH Aziz*
Pr. BAMOU Youssef *
Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
Métaboliques
Pr. BENZEKRI Laila
Pr. BENZZOUBEIR Nadia*
Pr. BERNOUSSI Zakiya
Pr. BICHA Mohamed Zakariya
Pr. CHOHO Abdelkrim *
Pr. CHKIRATE Bouchra
Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair
Pr. EL BARNOUSSI Leila
Pr. EL HAOURI Mohamed *
Pr. EL MANSARI Omar*
Pr. ES-SADEL Abdelhamid
Pr. FILALI ADIB Abdelhai
Pr. HADDOUR Leila
Pr. HAJJI Zakia
Pr. IKEN Ali
Pr. ISMAEL Farid
Pr. JAAFAR Abdeloihab*
Pr. KRIOUILE Yamina
Pr. LAGHMARI Mina
Pr. MABROUK Hfid*
Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid*
Pr. NAITLHO Abdelhamid*
Pr. OUJILAL Abdelilah
Pr. RACHID Khalid *
Pr. RAISS Mohamed

Anatomie Pathologique
Urologie
Cardiologie
Gastro-Entérologie
Biochimie-Chimie
Endocrinologie et Maladies

Dermatologie
Gastro-Entérologie
Anatomie Pathologique
Psychiatrie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Chirurgie Pédiatrique
Gynécologie Obstétrique
Dermatologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie
Ophtalmologie
Urologie
Traumatologie Orthopédie
Traumatologie Orthopédie
Pédiatrie
Ophtalmologie
Traumatologie Orthopédie
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie
Médecine Interne
Oto-Rhino-Laryngologie
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Générale

Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*
Pr. RHOU Hakima
Pr. SIAH Samir *
Pr. THIMOU Amal
Pr. ZENTAR Aziz*

Pneumophtisiologie
Néphrologie
Anesthésie Réanimation
Pédiatrie
Chirurgie Générale

Janvier 2004

Pr. ABDELLAH El Hassan
Pr. AMRANI Mariam
Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
Pr. BENKIRANE Ahmed*
Pr. BOUGHALEM Mohamed*
Pr. BOULAADAS Malik
faciale
Pr. BOURAZZA Ahmed*
Pr. CHAGAR Belkacem*
Pr. CHERRADI Nadia
Pr. EL FENNI Jamal*
Pr. EL HANCHI ZAKI
Pr. EL KHORASSANI Mohamed
Pr. EL YOUNASSI Badreddine*
Pr. HACHI Hafid
Pr. JABOUIRIK Fatima
Pr. KARMANE Abdelouahed
Pr. KHABOUZE Samira
Pr. KHARMAZ Mohamed
Pr. LEZREK Mohammed*
Pr. MOUGHIL Said
Pr. SASSENOU ISMAIL*
Pr. TARIB Abdelilah*
Pr. TIJAMI Fouad
Pr. ZARZUR Jamila

Ophthalmologie
Anatomie Pathologique
Oto-Rhino-Laryngologie
Gastro-Entérologie
Anesthésie Réanimation
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-

faciale
Neurologie
Traumatologie Orthopédie
Anatomie Pathologique
Radiologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie
Cardiologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Ophthalmologie
Gynécologie Obstétrique
Traumatologie Orthopédie
Urologie
Chirurgie Cardio-Vasculaire
Gastro-Entérologie
Pharmacie Clinique
Chirurgie Générale
Cardiologie

Janvier 2005

Pr. ABBASSI Abdellah
Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
Pr. ALAOUI Ahmed Essaid
Pr. ALLALI Fadoua

Chirurgie Réparatrice et Plastique
Chirurgie Générale
Microbiologie
Rhumatologie

Pr. AMAZOUZI Abdellah	Ophtalmologie
Pr. AZIZ Noureddine*	Radiologie
Pr. BAHIRI Rachid	Rhumatologie
Pr. BARKAT Amina	Pédiatrie
Pr. BENHALIMA Hanane Faciale	Stomatologie et Chirurgie Maxillo
Pr. BENHARBIT Mohamed	Ophtalmologie
Pr. BENYASS Aatif	Cardiologie
Pr. BERNOUSSI Abdelghani	Ophtalmologie
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed	Ophtalmologie
Pr. DOUDOUH Abderrahim*	Biophysique
Pr. EL HAMZAOUI Sakina	Microbiologie
Pr. HAJJI Leila	Cardiologie
Pr. HESSISSEN Leila	Pédiatrie
Pr. JIDAL Mohamed*	Radiologie
Pr. KARIM Abdelouahed	Ophtalmologie
Pr. KENDOOUSSI Mohamed*	Cardiologie
Pr. LAAROUSSI Mohamed	Chirurgie Cardio-vasculaire
Pr. LYAGOUBI Mohammed	Parasitologie
Pr. NIAMANE Radouane*	Rhumatologie
Pr. RAGALA Abdelhak	Gynécologie Obstétrique
Pr. SBIHI Souad	Histo-Embryologie Cytogénétique
Pr. TNACHERI OUAZZANI Btissam	Ophtalmologie
Pr. ZERAIDI Najia	Gynécologie Obstétrique

Décembre 2005

Pr. CHANI Mohamed	Anesthésie Réanimation
-------------------	------------------------

Avril 2006

Pr. ACHEMLAL Lahsen*	Rhumatologie
Pr. AKJOUJ Said*	Radiologie
Pr. BELMEKKI Abdelkader*	Hématologie
Pr. BENCHEIKH Razika	O.R.L
Pr. BIYI Abdelhamid*	Biophysique
Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine	Chirurgie - Pédiatrique
Pr. BOULAHYA Abdellatif*	Chirurgie Cardio – Vasculaire
Pr. CHENGUETI ANSARI Anas	Gynécologie Obstétrique

Pr. DOGHMI Nawal
Pr. ESSAMRI Wafaa
Pr. FELLAT Ibtissam
Pr. FAROUDY Mamoun
Pr. GHADOUANE Mohammed*
Pr. HARMOUCHE Hicham
Pr. HANAFI Sidi Mohamed*
Pr. IDRIS LAHLOU Amine
Pr. JROUNDI Laila
Pr. KARMOUNI Tariq
Pr. KILI Amina
Pr. KISRA Hassan
Pr. KISRA Mounir
Pr. LAATIRIS Abdelkader*
Pr. LMIMOUNI Badreddine*
Pr. MANSOURI Hamid*
Pr. OUANASS Abderrazzak
Pr. SAFI Soumaya*
Pr. SEKKAT Fatima Zahra
Pr. SOUALHI Mouna
Pr. TELLAL Saida*
Pr. ZAHRAOUI Rachida

Cardiologie
Gastro-entérologie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Urologie
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Microbiologie
Radiologie
Urologie
Pédiatrie
Psychiatrie
Chirurgie – Pédiatrique
Pharmacie Galénique
Parasitologie
Radiothérapie
Psychiatrie
Endocrinologie
Psychiatrie
Pneumo – Phtisiologie
Biochimie
Pneumo – Phtisiologie

Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid
Pr. ACHACHI Leila
Pr. ACHOUR Abdessamad*
Pr. AIT HOUSSA Mahdi*
Pr. AMHAJJI Larbi*
Pr. AMMAR Haddou
Pr. AOUI Sarra
Pr. BAITE Abdelouahed*
Pr. BALOUCH Lhousaine*
Pr. BENZIANE Hamid*
Pr. BOUTIMZIANE Nourdine
Pr. CHARKAOUI Naoual*
Pr. EHIRCHIOU Abdelkader*
Pr. ELABSI Mohamed

Réanimation médicale
Pneumo phtisiologie
Chirurgie générale
Chirurgie cardio vasculaire
Traumatologie orthopédie
ORL
Parasitologie
Anesthésie réanimation
Biochimie-chimie
Pharmacie clinique
Ophtalmologie
Pharmacie galénique
Chirurgie générale
Chirurgie générale

Pr. EL BEKKALI Youssef*
Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
Pr. EL OMARI Fatima
Pr. GANA Rachid
Pr. GHARIB Noureddine
Pr. HADADI Khalid*
Pr. ICHOU Mohamed*
Pr. ISMAILI Nadia
Pr. KEBDANI Tayeb
Pr. LALAOUI SALIM Jaafar*
Pr. LOUZI Lhoussain*
Pr. MADANI Naoufel
Pr. MAHI Mohamed*
Pr. MARC Karima
Pr. MASRAR Azlarab
Pr. MOUSSAOUI Abdelmajid
Pr. MOUTAJ Redouane *
Pr. MRABET Mustapha*
hygiène
Pr. MRANI Saad*
Pr. OUZZIF Ez zohra*
Pr. RABHI Monsef*
Pr. RADOUANE Bouchaib*
Pr. SEFFAR Myriame
Pr. SEKHSOKH Yessine*
Pr. SIFAT Hassan*
Pr. TABERKANET Mustafa*
Pr. TACHFOUTI Samira
Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
Pr. TANANE Mansour*
Pr. TLIGUI Houssain
Pr. TOUATI Zakia

Décembre 2008

Pr ZOUBIR Mohamed*
Pr TAHIRI My El Hassan*

Chirurgie cardio vasculaire
Anesthésie réanimation
Psychiatrie
Neuro chirurgie
Chirurgie plastique et réparatrice
Radiothérapie
Oncologie médicale
Dermatologie
Radiothérapie
Anesthésie réanimation
Microbiologie
Réanimation médicale
Radiologie
Pneumo phtisiologie
Hématologie
Anesthésier réanimation
Parasitologie
Médecine préventive santé publique et
Virologie
Biochimie-chimie
Médecine interne
Radiologie
Microbiologie
Microbiologie
Radiothérapie
Chirurgie vasculaire périphérique
Ophtalmologie
Chirurgie générale
Traumatologie orthopédie
Parasitologie
Cardiologie

Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale

PROFESSEURS AGREGES :

Mars 2009

Pr. ABOUZAHIR Ali*	Médecine interne
Pr. AGDR Aomar*	Pédiatre
Pr. AIT ALI Abdelmounaim*	Chirurgie Générale
Pr. AIT BENHADDOU El hachmia	Neurologie
Pr. AKHADDAR Ali*	Neuro-chirurgie
Pr. ALLALI Nazik	Radiologie
Pr. AMAHZOUNE Brahim*	Chirurgie Cardio-vasculaire
Pr. AMINE Bouchra	Rhumatologie
Pr. AZENDOUR Hicham*	Anesthésie Réanimation
Pr. BELYAMANI Lahcen*	Anesthésie Réanimation
Pr. BJIJOU Younes	Anatomie
Pr. BOUHSAIN Sanae*	Biochimie-chimie
Pr. BOUI Mohammed*	Dermatologie
Pr. BOUNAIM Ahmed*	Chirurgie Générale
Pr. BOUSSOUGA Mostapha*	Traumatologie orthopédique
Pr. CHAKOUR Mohammed *	Hématologie biologique
Pr. CHTATA Hassan Toufik*	Chirurgie vasculaire périphérique
Pr. DOGHMI Kamal*	Hématologie clinique
Pr. EL MALKI Hadj Omar	Chirurgie Générale
Pr. EL OUENNASS Mostapha*	Microbiologie
Pr. ENNIBI Khalid*	Médecine interne
Pr. FATHI Khalid	Gynécologie obstétrique
Pr. HASSIKOU Hasna *	Rhumatologie
Pr. KABBAJ Nawal	Gastro-entérologie
Pr. KABIRI Meryem	Pédiatrie
Pr. KADI Said *	Traumatologie orthopédique
Pr. KARBOUBI Lamya	Pédiatrie
Pr. L'KASSIMI Hachemi*	Microbiologie
Pr. LAMSAOURI Jamal*	Chimie Thérapeutique
Pr. MARMADÉ Lahcen	Chirurgie Cardio-vasculaire
Pr. MESKINI Toufik	Pédiatrie
Pr. MESSAOUDI Nezha *	Hématologie biologique
Pr. MSSROURI Rahal	Chirurgie Générale
Pr. NASSAR Ittimade	Radiologie
Pr. OUKERRAJ Latifa	Cardiologie

Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *
Pr. ZOUHAIR Said*

Pneumo-phtisiologie
Microbiologie

Octobre 2010

Pr. ALILOU Mustapha
Pr. AMEZIANE Taoufiq*
Pr. BELAGUID Abdelaziz
Pr. BOUAITY Brahim*
Pr. CHADLI Mariama*
Pr. CHEMSI Mohamed*
Pr. CHERRADI Ghizlan
Pr. DAMI Abdellah*
Pr. DARBI Abdellatif*
Pr. DENDANE Mohammed Anouar
Pr. EL HAFIDI Naima
Pr. EL KHARRAS Abdennasser*
Pr. EL MAZOUZ Samir
Pr. EL SAYEGH Hachem
Pr. ERRABIH Ikram
Pr. LAMALMI Najat
Pr. LEZREK Mounir
Pr. MALIH Mohamed*
Pr. MOSADIK Ahlam
Pr. MOUJAHID Mountassir*
Pr. NAZIH Mouna*
Pr. RAISSOUNI Zakaria*
Pr. ZOUAIDIA Fouad

Anesthésie réanimation
Médecine interne
Physiologie
ORL
Microbiologie
Médecine aéronautique
Cardiologie
Biochimie chimie
Radiologie
Chirurgie pédiatrique
Pédiatrie
Radiologie
Chirurgie plastique et réparatrice
Urologie
Gastro entérologie
Anatomie pathologique
Ophtalmologie
Pédiatrie
Anesthésie Réanimation
Chirurgie générale
Hématologie
Traumatologie Orthopédie
Anatomie pathologique

Mai 2012

Pr. Abdelouahed AMRANI
Pr. ABOUELALAA Khalil*
Pr. Ahmed JAHID
Pr. BELAIZI Mohamed*
Pr. BENCHEBBA Drissi*
Pr. DRISSI Mohamed*
Pr. EL KHATTABI Abdessadek*
Pr. EL OUAZZANI Hanane*
Pr. MEHSSANI Jamal*

Chirurgie Pédiatrique
Anesthésie Réanimation
Anatomie Pathologique
Psychiatrie
Traumatologie Orthopédique
Anesthésie Réanimation
Médecine Interne
Pneumophtisiologie
Psychiatrie

Pr. Mouna EL ALAOUI MHAMDI
Pr. Mounir ER-RAJI

Chirurgie Générale
Chirurgie Pédiatrique

Pr. RAISSOUNI Maha*

Cardiologie

ENSEIGNANTS SCIENTIFIQUES
PROFESSEURS

Pr. ABOUDRAR Saadia
Pr. ALAMI OUHABI Naima
Pr. ALAOUI KATIM
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma
Pr. ANSAR M'hammed
Chimique
Pr. BOUHOUCHE Ahmed
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz
Pr. BOURJOUANE Mohamed
Pr. CHAHED OUZZANI Lalla Chadia
Pr. DAKKA Taoufiq
Pr. DRAOUI Mustapha
Pr. EL GUESSABI Lahcen
Pr. ETTAIB Abdelkader
Pr. FAOUZI Moulay El Abbas
Pr. HAMZAOUI Laila
Pr. HMAMOUCHE Mohame
Pr. IBRAHIMI Azeddine
Pr. KHANFRI Jamal Eddine
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med
Pr. REDHA Ahlam
Pr. TOUATI Driss
Pr. ZAHIDI Ahmed
Pr. ZELLOU Amina

Physiologie
Biochimie
Pharmacologie
Histologie-Embryologie
Chimie Organique et Pharmacie
Génétique Humaine
Applications Pharmaceutiques
Microbiologie
Biochimie
Physiologie
Chimie Analytique
Pharmacognosie
Zootechnie
Pharmacologie
Biophysique
Chimie Organique
Biotechnologie
Biologie
Chimie Organique
Biochimie
Pharmacognosie
Pharmacologie
Chimie Organique

**Enseignants Militaires*

DEDICACES

*À la mémoire de mon oncle Sidi Larbi Benazzouz qui m'a tant choyé et
qui me manque si cruellement.*

*À mon grand-père Sidi Ali Benazzouz qui fut un érudit qui n'avait
de temps que pour la connaissance et la culture.*

*À mon grand-oncle Sidi Aissa Benazzouz que je n'ai pas eu le
privilege de connaitre et dont l'envergure nous est constamment
rappelée par mon père.*

*A mes aïeux Sidi Larbi Benazzouz, Sidi Eriahi AlMaaroufi,
Aami Sid Elmiloudi à qui je voue le plus grand respect et que mon père
cite toujours dans ces prières.*

*À celui qui nous a donné notre nom, Sidi Mohammed Benazzouz et à
qui nous devons la racine de notre arbre généalogique.*

*Je ne peux en cette occasion oublié nos ancêtres spirituels Sidi
Abderahman Azzaine et Sidi Aissa Elhanouni.*

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer l'amour,
l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous tous.*

À mon oncle Sidi El Miloudi votre générosité et votre bonté font que vous demeurez à jamais avec nous, empreint dans nos souvenirs.

À mon oncle Abdeljabar qui à l'instar de mon père a su garder le sens de la famille, je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour, puisse Dieu, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

À mon père, tu nous as appris depuis nos premiers pas que seuls le travail et l'éducation valorisent l'homme et nous l'avons compris. Merci pour ces sages conseils et que Dieu t'accorde une longue vie afin que tu récoltes ce que tu as semé.

À ma mère pour les sacrifices auxquels tu as consenti et pour la sagesse dont tu as fait preuve pour la réussite de tes enfants; puisse ce travail te reconforter et que Dieu t'accorde aussi une longue vie pour récolter le fruit de tes souffrances.

*À mon frère Azzeddine dont le soutien et les encouragements
ont été source constante de motivation.*

*À la mémoire de Mamma et de mes grand-mères,
veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection la
plus sincère.*

À mes oncles et mes tantes merci pour votre affection.

*À mes amis sans qui l'aboutissement de ce travail n'aurait pas été aussi
aisé. Je ne citerai pas de noms ici, pour ne pas en oublier certains.*

À toute la famille.

Remerciements :

*Au terme de mes études à la FMPR,
sanctionnées par le présent document, ma
reconnaissance et mes remerciements les plus
sincères sont adressés*

À NOTRE MAÎTRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

MADAME LE PROFESSEUR S. HAMZAOUI

Professeur de Bactériologie

Nous sommes très honorés par votre présence dans la présidence de notre jury de thèse.

Nous vous présentons tout notre respect devant vos compétences professionnelles, vos qualités humaines et votre disponibilité pour vos étudiants.

Nous vous prions, cher Maître, d'accepter ce travail en témoignage de notre grande estime et profonde gratitude.

À NOTRE MAITRE ET RAPPORTEUR DE THÈSE

MADAME la professeur S.TELLAL

Professeur de biochimie

Nous tenons à vous exprimer notre profonde reconnaissance pour l'honneur que vous nous avez fait en acceptant de diriger ce travail. Nous avons eu le plus grand plaisir à travailler sous votre direction.

Votre compétence, votre sérieux, votre disponibilité et votre rigueur sont pour nous le meilleur exemple à suivre.

Vous avez bien voulu nous confier ce travail riche d'intérêt et nous guider à chaque étape de sa réalisation.

Vous nous avez toujours réservé le meilleur accueil, malgré vos obligations professionnelles. Vos encouragements infatigables, votre amabilité, votre gentillesse méritent toute admiration.

Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer notre profond respect tout en vous témoignant notre gratitude pour le suivi attentif que vous avez manifesté tout au long de l'élaboration de ce travail.

À NOTRE MAÎTRE ET JUGE DE THÈSE

MONSIEUR A. LAATIRIS

Professeur de Pharmacie Galénique

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger cette thèse.

Nous vous portons une grande considération tant pour votre extrême gentillesse que pour vos qualités professionnelles.

Veillez trouver ici, cher Maître, l'expression de notre profond respect et de notre sincère reconnaissance.

À NOTRE MAÎTRE ET JUGE DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR M. ICHOU

Professeur d'Oncologie médicale

Nous sommes infiniment sensibles à l'honneur que vous nous faites de siéger parmi notre jury de thèse.

Nous vous remercions d'avoir accepté de juger ce travail, et ce malgré vos obligations professionnelles très prenantes.

Veillez trouver ici, cher Maître, l'expression de notre profond respect et de notre sincère reconnaissance pour nous avoir fait l'honneur d'examiner ce document et de l'intérêt que vous avez bien voulu nous porter.

Veillez recevoir à travers cette thèse l'assurance de notre haute considération

À NOTRE MAITRE ET JUGE DE THÈSE

Mme. Le Professeur N.MESSAOUDI

Professeur d'Hématologie biologique

Vous avez accepté en toute simplicité de juger ce travail et c'est pour nous un grand honneur de vous voir siéger parmi notre jury de thèse.

Nos remerciements les plus sincères en hommage à votre sympathie, votre pédagogie et votre disponibilité.

Permettez-nous de vous présenter dans ce travail, le témoignage de notre profond respect.

Liste des abréviations

- AAD:** virus associé aux adénovirus
- ADAM:** a disintegrin and metalloproteinase domain
- ADCC:** antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity
- ADN:** acide désoxyribonucléique
- AFP:** promoteur alphafoetoprotéine
- AICARFT:** 5-amino-4-carboxamide ribonucleotide formyl transferase
- AMM:** autorisation de mise sur le marché
- AMPC:** adenosine monophosphate cyclique
- ANT:** nucléotide a adenine
- APAF-1:** apoptotic protease activating factor 1
- AREG:** amphireguline
- ATP:** adenosine triphosphate
- AZT:** zidovudine
- BAD:** Bcl2-antagonist of cell death
- BAK:** BCL2-antagonist killer
- BAX:** Bcl2-associated X protein
- BCL-2:** B cell lymphoma protein 2
- BCR-ABL:** breakpoint cluster region-Abelson
- BCG:** bacille de Calmette et Guérin;
- BH1/2/3:** Bcl-2 homology domain 1/2/3
- BID BH3:** interacting domain death agonist
- BSA:** albumine de sérum bovin
- BTC:** bêta celluline
- CARD:** caspase activation recruitment domain
- CARED:** caspase recruitment domain
- Caspase:** cysteinyl aspartic acid protease
- CBNPC:** cancer bronchique non à petites cellules

CBPC: cancer bronchique à petites cellules
CEA: promoteur carcino embryonnaire
CFA: adjuvant complet de Freund
CMV: cytomegalovirus;
CP: cyclophosphamide
CpG: oligodesoxynucléotide
CpG ODN: oligodesoxynucléotide synthétique CpG
CRK v-crk: sarcoma virus CT10 oncogene homolog
CtBP: C terminal binding protein
CTL: réponse cytotoxique cellulaire
CTLA-4: cytotoxic T lymphocyte antigen 4
CPA: Cerebellopontine angle
CYC202: roscovidine
CYP450: cytochrome P450
DACH: diamino cyclohexane
DAdG: pont adenine guanine
DC: cellules dendritiques
Dcmp: desoxycytidine monophosphate
DD: domaine de mort cellulaire
DED: death effectors domain
DGdG: pont guanine guanine
Dgtp: desoxyguanosine triphosphate
DHFR: dihydrofolate reductase
DISC: death inducing signaling complex
DM: double minute
DPD: dihydropyrimidine déshydrogénase
Dtmp: thymidine monophosphate
Dttp: thymidine triphosphate
Dump: transformation par methylation de la desoxyimido-monophosphate
EC50: half maximal effective concentration

EAE: encéphalomyélite auto-immune

EGF : epidermal growth factor (facteur de croissance épidermique)

EGFR: epidermal growth factor receptor (Récepteur de l'EGF)

EGFR-TKI: inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR

EPR: epiréguline

ERBB: v-erb-b erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2

ERK: extracellular signal-regulated kinase

ERK1/2: extracellular signal-regulated kinase 1/2

FADD: Fas associated death domain

FPGS: folic polyglutamate synthetase

FHIT: fragile histidine triad gene

GARFT: glycinamide ribonucleotide formyl transferase

GCV: ganciclovir

GRB2: growth factor receptor bound protein 2

GST: gène suppresseur de tumeur

GSH: glutathion

GTP: guanosine triphosphate

HAT: histone acetyl transferase

HB-EGF: héparin binding EGF

HCV: hépatite virale C

HDAC: histone déacétylase

HDACi: inhibiteurs d'histone déacétylase

HER: human epidermal growth factor receptor

HGF: hépatocyte growth factor

HjV: vecteur recombinant

HMGBl: high mobility group box 1

HP1: protéine hétérochromatine P1

hPOT: human protection of telomeres

H-RAS: harvey rat sarcoma viral oncogene homolog

HSP90: heat shock protein 90

HSV: virus de l'herpes simple

HSV-tk: thymidine kinase du virus de l'herpes

hTERT: human telomerase reverse transcriptase

Htr: human telomerase RNA

IAP: inhibitor of apoptosis protein

IASLC: international Association for the Study of Lung Cancer

Icas: inductible costimulator

IDO: indolate amine 2,3-dioxygenase

IF: ifosfamide

IGF: insulin growth factor

IGFIR: récepteur de facteur de croissance de type insuline

IGFBP: insulin growth factor binding protein

IGF1-(R): insulin-like growth factor type 1 (receptor)

IL: interleukine

IRAK: IL-1 receptor associated kinase

IRES: séquence d'entrée interne des ribosomes

K-RAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

Ku70: X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6

LAT: linker for activation of T cells

LPS: lipopolysaccharide

MAO: mono amino oxydase

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MDR: multidrug resistance

MEF2: myocytes enhancer factor 2

MET: proto-oncogène tyrosine kinase

MMR: système de réparation des mésappariements

MPL: LPS synthétique

MSI: phénotype d'instabilité des microsatellite

MTX: methotrexate

MyD88: myeloide differentiation primary response protein 88

NaBu: butyrate de sodium

NAD: nicotine adénine dinucléotide

NER: système de réparation par excision des nucléotides

NIS: symporteur sodium iode

NOD: récepteur au mannose

N-RAS: neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog

NRG: neuréguline

NUE: NIS upstream enhancer

ODC: ornithine decarboxylase

OLS: organes lymphoïde secondaires.

OMIM: online mendelian inheritance in man classification

OMS: Organisation mondiale de la santé

P16: cyclin dependent kinase inhibitor 2A

P53: protein 53

PAMP: pathogen associated molecular pattern

Pcor: pour origine de répllication conditionnelle

Pei: polyethylenimine

P-Gp: permeability glycoprotein

PI3K: phosphatidyl inositol 3 kinase

PKC: protéine kinase de type C

Poly(A:U): acide polyadenylique polyuridylique;

Poly(I :C): acide polyinosylique polycytidylique;

PP2A: protein phosphatase 2 A

PTPC: permeability transition pore complex

PRR: pathogen recognition receptor

PS: performance status

PTB: phospho tyrosine binding

PTEN: phosphatase and tensin homolog

RAF: proto oncogene serine/threonine-protein kinase

RAR: retinoic acid receptor

RAS: rat sarcoma viral oncogene homolog

RASSF1: Ras association domain family member 1

RFC: reduced folate carrier

ROS: reactive oxygen species

SAHA: suberoylanilide hydroxamic acid

SH2: Src Homology domain 2

SHC: Src homology 2 domain containing

SIMP: soluble inter-membrane mitochondrial protein

SIRT: sirtuines

SRC: Rous sarcoma oncogene

SVF: sérum de veau f.tal

SV40: simian virus 40

TA: tubastatine

TCR : récepteur des cellules T

TEMP: plateforme d'imagerie équipée de cameras

TGF: transforming growth factor

TIN: TRF interacting protein

TLR: toll like receptor

TNF: tumor necrosis factor

TNFR: facteur nécrosant des tumeurs

TNFR1: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1

TNM: classification histologique "Tumor Node Metastasis"

TP53: tumor protein 53

TSA: trichostatin A

TRAM: Trif related adaptator molecule

TRF: telomere repeat binding factor

Trif: TIR domain containing adaptator inducing IFN

TS: thymidilate synthetase

UICC: union internationale contre le cancer

VDAC: voltage dependant anion channel

VEGF: vascular endothelial growth factor

VIH: virus de l'immunodéficience humaine

VSV: virus de la stomatite vésiculaire

Vsv-g: enveloppe du virus de la stomatite

VSR: virus respiratoire syncitial

5-FU: 5-fluorouracile

Liste des figures

Figure 1: Mécanisme de l'oncogénèse	7
Figure 2: Étapes de la cancérisation.....	8
Figure 3: Les étapes de la carcinogénèse.	9
Figure 4: Ultrastructure cellulaire.	11
Figure 5: Interaction des proto-oncogènes avec la cellule normale	13
Figure 6: Processus de malignisation des tumeurs.....	14
Figure 7: Structure de la Télomerase.	16
Figure 8: Rôles des intégrines.	18
Figure 9: Étapes de formation des métastases.....	21
Figure 10: Différence entre apoptose et nécrose.....	23
Figure 11: Mécanisme d'action des inhibiteurs de l'apoptose.....	29
Figure 12: Structures de l'hypérite.....	33
Figure 13: Structures de la méchloréthamine.....	33
Figure 14: Mécanisme d'action des nitrosourées.....	35
Figure 15: Structure des dérivés du platine	37
Figure 16: Structures des camptothécines.....	41
Figure 17 : Arrêt du cycle cellulaire des cellules normales et tumorales en présence d'Irinotecan	42
Figure 18: Structure du methotrexate comparée a celle de l'acide folique.....	43
Figure 19: Structure du permetrexed.....	45

Figure 20: Étapes de la pénétration du perimetrexed dans la cellule	46
Figure 21: Structure du 5-fluorouracile.....	48
Figure 22: Structure des vinca alcaloïdes utilisé en chimiothérapie	50
Figure 23: Structure du Paclitaxel.....	51
Figure 24: Comparaison du mécanisme d'action des vinca alcaloïdes et des taxanes sur la tubuline.....	53
Figure 25: Principe de la thérapie génique.....	57
Figure 26: Structure des vecteurs recombinants.	61
Figure 27: Étapes de la fabrication d'un vecteur viral AAV	62
Figure 28: Différents types de vecteurs utilisés en thérapie génique.....	63
Figure 29: Synthèse de l'ADN complexé.	66
Figure 30: Contrôle de l'apoptose tumorale.....	72
Figure 31: Production de lymphocytes spécifiques pour l'immunothérapie.	74
Figure 32: Structure du système symporteur de l'iode	79
Figure 33: Ciblage des IGFR.	96
Figure 34: Structure du Flavopiridol	103
Figure 35: Structure de l'E7070	104
Figure 36: Structure du BMS-387032	105
Figure 37: Structure des récepteurs du CTLA-4.	107
Figure 38: Structure des TLR.....	109
Figure 39: Activation des TLR	110

Figure 40: Voies de signalisation des TLR.....	112
Figure 41: Mécanismes d'inhibition des lymphocytes T par les CTLA-4.....	124
Figure 42: Mécanismes d'action des CTLA-4.....	128
Figure 43: Activation et inactivation des lymphocytes T.....	130
Figure 44: Rôles de la sénescence dans la prolifération cellulaire.....	137
Figure 45: Structure des télomères.....	139
Figure 46: Rôles des télomerase dans le cancer.....	142
Figure 47: Télomères et immortalité cellulaire.....	143
Figure 48: Approche anti sens par dégradation de la RNase.....	145
Figure 49: Oligonucléotides antisens ciblant hTR.....	147
Figure 50: Oligonucléotides antisens ciblant hTERT.....	148
Figure 51: Action des ribozymes.....	150
Figure 52: Ribozymes ciblant hTR.....	152
Figure 53: Mécanisme de modulation de l'interférence ARN (ARNi).....	154
Figure 54: Structure du 17- β -œstradiol.....	158

Liste des tableaux

Tableau I: Principales caractéristiques des vecteurs viraux utilisés dans les protocoles précliniques et/ou cliniques de thérapie génique	64
Tableau II: Protocoles de phase I-II de thérapie génique du cancer pancréatique non résecable	71
Tableau III: Les principaux ligands des récepteurs TLR	113
Tableau IV: Les principales actions associées à la stimulation des cellules Immunitaires humaines par des ligands des récepteurs TLR :	116
Tableau V: Principaux essais cliniques menés en cancérologie utilisant des ligands de TLR	120
Tableau VI: Principaux essais cliniques fondés sur la neutralisation de CTLA-4	132

SOMMAIRE

Introduction	1
---------------------------	---

PREMIERE PARTIE

Chapitre I: GÉNÉRALITÉS SUR L'ONCOGENESE	5
I.1. DÉFINITION	6
I.2. Oncogénèse et communication cellulaire.	6
I.2.1. la carcinogénèse	9
I.2.2. Cytologie structurale de la cellule cancéreuse	10
I.2.2.1. Anomalies structurales et ultrastructurales	10
I.2.2.2. Anomalies génétiques.	11
I.2.2.3. Anomalies métaboliques	14
I.2.2.4. Comportement in vitro	15
I.3. Perturbation de la division cellulaire et cancer.	19
I.3.1. La mort cellulaire programmée	20
I.3.1.1. Voie intrinsèque de l'apoptose.....	22
I.3.1.2. Voie extrinsèque, les récepteurs de mort cellulaire	26
I.3.1.3. Contrôle de l'apoptose	27
I.3.1.4. Voie indépendante des caspases.....	28

CHAPITRE II: TRAITEMENTS ANTICANCEREUX HABITUELS	31
---	----

II.1 Médicaments cytotoxiques agissant directement sur l'ADN	32
--	----

II.1.1. Les cytotoxiques alkylants.....	32
II.1.2. Les moutardes à l'azote	33
II.1.3. Les nitrosourées	34
II.1.4. Les dérivés du platine	35
II.1.5. Les cytotoxiques intercalant	40
II.5.1. Les camptothécines (inhibiteurs de topoisomérase I)	40
II.5.2. Les anthracyclines (inhibiteurs de topoisomérase II).....	40
II.2. Médicaments cytotoxiques agissant indirectement sur l'ADN.....	42
II.2.1. Médicaments anticancéreux inhibant la synthèse de l'ADN.....	42
II.2.1.1. Les antimétabolites	42
II.2.1.2. Analogues de l'acide folique	43
II.2.1.3. Analogues des bases pyrimidiques	47
II.2.1.4. Les poisons du fuseau	48
II.2.1.5. Les vinca alcaloïdes	49
II.2.1.6. Les taxanes.....	51
II.2.1.7. Le paclitaxel	52
II.2.1.8. Le docétaxel.....	52

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE I: LA THERAPIE GENIQUE:.....	55
I.1. Les différentes approches de transfert de gène et de thérapie génique :.....	57
I.1.1. Les vecteurs viraux classiques	58
I.1.2. Les vecteurs rétroviraux	58

I.1.3. Les vecteurs adénoviraux	59
I.1.4. Les nouveaux vecteurs viraux	60
I.1.4.1. Les vecteurs recombinants SV40	60
I.1.4.2. Les vecteurs AAV	61
I.1.4.3. Les vecteurs lentiviraux	62
I.1.4.4. Les vecteurs synthétiques.....	63
I.1.4.5. L'ADN nu	63
I.1.4.6. L'ADN complexé.....	65
I.1.5. Les techniques de ciblage.....	66
I.1.5.1. le pseudotypage	66
I.1.5.2. Le ciblage moléculaire	67
I.2. Bases clinique de la thérapie génique	67
I.3. Thérapie génique des cancers digestifs.....	68
I.3.1. Transfert génique dans le tractus gastro-intestinal.....	69
I.3.2. Transfert de gène dans le foie et le pancréas.....	70
I.3.3. Stratégies de thérapie génique des cancers digestifs.....	72
I.3.3.1. Le contrôle de l'apoptose tumorale.....	72
I.3.3.2. La piste des gènes suicides : l'effet de voisinage par chimiosensibilisation	73
I.4. L'immunothérapie.....	74
I.5. Un exemple de développement préclinique : le récepteur de somatostatine sst2	75
Chapitre II: IRATHERAPIE GENIQUE ANTICANCEREUSE	
UTILISANT LE NIS77
II.1. Le symporteur Na ⁺ /I ⁻ : données structurales et physiologiques	79

II.1.1. Structure.....	79
II.1.2. Localisation.....	80
II.1.3. Rôle du symporteur Na/iode.....	80
II.1.4. Régulation.....	81
II.1.4.1. Régulation du symporteur Na/iode thyroïdien.....	81
II.1.4.2. Régulation du symporteur Na/iode extra thyroïdien.....	81
II.2. Expression du symporteur Na/iode dans les cancers.....	82
II.2.1. Dans le cancer de la thyroïde.....	82
II.2.2. Dans les cancers non thyroïdiens.....	82
II.3. Thérapie génique utilisant le symporteur Na/iode.....	83
II.3.1. Principe – avantages.....	83
II.3.2. Essais de thérapie génique - perspectives thérapeutiques.....	84
II.3.2.1. Dans le cancer différencié de la thyroïde.....	84
II.3.2.2. Dans les autres cancers.....	85
II.3.2.2.1. Dans le cancer du cerveau.....	86
II.3.2.2.2. Dans le cancer du pharynx.....	86
II.3.2.2.3. Dans le myélome multiple.....	86
II.3.2.2.4. Dans les hépatocarcinomes.....	87
II.3.2.2.5. Dans le cancer de la prostate.....	87
II.3.2.2.6. Dans le cancer du sein.....	88
II.3.2.2.7. Dans les tumeurs neuroendocrines.....	88
II.3.2.2.8. Dans le cancer du pancréas.....	88
II.3.2.2.9. Dans le mésothéliome.....	89
II.3.2.2.10. Dans les autres cancers de la thyroïde.....	89

II.4. Limites et perspectives d'amélioration.....	89
---	----

CHAPITRE III: NOUVELLES APPROCHES DANS LES THERAPEUTIQUES CIBLEES.....94

III.1. Les récepteurs des facteurs de croissance de type insuline (IGF) et les cyclines..	95
---	----

III.1.1. Insulin-like growth factor receptors de type I (IGF1 R).....	95
---	----

III.1.1.1. Structure moléculaire et physiologie :.....	95
--	----

III.1.1.2. Anticorps anti HGF1 R.....	97
---------------------------------------	----

III.1.1.3. inhibiteurs de tyrosine kinase	99
---	----

III.1.2. Cyclines et kinases dépendant des cyclines	100
---	-----

III.1.3. Molécules inhibitrices des CDK	101
---	-----

III.1.3.1. UCN-O1	101
-------------------------	-----

III.1.3.2. Flavopiridol:	102
--------------------------------	-----

III.1.3.3. E7070.....	104
-----------------------	-----

III.1.3.4. Autres molécules :	204
-------------------------------------	-----

III.2. CTLA-4 et Toll-like récepteurs, de nouvelles cibles en 128Immunotherapie	106
---	-----

III.2.1. Rappels.....	106
-----------------------	-----

III.2.2. Historique des récepteurs de la famille Toll-like receptors (TLR).....	108
---	-----

III.2.3. Localisation, expression, et principales voies de signalisation des TLR...111	
--	--

III.3. Bases fondamentales de l'implication des TLR en cancérologie et modèles expérimentaux :	117
--	-----

III.3.1. les ligands de TLR comme agents immunomodulateurs.....	117
---	-----

III.3.2. Les ligands de TLR utilisés comme agent thérapeutique ciblant directement les cellules tumorales	118
---	-----

III.3.3. Utilisations thérapeutiques potentielles	119
---	-----

III.3.4. Les ligands de TLR administrés en plus d'une autre approche d'immunothérapie:	121
--	-----

III.3.5. Les ligands de TLR administrés seuls	121
III.4. Utilisation d'anticorps neutralisant CTLA-4.....	123
III.4.1. Biologie de CTLA-4.....	123
III.4.2. Fonctions de CTLA-4.....	127
III.4.3. rationnel préclinique.....	130
III.4.3.1. Données cliniques.....	131
Chapitre IV: LA SENESCENCE	136
IV.1. Télomères.....	138
IV.2. Télomérase et cancer.....	141
IV.3. Inhibiteurs des télomères et de la télomérase.....	144
IV.3.1. Approche anti sens :	144
IV.3.1.1. Oligonucléotides antisens ciblant hTR.....	145
IV.3.1.2. Oligonucléotides antisens ciblant hTERT.....	148
IV.3.2. Ribozymes.....	149
IV.3.2.1. Ribozymes ciblant hTR.....	151
IV.3.2.2. Ribozymes ciblant hTERT	152
IV.3.3. Interférence ARN (ARNi).....	152
IV.4. Dominants négatifs de hTERT (DN-hTERT).....	153
IV.5. Ciblage des mécanismes régulateurs de la télomérase aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel	155
IV.5.1. Niveau transcriptionnel	155
IV.5.2. Niveau post-transcriptionnel	157
IV.6. Ciblage des télomères et des protéines associées.....	158

IV.6.1. Stabilisateurs des G-quadruplex.....	158
IV.7. Ciblage des protéines associées aux télomères	160
IV.8. Inhibiteurs de la reverse transcriptase	161
IV.9. Immunothérapie : vaccins ciblant la télomérase	162
IV.10. Thérapie génique.....	162
IV.11. Autres approches d'inhibition de la télomérase	164
CONCLUSION.....	168

Introduction

La thématique de recherche bibliographique à laquelle s'intègre ce travail de thèse concerne les nouveautés dans le traitement des cancers qui grâce à une mise en perspective fournira un nouveau cadre conceptuel permettant de mieux intégrer les nouvelles stratégies mises en œuvre dans le traitement des cancers.

Les récentes avancées de la connaissance scientifique dans les mécanismes de la cancérisation durant ces deux dernières décennies ont bouleversé complètement la vision que nous avons de cette maladie.

De nouveaux mécanismes ont été mis à jour offrant ainsi de nouvelles cibles aux thérapeutes et remettant en question les standards thérapeutiques actuels.

En se basant sur ces recherches, de nouvelles stratégies thérapeutiques ont été développées, on sait aujourd'hui que l'on meurt très rarement de la tumeur initiale, mais plutôt des néoplasmes secondaires ou métastases essaimées par voie sanguine ou lymphatique. La chimiothérapie, la radiothérapie et l'hormonothérapie empêchent la prolifération cellulaire, mais ne bloquent que la première phase du développement tumoral s'avérant ainsi souvent inefficace pour les cancers détectés tardivement notamment ceux déjà métastasés.

De nouvelles stratégies thérapeutiques ont été mises au point pour essayer de bloquer les différents mécanismes impliqués dans la progression tumorale. Le développement de molécules antiangiogéniques dans le but de bloquer le développement des vaisseaux, de molécules proapoptotiques pour palier à l'immortalité des cellules tumorales, de stratégies de thérapies géniques ou encore de molécules anti métastatiques pour bloquer le déplacement des cellules, et de virus oncolytiques sont les axes majeurs de la recherche thérapeutique entreprise ces dernières décades et constitueront la majeure partie de notre travail.

Ces nouvelles approches thérapeutiques se sont voulues être des armes plus pointues et donc théoriquement plus spécifiques faisant figure de propositions thérapeutiques innovantes et encourageantes.

Notre travail sera scindé en deux parties:


-Dans la première nous traiterons les généralités sur l'oncogénèse ainsi que des rappels sur les traitements anticancéreux habituels.

-La deuxième partie sera réservée aux nouvelles approches thérapeutiques.

PREMIERE PARTIE

RAPPELS

Chapitre I
GÉNÉRALITÉS SUR
L'ONCOGENESE



I.1. DÉFINITION

Le cancer est une pathologie due à une prolifération cellulaire anormale au sein d'un tissu normal de l'organisme. Ces cellules dérivent toutes d'un même clone, la cellule initiatrice du cancer qui a acquis certaines caractéristiques lui permettant de se diviser indéfiniment et anarchiquement pouvant ainsi former des métastases.

Le cancer est un terme général pour n'importe quelle maladie pour laquelle certaines cellules du corps humain se divisent d'une manière incontrôlée. Les nouvelles cellules résultantes peuvent former une tumeur maligne (un *néoplasme*) ou se propager à travers le corps et former des métastases [1].

I.2. Oncogénèse et communication cellulaire

L'individu est un ensemble pluricellulaire dynamique composé « d'unités cellulaires » morphologiquement individualisées: l'organisme. Ce dernier, est un agencement de cellules en tissus, de tissus en organes, d'organes en systèmes, présente de nombreuses relations avec son environnement. L'organisme est un système ouvert qui est régi par des réactions complexes, mais coordonnées, maintenant un « état stationnaire » normal: l'état homéostatique.

Afin de réguler et de coordonner ses métabolismes et métabolites, en les adaptant à ses besoins comme à ceux de l'individu, toute cellule de l'organisme est à même de maintenir, adapter, renouveler, supprimer, de manière programmée, tout ou partie de ses constituants tant structuraux que fonctionnels [3].

La capacité de se diviser, de se spécialiser, mais aussi de mourir est inscrite dans le génome de chacune des cellules qui composent l'organisme humain. Le déclenchement et l'arrêt de la prolifération cellulaire, l'entrée dans un processus de différenciation ou dans un programme de mort cellulaire (apoptose) résultent de l'intégration au niveau cellulaire de multiples signaux, les uns positifs, les autres négatifs. Au niveau tissulaire, l'équilibre entre ces diverses destinées cellulaires est sous le contrôle de multiples boucles de régulations enchevêtrées.

Mais ces systèmes de régulation permettant un maintien de l'homéostasie sont parfois, comme c'est le cas pour les cancers, déficients. Suite à l'agression de facteurs de l'environnement tels que le tabac, les rayons ionisants, certains agents chimiques ou physiques, certains virus, ou spontanément, le génome humain subit constamment des lésions qui sont réparées ou non.

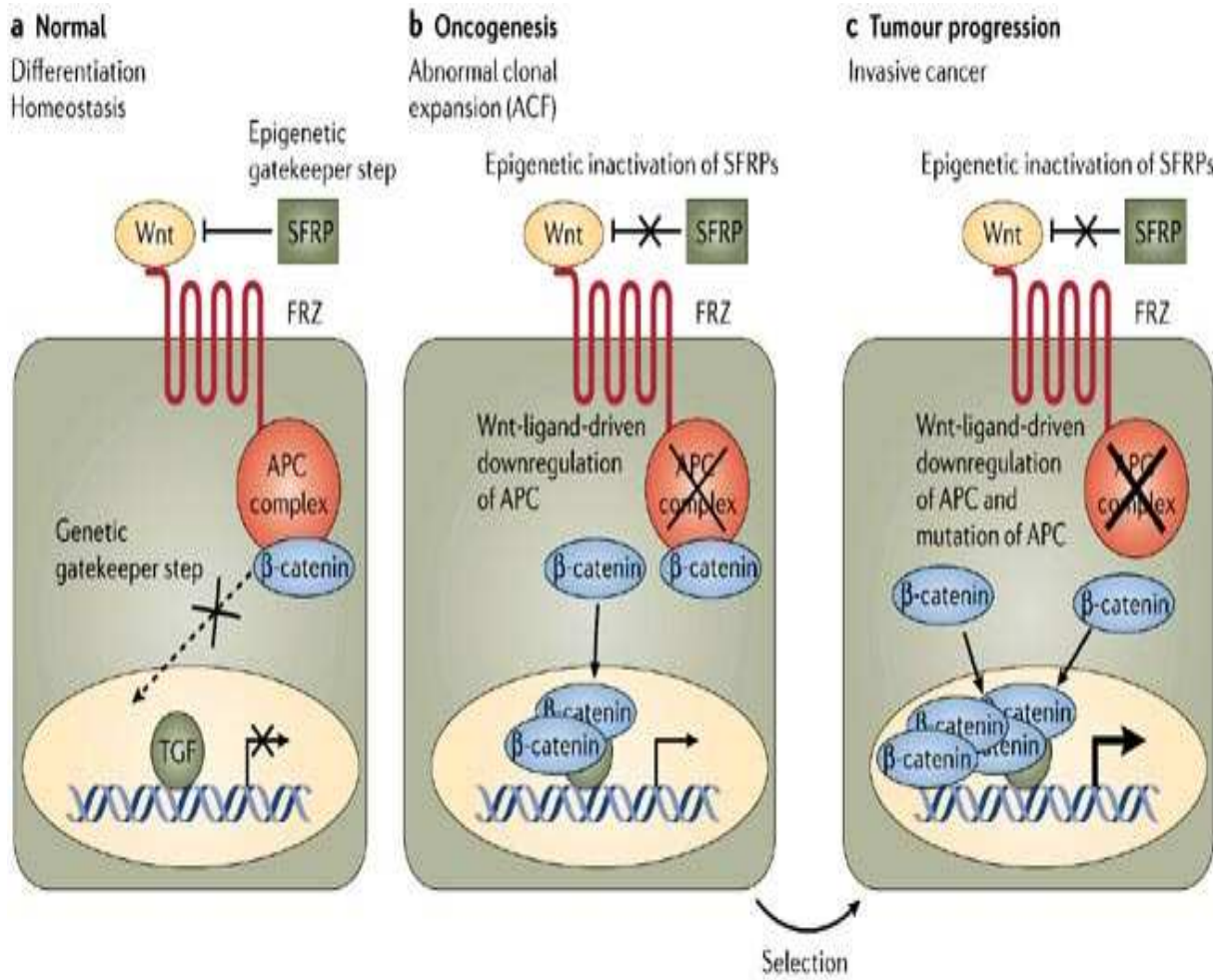


Figure1: Mécanisme de l'oncogénèse [2]

En effet, les systèmes de réparation sont parfois défectueux ou « débordés », la cellule conserve alors certaines altérations qui touchent parfois les systèmes de régulation de la prolifération (**Figure1**). Ne répondant plus correctement aux signaux environnants, elle échappe à toute régulation. La cellule s'engage alors dans un processus anarchique qui conduit, par accumulation successive d'anomalies génétiques, au développement d'une cellule cancéreuse [4].

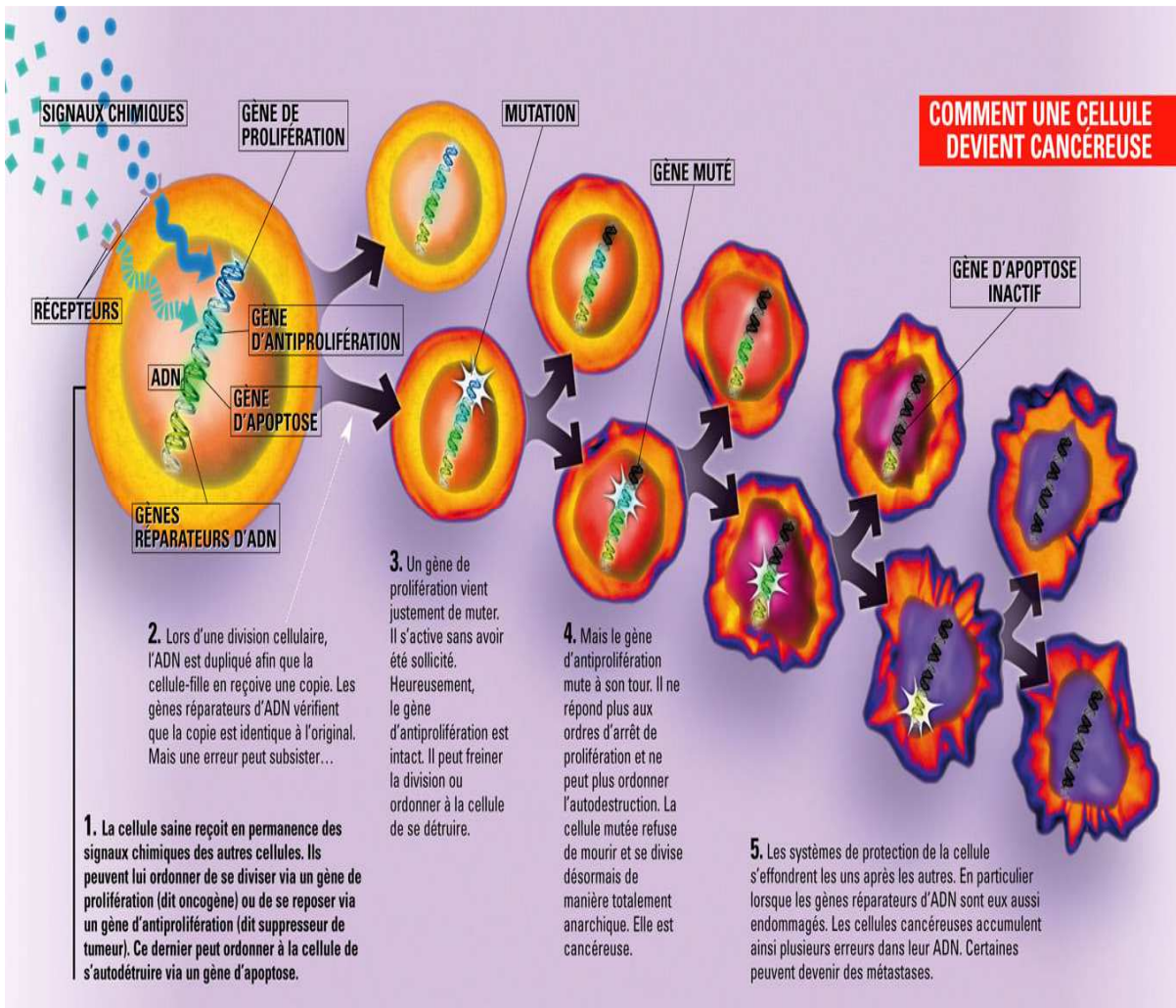


Figure 2: Étapes de la cancérisation [6]

La biologie moléculaire et la génétique ont permis d'établir que les altérations génétiques surviennent précisément sur les éléments de régulation de la différenciation, de la division et de la mort cellulaire.

Le cancer résulte d'un processus multi-étapes conduisant à l'accumulation d'anomalies sur différents gènes, au fil des divisions cellulaires, conférant ainsi un avantage sélectif au clone malin. Les cellules, toutes issues d'une première cellule mutée (clone), forment une tumeur (**Figure 2**). Celle-ci devient de plus en plus agressive pour son environnement et échappe progressivement à tout contrôle [5].

I.2.1. la carcinogénèse

Plusieurs types d'inducteurs et de nombreuses étapes sont en cause dans la cancérisation d'une cellule saine (**Figure 3**).

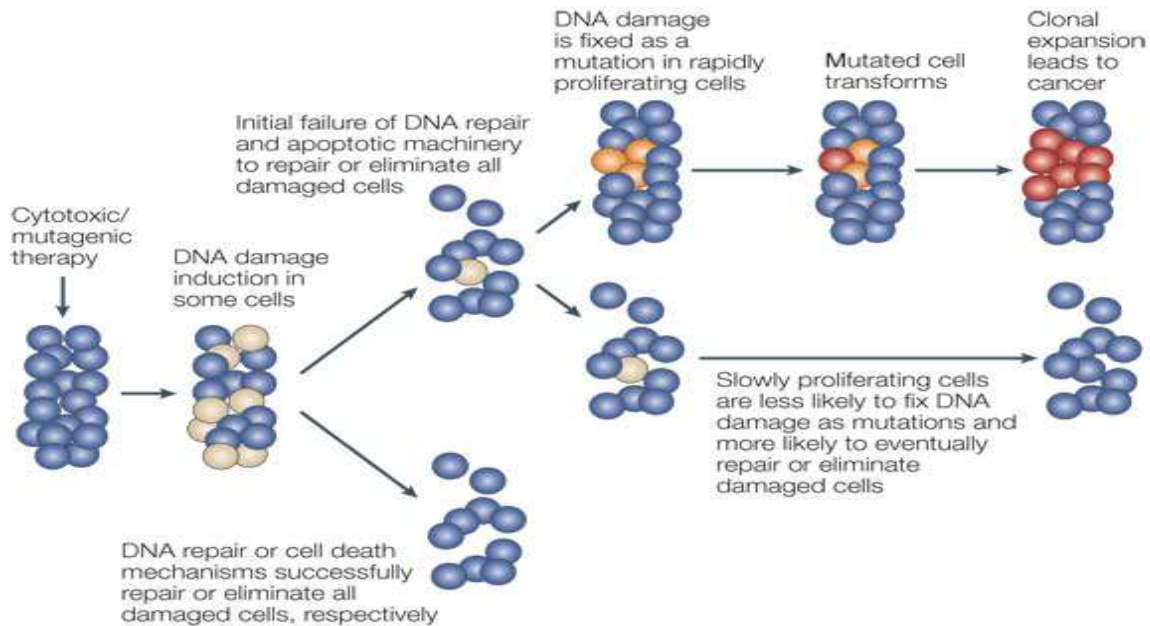


Figure 3: Les étapes de la carcinogénèse [7]

La carcinogénèse est un phénomène à plusieurs étapes, observé en cancérologie clinique et chez l'animal de laboratoire. La compréhension de son fonctionnement repose sur deux idées majeures : l'une est que la transformation tumorale est un processus cumulatif d'événements mutationnels, l'autre que ces événements sont interdépendants. Ainsi, des tumeurs bénignes montrant une prolifération cellulaire restreinte et contrôlée peuvent dégénérer en tumeurs malignes aux proliférations cellulaires anarchiques, incontrôlées, capables d'envahir les tissus adjacents.

Au cours de son évolution, une cellule maligne acquiert par mutations successives des propriétés nouvelles qui la rendent de plus en plus résistante et agressive pour l'organisme.

Le mécanisme essentiel de la carcinogénèse repose sur l'activation de certains oncogènes (gènes intervenant dans le contrôle de la prolifération cellulaire et capables de provoquer un processus de cancérisation) et sur l'inactivation d'antioncogènes (gènes suppresseurs de cancers, contrôlant l'intégrité du génome) [5].

I.2.2. Cytologie structurale de la cellule cancéreuse

I.2.2.1. Anomalies structurales et ultra structurales

***Structure**

Une cellule néoplasique tumorale possède un noyau souvent hypertrophié, irrégulier, pouvant présenter plusieurs nucléoles. Son caryotype est souvent anormal. On note la présence d'un cytoplasme basophile chez de nombreuses cellules cancéreuses, contenant un réseau d'actine souvent désorganisé. Les filaments intermédiaires présents dans les cellules transformées sont par contre souvent similaires à ceux présents dans la cellule normale homologue. Le plasmolemme est modifié, sa teneur en acides sialiques et en gangliosides est diminuée. La mobilité latérale de ses protéines intrinsèques est souvent augmentée. La quantité de fibronectines (glycoprotéines extrinsèques exo plasmiques) associées à la membrane plasmique est souvent diminuée [8].

***Ultrastructure**

L'ultra structure et le nombre des mitochondries sont différents de celui des cellules normales (quantité de crêtes réduite). Certaines enzymes mitochondriales sont altérées ou quantitativement réduites. C'est le cas de la F1-ATPase, des MAO, de la glutamate deshydrogénase (**Figure4**).

Le génome mitochondrial est parfois anormal. Ainsi, dans certains types de leucémies la quantité d'ADN mitochondrial est amplifiée, et le génome se présente sous forme de chaînons) de molécules d'ADN circulaire (Figure 4). Le réticulum endoplasmique présente fréquemment des citernes anormales [9].

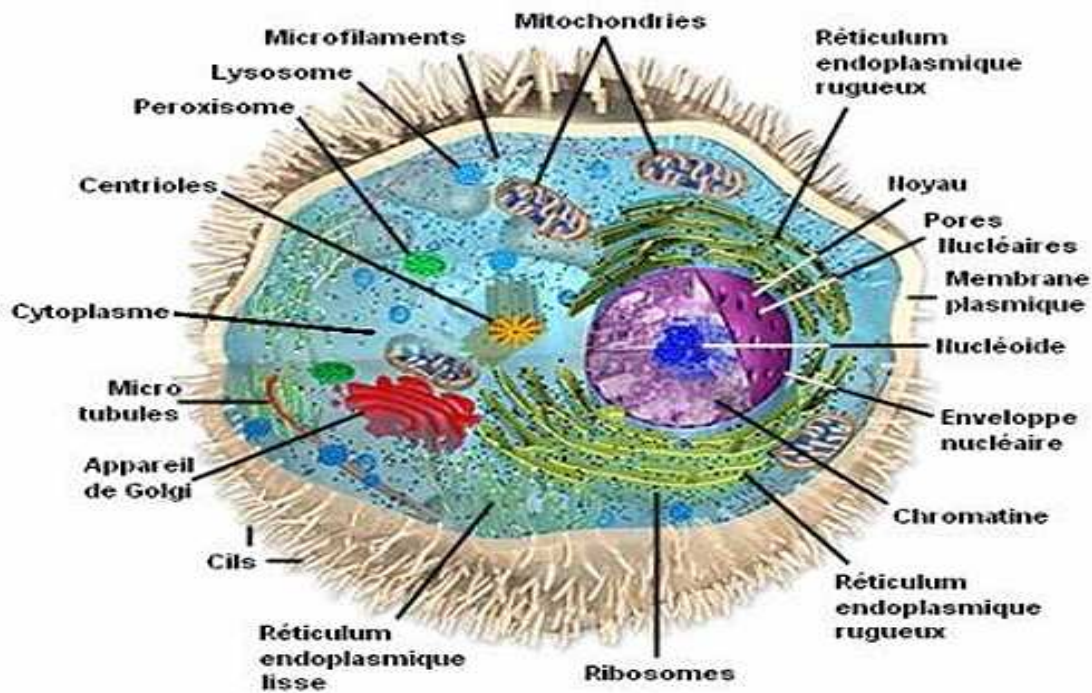


Figure 4: Ultra structure cellulaire [10]

I.2.2.2. Anomalies génétiques.

a-Les oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs

Des protéines impliquées à différents niveaux dans la prolifération cellulaire sont codées par des gènes normaux à posteriori dénommés proto-oncogènes. Certaines formes mutées de ces gènes, les oncogènes, codent pour des protéines de stimulation qualitativement et/ou quantitativement plus puissantes, lesquelles sont capables d'induire et/ou maintenir une prolifération cellulaire excessive (**Figure 5**) [11].

A contrario, des gènes suppresseurs de tumeur (GST) codent pour des protéines normales, inhibitrices de la prolifération cellulaire, mais des mutations peuvent rendre ces dernières inactives, privant ainsi les cellules des « freins » homéostatiques capables de limiter leur prolifération [12].

b-Mécanismes d'activation des oncogènes

*Intégration virale

Soit par insertion de l'ADN viral au niveau d'un gène régulateur aboutissant à un gène chimère à l'origine de la synthèse d'une protéine hybride ou bien à cause d'une insertion au hasard du virus qui possède ses propres séquences activatrices.

***Mutation ponctuelle**

La substitution d'un acide aminé par un autre par des mutations faux sens, peut activer des proto-oncogènes en oncogènes, en touchant par exemple un site catalytique ou en entraînant une activation substitutive de la protéine.

***Délétion**

Les délétions, qui aboutissent le plus souvent à une perte de fonction, peuvent parfois entraîner une activation ou une inhibition anormale de certains gènes, si elles touchent une région régulatrice.

Exemple : l'activation du proto-oncogène Erb B qui code pour le récepteur à l'EGF peut résulter de la délétion de la partie extra-membranaire et le domaine kinase intra cytoplasmique est alors actif de façon constitutive [13].

***Réarrangement structural**

Des translocations, inversions peuvent avoir pour conséquence moléculaire la formation d'un gène hybride généré par la fusion de régions codantes entraînant la synthèse de protéines chimériques non fonctionnelles.

Exemple : Les translocations t(2 ; 13)(q35 ; q14) et t(1 ; 13)(p36 ; q14) observées dans les rhabdomyosarcomes alvéolaires [14].

***Amplification génique**

Accroissement du nombre de copies du gène dans la cellule, les copies surnuméraires se trouvant alors soit sous forme de mini chromosomes surnuméraires, les chromosomes double-minute (DM), soit sous forme intégrée dans un chromosome. Cette amplification entraîne généralement une augmentation de l'expression génétique du gène [15].

***Dérégulation de l'expression**

Lors de translocations chromosomiques les proto-oncogènes, peuvent être déconnectés de leur environnement moléculaire normal et placé sous le contrôle inapproprié d'autres séquences à l'origine d'une modification de leur expression [14].

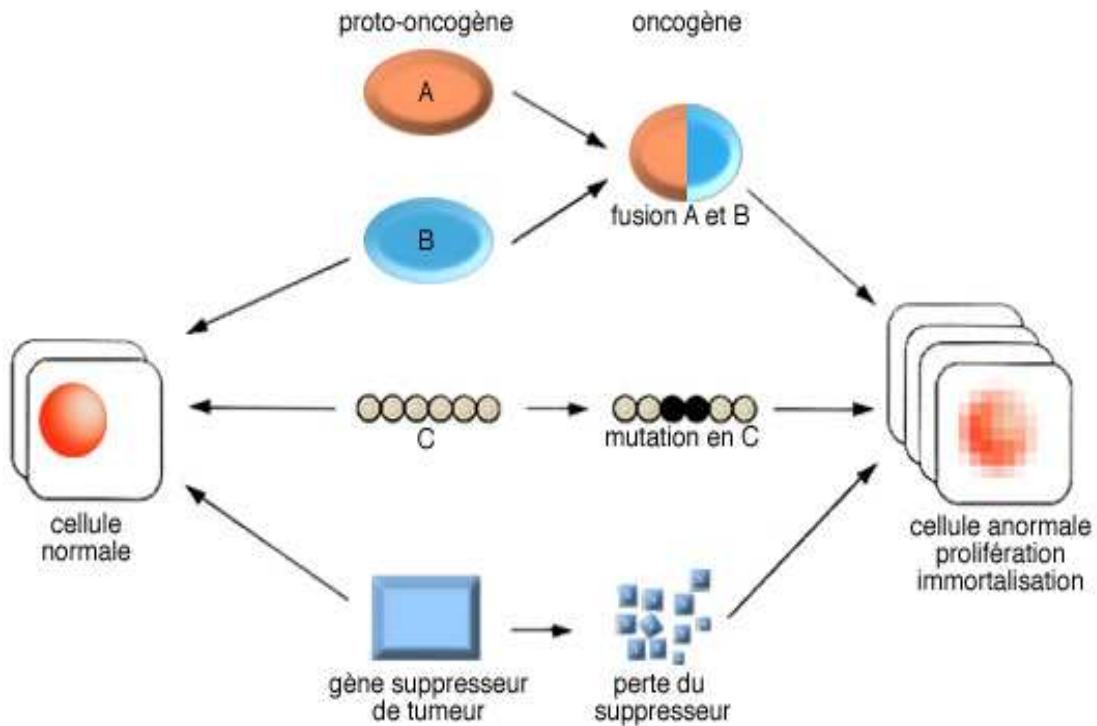


Figure 5: Interaction des proto-oncogènes avec la cellule normale [16]

***Altérations des gènes suppresseurs de tumeurs**

Survient soit sous forme de mutations ponctuelles, de délétions, d'insertions, d'anomalies de méthylation des promoteurs inhibant la transcription soit par altération de la voie biologique contrôlant le cycle cellulaire au niveau de la transition G1/S et passant par les gènes suppresseurs p53, p16 et RB (Figure 5). Le mélanome malin familial peut résulter de mutations constitutionnelles de p16 ou de CDK et les mutations somatiques de p16 sont très fréquemment retrouvées dans les tumeurs solides. Les mutations somatiques de p53 représentent l'altération moléculaire la plus fréquemment observée dans les tumeurs solides et les mutations constitutionnelles de ce gène constituent la base moléculaire du syndrome de Li-Fraumeni, syndrome prédisposant à un très large spectre de tumeurs incluant en particulier des sarcomes des tissus mous, des ostéosarcomes, des tumeurs du système nerveux central, des cancers du sein et des corticosurrénales [17].

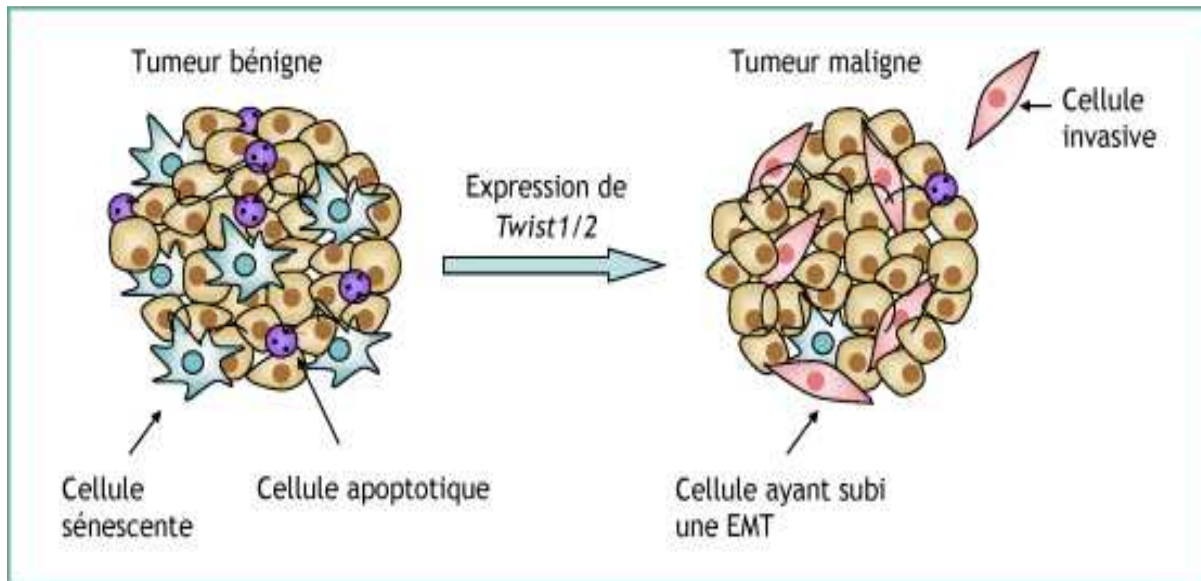


Figure 6: Processus de malignisation des tumeurs [18]

I.2.2.3. Anomalies métaboliques

L'utilisation de la voie glycolytique pour la production d'ATP par les cellules cancéreuses représente l'anomalie la plus fréquente. Bien que la capacité glycolytique des cellules cancéreuses soit en règle générale supérieure à celle des cellules normales, il n'est pas pour autant permis d'établir une relation de cause à effet entre l'accroissement de la glycolyse intracellulaire et l'état cellulaire cancéreux [19].

Les cellules cancéreuses ont une propension à sécréter des facteurs de croissance et des protéases. Elles produisent également davantage de polyamines que les cellules normales. Ces molécules sont indispensables à la prolifération cellulaire et dérivent de la décarboxylation de l'ornithine en présence d'ornithine décarboxylase (ODC) : l'activité ODC est accrue dans les cellules cancéreuses. Cette enzyme est codée par un proto-oncogène situé dans l'espèce humaine sur les chromosomes 2 et 7. Le gène de l'ODC est situé à proximité immédiate d'un autre proto-oncogène, le N-myc. Les cellules malignes peuvent également acquérir une résistance à certaines drogues anti tumorales (cytostatiques à noyau aromatique hydrophobique), par l'intermédiaire de protéines transmembranaires du plasmolème comme par exemple la P-gp (Permeability glycoprotein). Cette protéine est responsable de ce que l'on

appelle la « MultiDrug Resistance » (MDR). Dans l'espèce humaine, les 2 gènes MDR1 et MDR2 sont également situés sur le chromosome 7 [18].

I.2.2.4. Comportement in vitro

a-Immortalité

Les cellules cancéreuses contrairement aux cellules normales peuvent proliférer et donc être cultivées de façon indéfinie. Cette immortalité serait due, d'une part à la défaillance de systèmes de contrôle du cycle cellulaire, d'autre part à la présence d'une enzyme spécifique aux cellules cancéreuses, la télomérase [20].

b-Présence de télomérase

In vitro, la prolifération de cellules embryonnaires humaines normales n'excède pas en moyenne 50 divisions. Les cellules présentent des signes de sénescence puis normalement meurent. Au bout d'un certain nombre de cycles cellulaires, des cellules vont entrer en apoptose, mais d'autres vont résister, et devenir immortelles. Elles se diviseront alors à l'infini [19].

Dans une population cellulaire normale, il existe donc un « compteur de cycles » dénombrant les divisions cellulaires. Ce « compte-tour » est situé au niveau des télomères des chromosomes. Ces fragments d'ADN vont au cours de chaque phase S (réplication) se raccourcir. Après un certain nombre de divisions (environ 50), les télomères devenus trop courts vont envoyer un message induisant les cellules à entrer en sénescence. Si les cellules n'entrent pas en sénescence, un dernier raccourcissement des télomères déclenchera un chaos chromosomique (chromosomes fusionnés, disloqués...) fatal à la cellule normale. [20]

Mais, contrairement aux cellules normales, les cellules cancéreuses restaurent à chaque tour de cycle leurs fragments d'ADN télomérique détruits. Cette « maintenance » des télomères est due à la présence d'une enzyme: la télomérase. Cette enzyme qui est présente dans la quasi-totalité des cellules cancéreuses est par contre absente de la majorité des cellules normales.

L'immortalité des cellules cancéreuses serait due en grande partie à la présence de cette enzyme (**Figure 7**). La télomérase constitue sans nul doute une cible de première importance pour ce qui est du traitement du cancer [17].

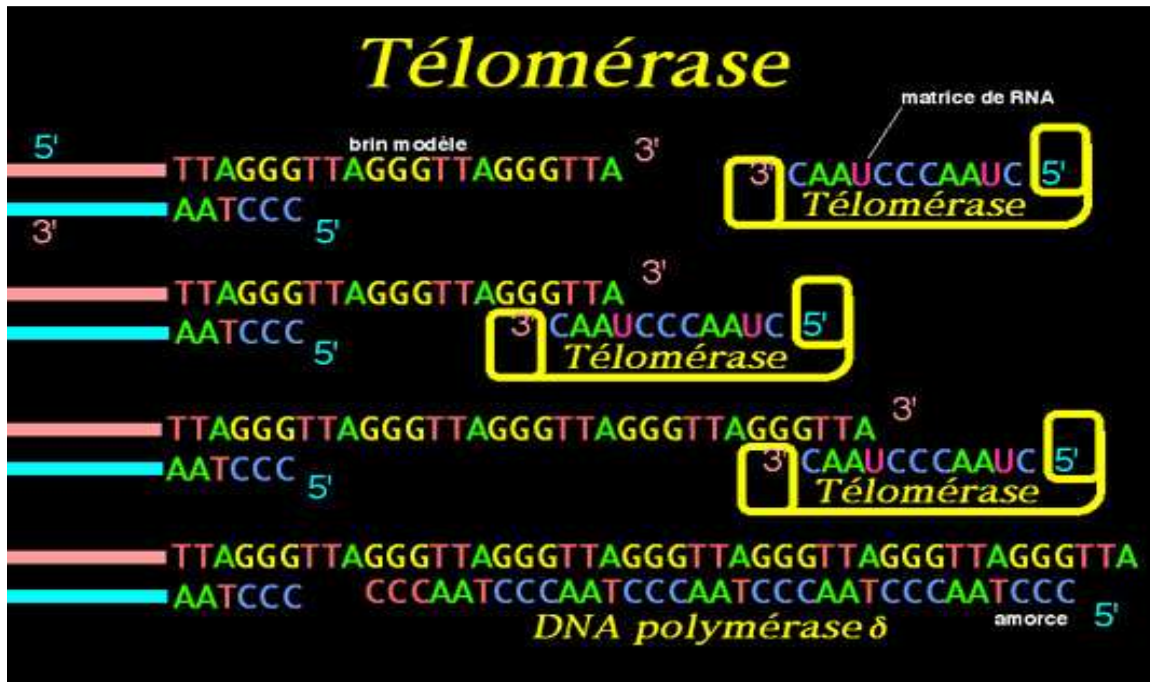


Figure 7: Structure de la Télomérase [21]

c-Réduction des besoins en facteurs de croissance

Les cellules cancéreuses sont moins dépendantes que les cellules normales de l'apport en facteur de croissance. Ceci peut au moins en partie s'expliquer par l'existence de perturbations au niveau des systèmes de signalisation intracellulaire. À l'état normal, nombre de proto-oncogènes codent pour des protéines normales participant à la transduction de messages d'origine extracellulaire capables de stimuler/inhiber la prolifération cellulaire (via des récepteurs membranaires spécifiques). À l'état cancéreux, la mutation d'un proto-oncogène (oncogène) peut provoquer l'activation continue d'une voie métabolique de prolifération cellulaire. En cas de cancer, il existera ainsi des perturbations de la cascade des signaux cytoplasmiques, et/ou de l'activité de facteurs de transcription nucléaires [22].

d-Prolifération indépendante de l'ancrage, perte de l'inhibition de contact

Dans les tissus normaux, les cellules adhèrent les unes aux autres ainsi qu'à la matrice extracellulaire. C'est le cas des épithéliums, siège de la majorité des cancers. Des molécules assurant l'adhérence intercellulaire par l'intermédiaire de jonctions non communicantes,

maintiennent les cellules à leur place. En cas de cancer, ces molécules sont absentes et/ou anormales. Dans de nombreux types de carcinomes, une molécule d'adhérence cellulaire nommée Cadherine-E, est partiellement ou totalement absente de la surface des cellules cancéreuses. On sait de plus que dans des lignées cellulaires exprimant peu la Cadherine-E, les cellules sont d'autant plus malignes que l'expression de cette protéine à la surface des cellules est faible ; inversement, le caractère invasif de lignées cellulaires cancéreuses peut être supprimé en transférant dans ces cellules le gène codant pour la Cadherine-E. Enfin, des mutations du gène codant pour cette glycoprotéine d'adhérence (Cadherine-E) sont observées dans nombre de carcinomes humains [23].

L'adhérence à la matrice extracellulaire permet aux cellules normales de survivre et de proliférer. Les cellules normales ne peuvent se multiplier *in vitro* qu'en adhérant à une surface « solide ». Cet ancrage est en grande partie assuré par des glycoprotéines transmembranaires du plasmolemme qui se lient à la matrice extracellulaire: les intégrines. Des cellules normales « libres », à qui on ne fournit pas de support solide, cessent ainsi de croître, parce que l'activité de protéines nucléaires commandant la croissance et la division cellulaire (ex: complexe cycline E-CDK2, Cf. « Cycle Cellulaire ») diminue quand les cellules ne disposent pas d'ancrage. Dans ces conditions de « non-ancrage », de nombreux types cellulaires entrent en apoptose. Les cellules cancéreuses n'ont pas besoin d'être ancrées pour survivre et proliférer, leur complexe cycline E-CDK2 reste en effet continuellement actif, qu'elles soient ancrées ou non [22].

e-Rôle des intégrines

Les intégrines sont des récepteurs de nature glycoprotéique qui se lient à des composants de la matrice extracellulaire. Leurs fonctions sont essentielles pour la migration cellulaire. Elles régulent des voies de signalisation qui contrôlent l'organisation du squelette et la survie cellulaire. Mais elles sont également impliquées dans l'activation de protéases qui dégradent les membranes basales des tissus. À ce titre, elles peuvent intervenir directement sur les processus de dissémination et d'invasion tumorale. Ainsi, certaines intégrines sont surexprimées dans certains cancers, alors que d'autres sont diminuées dans d'autres cancers.

Les intégrines peuvent également acquérir une affinité accrue vis-à-vis de leur ligand, ce qui facilite la migration de cellules tumorales. Dans le même temps en activant leurs voies de survie, les intégrines protègent de l'apoptose les cellules en migration [21].

f-Résistance à l'apoptose

À l'état normal les cellules endommagées ou dérégulées possèdent un système de sauvegarde vis-à-vis de l'organisme, système capable de provoquer leur « suicide » ou apoptose. Ainsi, des lésions irréparables de l'ADN, l'activation d'un oncogène ou encore l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeurs déclenchent l'apoptose, ce qui élimine un risque potentiel pour l'organisme. Les tumeurs apparaissant dans les tissus pourraient provenir des rares cellules génétiquement anormales ayant échappé à l'apoptose.

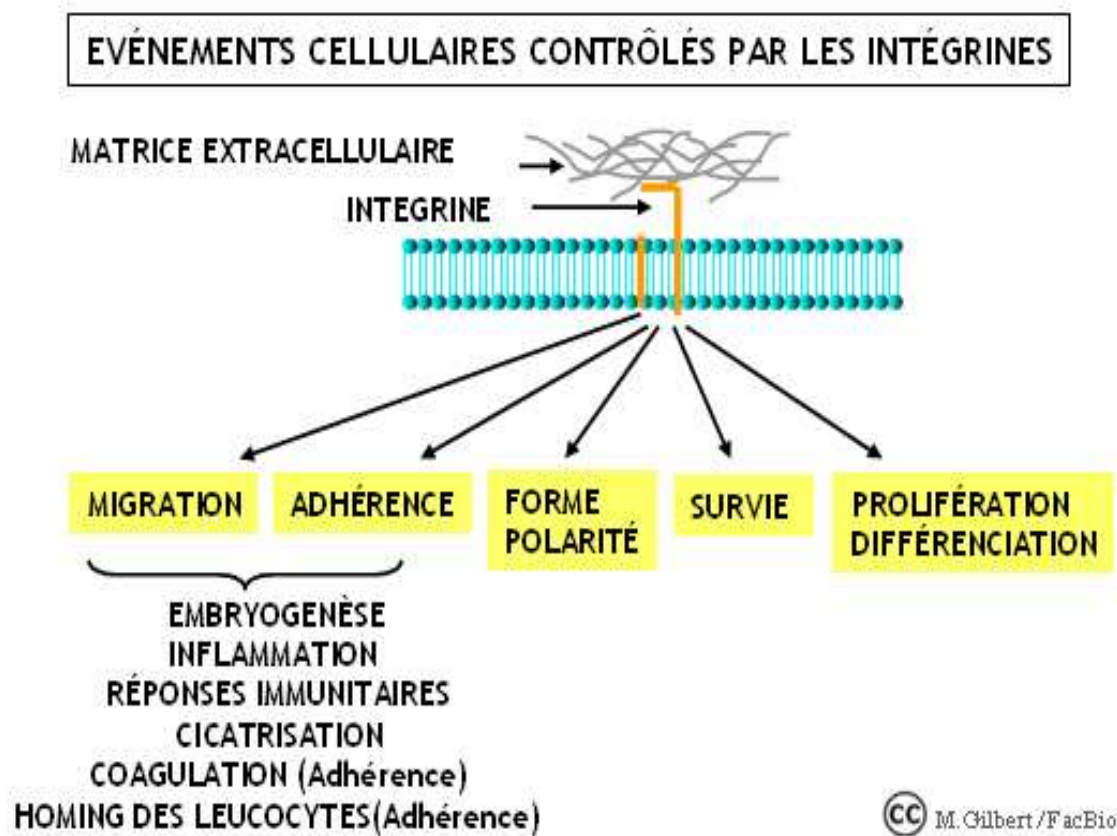


Figure 8: Rôles des intégrines [23]

L'inactivation de la protéine p53 (un acteur important du déclenchement de l'apoptose, de même que la production excessive de protéine Bcl-2 (qui bloque le suicide cellulaire confèrent aux cellules cancéreuses une résistance à l'apoptose. Des traitements restaurant l'apoptose des cellules cancéreuses devraient constituer dans l'avenir de nouvelles armes thérapeutiques anticancéreuses [22].

I.3. Perturbation de la division cellulaire et cancer

Des progrès considérables ont été accomplis dans l'identification et l'analyse des signaux qui stimulent ou au contraire freinent la division cellulaire. Parmi les gènes qui stimulent la division cellulaire figurent les gènes appelés « proto oncogènes ». Le premier oncogène humain a été identifié en 1981, il appartient à la famille ras, ce sont des protéines membranaires impliquées dans des voies de signalisation et dans la stimulation de la prolifération [24].

En 20 ans, plusieurs centaines d'oncogènes ont été isolés et la liste n'est pas close. L'action des oncogènes est dominante : une mutation sur une seule copie du gène suffit à déclencher une division cellulaire anormale.

Ces gènes jouent un rôle majeur dans la synthèse des protéines qui transmettent à la cellule le signal signifiant qu'elle doit se diviser. Ces protéines sont présentes à la surface des membranes, dans le cytoplasme ou encore dans le noyau où elles contrôlent la transcription des gènes. Dans les conditions normales, elles sont activées de manière transitoire puis inactivées après avoir transmis le signal. Lorsque ces protéines sont activées de manière permanente, elles transmettent, en dehors de toute régulation, le signal de division cellulaire.

Mais la stimulation incontrôlée de la prolifération ne suffit pas à rendre la cellule cancéreuse, il faut aussi que le système de régulation négative de la division cellulaire soit altéré. Ceci concerne l'autre ensemble de gènes impliqués dans la cancérisation : les gènes suppresseurs de tumeurs. Contrairement à la situation des oncogènes, ces gènes ont une action dite récessive, c'est-à-dire que les deux copies du gène doivent être mutées pour qu'il n'y ait plus la fonction de frein à la division cellulaire. Le plus connu, le gène p53, est muté dans 70 % des cancers humains [23].

Le génie génétique et le programme de décryptage du génome ont accéléré l'identification des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs. La description des acteurs de la régulation est certes utile, mais on ne peut en rester là. Le plus important est de comprendre la fonction précise de ces gènes, de caractériser les protéines pour lesquelles ils codent et surtout, d'identifier les réseaux de régulation de ces gènes [25].

Les connaissances acquises permettent d'ores et déjà de fonder sur des bases objectives des protocoles thérapeutiques qui visent à gêner les cellules tumorales dans leur développement.

L'objectif aujourd'hui est donc de comprendre au mieux les mécanismes particuliers de prolifération des cellules cancéreuses pour permettre la découverte de nouveaux traitements plus spécifiques. L'efficacité de ces nouvelles stratégies n'est pas encore toujours totalement établie, mais il est clair qu'elle dépendra de la connaissance des différents niveaux de régulation cellulaire et de leurs interactions [24].

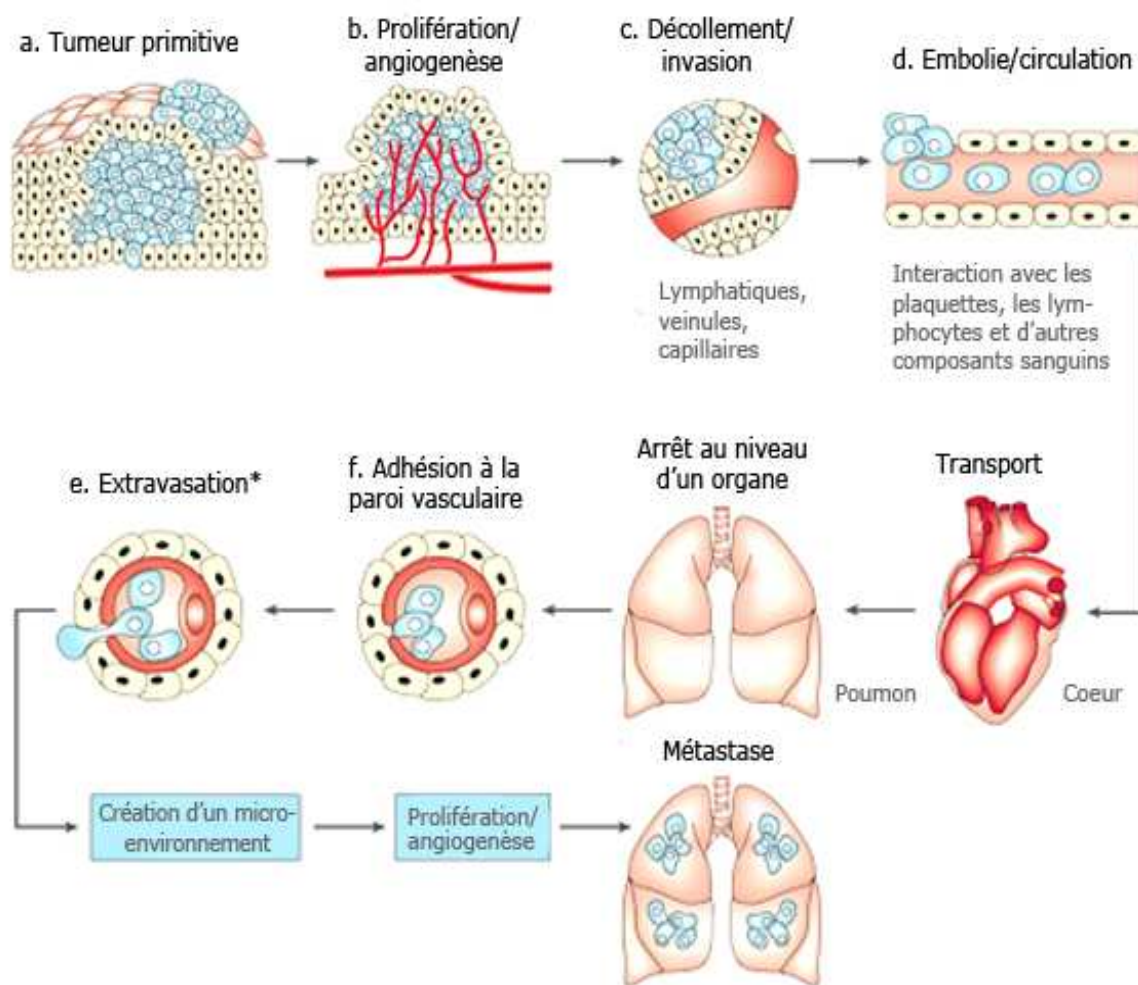
I.3.1. La mort cellulaire programmée

Il existe deux formes de mort cellulaire. Une agression très violente provoque une lyse appelée nécrose. Dans les autres situations, la mort cellulaire est génétiquement contrôlée. L'apoptose, qui dépend de l'activation des caspases. Toutes les nuances ont été observées entre apoptose et nécrose, incluant une apoptose indépendante des caspases et une apoptose abortive se terminant en nécrose. Un autre processus génétiquement contrôlé, l'autophagie, contribue à la mort cellulaire au cours du développement ou en réponse à certaines agressions. Enfin, la sénescence est un arrêt irréversible de la prolifération cellulaire qui participe, avec l'apoptose, à l'élimination des cellules en voie de transformation ou exposées à des agents cytotoxiques [27].

La mort cellulaire programmée fait partie intégrante de la physiologie normale d'un organisme. Ainsi au cours des nombreuses mitoses et différenciations cellulaires qui permettront de créer un organisme à partir d'un œuf, il est en permanence nécessaire d'éliminer les cellules superflues ou potentiellement dangereuses. C'est un processus essentiel du développement intervenant à différents niveaux comme : pour la maturation des cellules lymphoïdes, pour le développement du système nerveux, pour l'attachement des cellules épithéliales [26].

La notion d'apoptose a été introduite en 1972 par Kerr, pour désigner une forme de mort cellulaire totalement différente de la nécrose, tant d'un point de vue morphologique que biochimique. L'apoptose est une réponse hautement conservée des eucaryotes unicellulaires jusqu'aux mammifères.

Une dérégulation de la mort cellulaire programmée peut être à l'origine de nombreuses pathologies. Certaines sont liées à une inhibition de l'apoptose (cancer, syndromes lymphoprolifératifs,...) alors que d'autres sont associées à une stimulation de ce phénomène (SIDA, maladies neurodégénératives, maladies auto-immunes...) [28].



*Epanchement d'un liquide organique dans les tissus, par lésions de la paroi de l'organe où il est contenu normalement

Figure 9: Principales étapes de formation des métastases [26]

L'apoptose est caractérisée par des modifications du métabolisme cellulaire. Elle peut donc être détectée par des bouleversements de la morphologie ou de l'activité biochimique de la cellule.

L'apoptose peut être déclenchée : par des signaux extracellulaires comme par le Tnf (tumor necrosis factor) et la famille des récepteurs Fas, par les immunoglobulines fixatrices de surface, par un problème d'adhésion cellulaire au substrat, par des perturbations intracellulaires comme une modification de la perméabilité des membranes mitochondriales ou par l'activation des systèmes de contrôle des dommages intracellulaires [29].

I.3.1.1. Voie intrinsèque de l'apoptose

La voie intrinsèque fait intervenir des protéases appelées caspases, les protéines de la famille Bcl-2 et la molécule adaptatrice Apaf-1. Elle s'organise autour de la mitochondrie.

a-Les caspases (cysteinyl aspartate-specific proteinases)

***Structure et activation**

Les caspases sont des enzymes protéolytiques impliquées dans les modifications phénotypiques caractéristiques de l'apoptose. Elles sont au nombre de 12 chez l'homme.

Toutes les caspases ont une structure très conservée comprenant, un prodomaine N-terminal de taille variable, un domaine qui deviendra après clivage la grande sous-unité (17-21 kDa, qui porte le centre actif) et un domaine qui deviendra après clivage la petite sous-unité (10-14 kDa). En fonction de la taille de leur prodomaine les caspases sont regroupées sous le nom de, caspases effectrices (caspases à petit prodomaine, caspases 3, 6 et 7) qui vont cliver les protéines intracellulaires, ou caspases initiatrices (caspases 8, 9 et 10) qui activent les caspases protéolytiques.

Les caspases initiatrices contiennent des motifs d'interaction protéine/protéine : les DED (death effector domain) ou CARED (caspases recruitment domain). Les caspases fonctionnent alors en cascade protéolytique. Il existe un troisième groupe, comprenant les caspases 1, 4 et 5 qui sont plus impliquées dans la maturation des cytokines (IL-1, IL-8). [29]

Les caspases sont synthétisées sous forme zymogène, appelée pro-caspases, la conversion en une enzyme mature nécessite au moins deux clivages au niveau de liaison Asp-X.

La spécificité des caspases pour leur substrat est déterminée par la nature des quatre résidus en position C-terminale par rapport à l'aspartate du site de clivage [25].

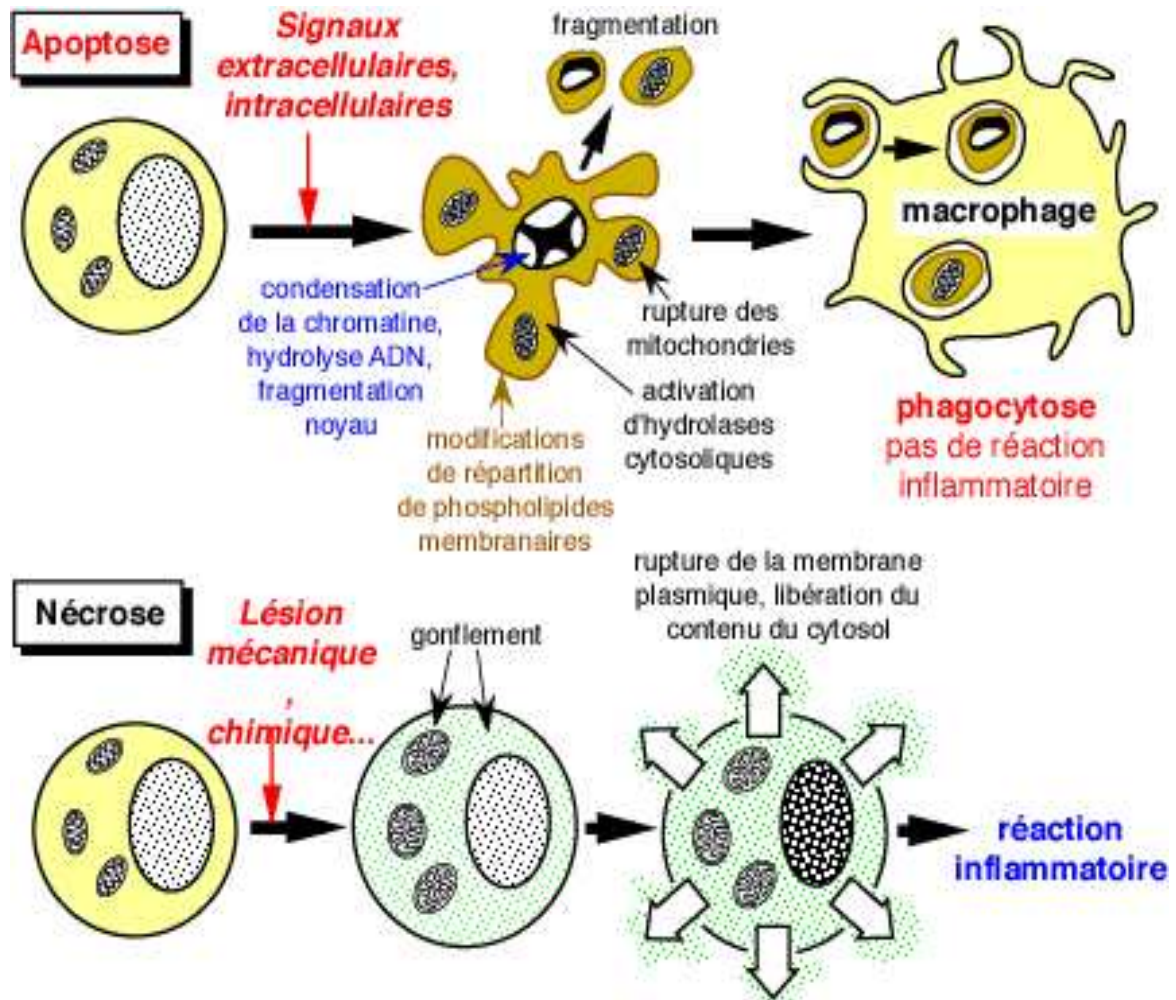


Figure 10: Différence entre apoptose et nécrose [30]

*Rôles des caspases

Le rôle des caspases est principalement exécutif, c'est-à-dire qu'elles vont s'attacher à éteindre les voies protectrices et à activer des molécules qui vont participer à la destruction cellulaire. Les caspases sont des enzymes extrêmement sélectives. Les

protéines cibles doivent impérativement posséder un aspartate en position P1. Les protéines cibles regroupent des protéines :

-Cytoplasmiques (Gelsoline, Gas-2, Fodrine, β -Caténine, Cytokératine 18).

-Nucléaires (SRF, Lamine A et B1, NuMA, mdm2).

-Impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN (PARP, DNA-PKcs, Topo-isomérase I).

-Kinases (PKC δ , PKC τ , PKC-related kinase, PKN, Pak 2, Mst 1 kinase, Mst 2 kinase, FAK, Fyn, MEKK-1, Wee1 kinase).

-Impliquées dans la transduction du signal et dans l'expression de gènes (Prointerleukine 1 β , 16 et 18, PP2A, Phospholipase A2, Stat 1, NF κ B, I κ B, Calpastatine)

-Impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et de la prolifération (p21, p27, pRb).

-Impliquées dans les maladies génétiques (Huntington, Préséniline-1 et 2)

-De régulation de l'apoptose (Bcl-2, Bcl-XI, FLIP, Bid, Bax, ICAD) [31].

***La mitochondrie au cœur de la machinerie**

La mitochondrie, depuis longtemps identifiée comme l'organite indispensable à la production d'ATP, a été plus récemment également impliquée dans la régulation des mécanismes moléculaires de mort cellulaire.

En effet, dans une cellule engagée dans un processus de mort cellulaire, on observe une perméabilisation des membranes mitochondriales, à l'origine de la libération de protéines pro-apoptotiques de l'espace inter-membranaire vers le cytosol, accompagnée dans la plupart des cas d'une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial. Le mécanisme précis de cette perméabilisation membranaire reste encore très controversé [32].

Plusieurs modèles sont proposés et pourraient coexister: Une des hypothèses postule l'ouverture d'un mégapore mitochondrial appelé PTPC (permeability transition pore complex), complexe multi protéique composé en majorité de la porine de la membrane mitochondriale externe (aussi appelé VDAC, voltage dépendent anion channel), et d'un « translocateur » de nucléotides à adénine (ANT), inséré dans la

membrane mitochondriale interne. Selon ce modèle, des protéines proapoptotiques (telle que Bax), en s'associant au PTPC, favoriseraient son ouverture, provoquant ainsi un gonflement de la matrice mitochondriale (dû à une entrée d'eau et de solutés provoquée par une hyperosmolarité de la matrice). Lors de cette expansion, l'excédent de surface de la membrane interne par rapport à la membrane externe provoquerait une rupture mécanique de cette dernière [31].

Un autre modèle suppose un dysfonctionnement de l'échange ATP/ADP mitochondrial lié à la fermeture de VDAC, provoquant une accumulation de protons dans l'espace inter membranaire, responsable à la fois du gonflement de la matrice et d'une production de radicaux oxygénés. Ce modèle ne permet cependant pas d'expliquer comment une libération des protéines apoptogènes pourrait précéder la chute du potentiel de membrane.

Un dernier modèle suggère plutôt la formation d'un pore dans la membrane mitochondriale externe permettant la libération de protéines dans le cytosol sans altération physique de la mitochondrie.

La protéine proapoptotique Bax pourrait être à l'origine de la formation de ce pore, soit en interagissant directement avec des lipides, soit en s'associant au VDAC ou bien encore par auto oligomérisation ou formation d'oligomères avec un autre membre de la même famille [30].

-Les protéines ainsi libérées sont maintenant regroupées sous le nom générique de SIMP (soluble inter membrane mitochondrial proteins) et possèdent toutes une activité proapoptotique.

-Une première classe de SIMP agit sur la voie classique d'apoptose dépendante des caspases. On y distingue des pro-caspases, le cytochrome c et un répresseur d'inhibiteur de caspases, la protéine Smac/DIABLO.

-Une fois libéré dans le cytosol, le cytochrome c interagit avec l'homologue de CED-4, la protéine Apaf-1 et la forme zymogène de la caspase 9, formant ainsi, en présence d'ATP, un complexe multi protéique appelé apoptosome à l'origine du clivage et donc de la formation de la forme active de la pro-caspase 9. Cette dernière activera à son tour d'autres caspases exécutrices comme les caspases 3 ou 7.

-La protéine Smac/DIABLO, quant à elle, se lie aux protéines inhibitrices de l'apoptose et les inactive [30].

I.3.1.2. Voie extrinsèque, les récepteurs de mort cellulaire

De nombreux stimuli sont capables d'induire l'apoptose. Toutefois, il existe une famille de récepteurs spécialisés dans l'induction de la mort cellulaire programmée : les récepteurs de mort. Une fois stimulés, ces récepteurs induisent l'activation des caspases. [33]

Cette voie d'activation est impliquée dans l'élimination des cellules potentiellement dangereuses pour l'organisme et notamment les lymphocytes autoréactifs. Les récepteurs de mort appartiennent à la famille des récepteurs du Facteur Nécrosant des Tumeurs (TnfR). Les TnfR peuvent promouvoir, selon le contexte cellulaire, soit la survie, soit la mort soit les deux. On peut donc citer différents types de récepteurs appartenant à cette famille : 4-1BB, O_x40, TnfRII, p75 NGFR, CD27, CD30, et CD40 sont impliqués dans la survie cellulaire. Fas (CD95/APO-1), TnfRI, DR3, Wsl-1DR4 et DR5 et DR6 sont impliqués dans la mort cellulaire. Les membres de la famille du TnfR sont des protéines transmembranaires de type I possédant dans leur domaine extracellulaire de une à six régions riches en cystéines, impliquées dans la liaison du ligand. Les récepteurs de mort possèdent dans leur partie intracellulaire une région conservée d'environ 80 acides aminés appelée domaine de mort cellulaire (DD). Le DD a été conservé au cours de l'évolution [32].

***Les ligands**

La famille des ligands du Tnf comprend une quinzaine de membres (Tnf, FasL, CD30L, Trail, Lymphotoxine,...). Ces ligands sont, en grande majorité, des protéines transmembranaires de type II, qui présentent donc leur extrémité C terminale du côté extracellulaire. Le domaine extracellulaire est composé d'environ 150 acides aminés et possèdent 20 à 25 % d'homologie avec les autres membres de la famille du Tnf. De nombreuses études ont rapporté que des stress cellulaires pouvaient induire l'expression des ligands de mort, tel que FasL et donc induire l'apoptose [33].

***Le récepteur Fas**

Le récepteur Fas (CD95/APO-1) est le récepteur de Fas ligand (FasL). Il représente le prototype des récepteurs de mort. Il est exprimé à la surface de nombreux types cellulaires. La stimulation de Fas par son ligand physiologique, ou par un anticorps anti-Fas, va induire son oligomérisation et le recrutement, par l'intermédiaire de son domaine de mort cellulaire, d'un certain nombre de protéines impliquées dans la transduction du signal apoptotique comme FADD (fas associated death domain). Certaines études suggèrent qu'il existe une connexion étroite entre prolifération cellulaire et apoptose. Ainsi la signalisation via FADD ne va pas exclusivement aboutir à la mort cellulaire, mais aussi, selon les circonstances, à la survie et la prolifération [34].

***Le récepteur TnfRI**

Le TnfRI est le récepteur de Tnf α , il se lie alors au niveau de son domaine DD avec la protéine TRADD. Celle-ci est capable aussi bien d'induire l'activation de NF-kB, que l'apoptose. TRADD active ces différentes voies en recrutant une protéine adaptatrice supplémentaire TRAF2 ou FADD.

En résumé, les complexes moléculaires associés aux récepteurs de mort induisent l'activation des caspases par l'intermédiaire des interactions du type FADD/Caspase 8 ou 10 ; TRADD/FADD/Caspase 8 ou 10 et TRADD/RIP/RAID/Caspase 2 [32].

I.3.1.3. Contrôle de l'apoptose

Pour chacune des deux voies décrites, la voie des récepteurs extracellulaire et la voie mitochondriale, conduisant à la mort de la cellule, les mécanismes d'intégration des signaux s'établissent au niveau d'un complexe multi protéique (respectivement le DISC et l'apoptosome). C'est en agissant au niveau de la formation et/ou de l'activité de ces derniers que la plupart des modulateurs de la mort cellulaire exercent leur action [35].

***Régulation transcriptionnelle des caspases**

Plusieurs observations suggèrent que la régulation de l'expression des gènes de procaspases puisse avoir une importance dans certaines conditions. Ainsi, bien que les ARNm de procaspases soient clairement détectables dans la plupart des types cellulaires les niveaux de zymogènes sont très différents d'un type cellulaire à l'autre. De plus, le niveau d'expression de ces zymogènes n'est pas statique [36].

Plusieurs régulateurs agissent au niveau de la formation du DISC les plus connus sont les FLIP. Ils contiennent deux domaines effecteurs de mort cellulaire (DED) qui vont lui permettre de se lier aux prodomaines des caspases 8 ou 10 et ainsi empêcher leur recrutement aux récepteurs de mort (notamment Fas et TnfRI). FLIP a été décrit comme pouvant protéger de l'apoptose ou induire l'apoptose selon la nature du transcrit et le type cellulaire considéré. En définitive, il apparaît que le rôle de FLIP dans la modulation de l'apoptose semble très complexe. Son effet pro ou anti-apoptotique apparaît, une fois de plus, dépendre de la nature du transcrit, du type cellulaire considéré ainsi que du niveau d'expression de chacune des isoformes [37].

***Les protéines de la famille Bcl-2**

Les membres de la famille Bcl-2 ont une importance cruciale dans la régulation des voies de signalisation de la mort cellulaire. Cette famille comprend aussi bien des protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bad, Bid, Bim, etc.) qu'anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl-xL). Elles interagissent entre elles pour former des homodimères ou des hétérodimères. Le niveau relatif de chaque protéine dans la cellule détermine sa sensibilité à un signal de mort. Par ailleurs, une grande majorité d'entre elles contiennent une partie carboxyterminale hydrophobe qui assure leur ancrage au niveau de la membrane externe mitochondriale, mais également des membranes externes du réticulum endoplasmique et du noyau. Les molécules anti-apoptotiques siègeraient au niveau de la mitochondrie tandis que les protéines pro-apoptotiques posséderaient une localisation différente (cytosol ou microtubules). A la suite d'un signal apoptotique, ces dernières s'inséreraient dans la membrane mitochondriale et induiraient sa perméabilisation [36].

***Les IAP (Inhibitor of apoptosis protein)**

L'effet protecteur des IAP est dû à leur capacité à inhiber l'activation et donc l'activité de certaines caspases. Ainsi, XIAP, cIAP-1 et cIAP-2 inhibent les caspases 3, 7 et 9 mais pas les caspases 1, 6 et 8. NAIP, pour sa part, est incapable d'inhiber les caspases 1, 3, 6, 7 ou 8. Au cours de l'apoptose, Smac/DIABLO est libérée et se lie aux IAP empêchant leur action protectrice et permettant ainsi aux caspases contenues dans l'apoptosome de s'activer.

I.3.1.4. Voie indépendante des caspases

L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des caspases a montré que les cellules peuvent mourir aussi bien par des mécanismes impliquant les caspases que par des mécanismes indépendants des caspases. Par exemple, la surexpression de Bax (membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2) conduit à l'activation des caspases et à la mort cellulaire.

Cependant, l'inhibiteur général des caspases zVAD-fmk, bien qu'étant capable d'inhiber l'activation des caspases, s'est avéré incapable d'empêcher la mort cellulaire induite par Bax. Ce type de mort cellulaire est insolite. En effet il y a, à la fois, une chute du potentiel mitochondrial, mais aussi une absence de dégradation de l'ADN ainsi qu'une perte de l'intégrité membranaire, ce dernier point étant réminiscent de la nécrose plutôt que de l'apoptose.

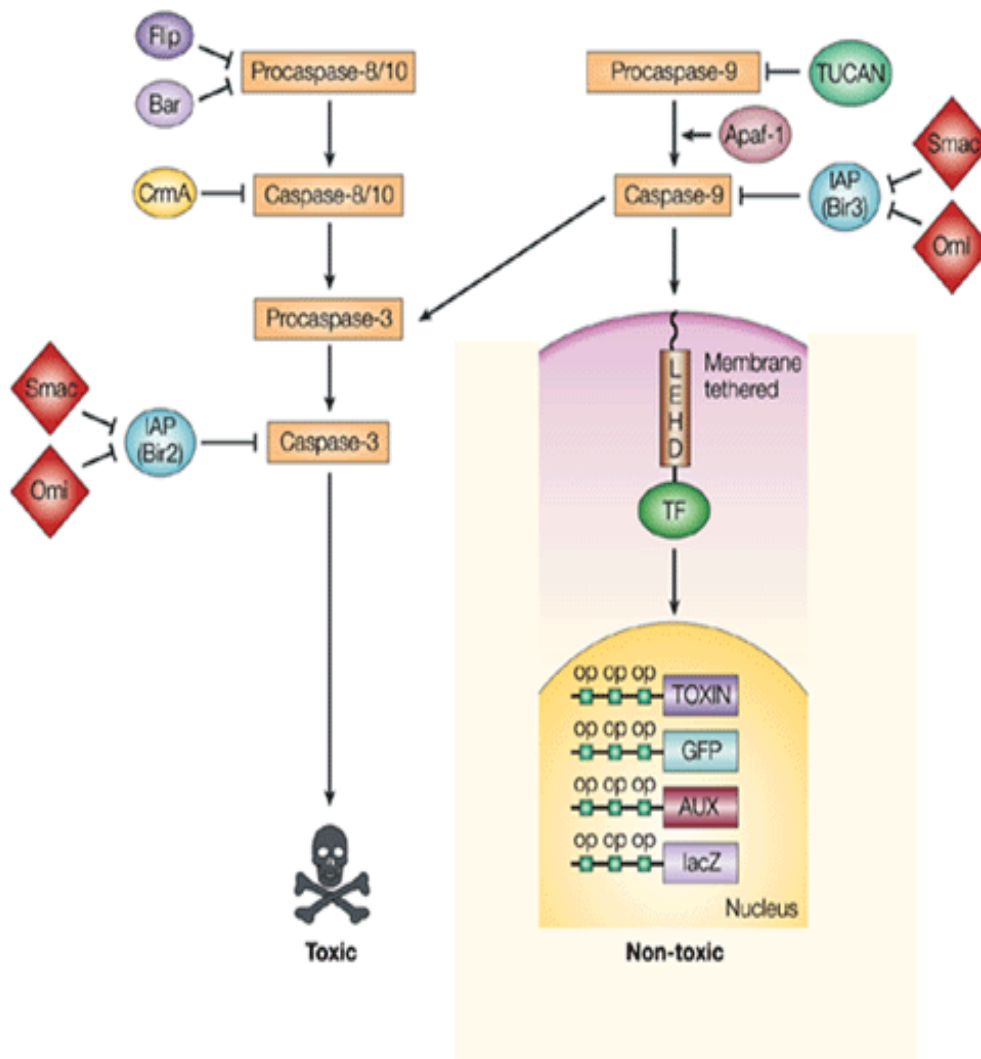


Figure 11: Mécanisme d'action des inhibiteurs de l'apoptose [38]

De nombreux stimuli, comme la surexpression des oncogènes myc, E1A ou de Bak, les dommages à l'ADN, sont également capables d'induire une mort cellulaire qui ne peut pas être bloquée par des inhibiteurs de caspases. Dans tous ces cas, les cellules meurent selon un processus proche de la nécrose, sans présenter les modifications nucléaires spécifiques de l'apoptose. Toutefois le bourgeonnement de la membrane plasmique de ces cellules est observé de la même façon qu'au cours de l'apoptose [39].



Chapitre II
TRAITEMENTS
ANTICANCEREUX
HABITUELS

Une distinction apparaît, de façon très nette dans la thérapeutique anticancéreuse moderne entre, les médicaments « classiques » qui sont tous des cytotoxiques, c'est-à-dire qui détruisent les cellules par action sur le noyau cellulaire, et une nouvelle classe de médicaments qui sont des cytostatiques qui vont freiner la croissance cellulaire en bloquant des facteurs de croissance ou des oncogènes [40].

Les médicaments cytotoxiques sont classés selon la localisation de leur activité, à savoir: les molécules qui agissent sur la réplication de l'ADN, les antimétabolites qui interviennent dans la biosynthèse des acides nucléiques et des protéines, et les molécules qui interfèrent avec le fuseau mitotique (les molécules antimitotiques vraies) [41].

Les médicaments cytotoxiques n'agissent que sur les cellules en activité métaboliques c'est-à-dire pendant une ou plusieurs phases du cycle cellulaire que chaque cellule emprunte pour se diviser. Le terme de cycle cellulaire englobe quatre phases distinctes et successives que sont la phase G1, phase post mitotique pendant laquelle la cellule prépare la synthèse de l'ADN, la phase S qui est la phase de synthèse de l'ADN, la phase G2 de pré mitose et enfin la phase M, phase de mitose, pendant laquelle la cellule mère se subdivise en deux cellules filles [42].

II.1. Médicaments cytotoxiques agissant directement sur l'ADN

II.1.1. les cytotoxiques alkylants

D'abord un peu d'histoire sur cette famille d'agents alkylants. Bien que les moutardes soufrées aient été synthétisées dès le milieu du XIXe siècle, ce n'est que pendant la Première Guerre mondiale que leur action vésicante sur la peau, les yeux et l'appareil respiratoire a attiré un intérêt médical. Le premier de ces gaz moutarde, l'hypérite (**Figure 12**), tire son nom de la ville belge d'Ypres où il a été utilisé pour la première fois au combat le 11 juillet 1917. Entre les deux guerres mondiales, d'autres agents alkylants sont développés pour donner naissance non plus à des moutardes soufrées, mais à des moutardes à l'azote dont le chef de file est la méchloréthamine. Les agents alkylants ne se limitent pas à ces moutardes à l'azote, il existe d'autres structures chimiques qui ont le même point commun quant à leur mécanisme d'action, ils deviennent de très puissants agents électrophiles par formation d'ions carbonium. De ces réactions résulte la formation de liaisons covalentes par alkylation de nombreux restes

nucléophiles tels que les groupes phosphate, amino, sulfhydryl, hydroxyl ou imidazole. Cette alkylation forme des ponts stables par liaison covalente entre les deux chaînes de l'ADN.

Cette alkylation, avec liaison covalente, se fait sur des atomes riches en électrons contenus dans les brins d'ADN, ce sont principalement O, P, N et S, et la cible principale de l'attaque nucléophile est le N-7 de la guanine, mais peut également être le N-1 ou l'O-6 de la guanine, le N-1, N-7, N-3 de l'adénosine, le N-3 de la cytosine ou l'O-4 de la thymidine. Ainsi, lors de la mitose, l'ADN ne peut plus se dédoubler, car sa structure moléculaire est altérée. Plusieurs familles sont classées dans ce groupe : les moutardes à l'azote, les alkyl sulfonates, les nitrosourées, les triazènes et les dérivés du platine [41].

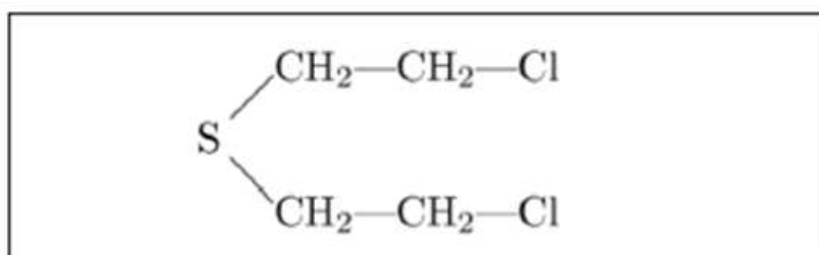


Figure 12: structures de l'hypérite

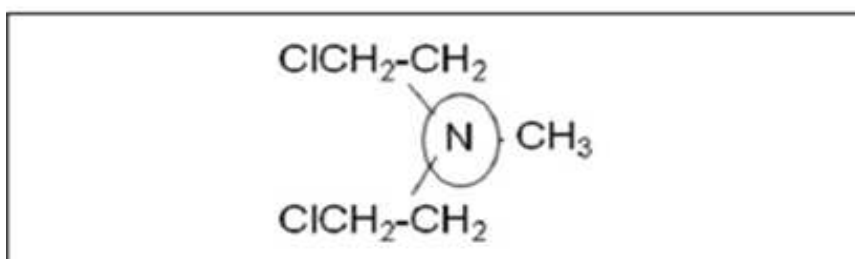


Figure 13: structures de la méchloréthamine [43]

II.1.2. les moutardes à l'azote

Les moutardes à l'azote peuvent être considérées comme les descendantes des moutardes soufrées. L'activité biologique de ces deux entités est basée sur la présence d'un groupe bis-chloroéthyl. Quelques modifications structurales de la molécule de méchloréthamine, très utilisée dans le passé, ont donné naissance à des composés possédant une meilleure spécificité et une moindre toxicité (cyclophosphamide, ifosfamide, melphalan, chlorambucil). Les deux

représentants phares de cette classe de moutarde à l'azote sont les oxazaphosphorines, cyclophosphamide (CP) et ifosfamide (IF). Tous deux sont des composés inactifs sous forme de molécule mère, ce sont des pro drogues, ils ont besoin d'être anabolisés en dérivés actifs pour leur activité thérapeutique. Cette activation se fait par l'intermédiaire de la chaîne oxydative des cytochromes P450 (CYP450) hépatiques, transformant respectivement le CP et l'IF en 4-hydroxy CP et 4-hydroxy IF et leurs tautomères, l'aldophosphamide et l'aldoifosfamide puis par réaction non enzymatique en molécules thérapeutiquement actives, la moutarde phosphoramidate pour CP et la moutarde isophosphoramidate pour IF et toxique pour le système urothélial, l'acroléine [45].

Les deux oxazaphosphorines se ressemblent beaucoup, mais diffèrent cependant dans leur métabolisme. En effet si les deux composés sont largement hydroxylés par les CYP450, ce ne sont pas les mêmes enzymes qui en sont responsables, l'hydroxylation est préférentielle par le cytochrome 2B6 pour le CP et par le cytochrome 3A4 pour l'IF avec des taux d'hydroxylation différents, de l'ordre de 90 % pour CP et moins de 50 % pour IF.

Aucun polymorphisme génétique n'est actuellement connu pour ces deux enzymes, en revanche elles sont toutes les deux inductibles. Une autre différence, d'ailleurs liée à la précédente, entre les deux oxazaphosphorines, concerne la déchloroéthylation très faible pour le CP (< 10 %) et importante pour l'IF (> 50 %) [41].

II.1.3. Les nitrosourées

Les nitrosourées se distinguent des autres agents alkylants par une forte liposolubilité, qui les rend aptes à traverser la barrière hémato encéphalique et permet leur utilisation contre les tumeurs cérébrales.

Toutes les nitrosourées ont en commun de subir une dégradation spontanée non enzymatique qui va les transformer en un ion 2-chloroéthyl carbonium réactif (**Figure 14**). Cet ion très électrophile va alkylé un certain nombre de bases de l'ADN pour former, comme pour les moutardes, des adduits avec la guanine, la cytidine ou l'adénine. Dans cette famille d'agents alkylants l'azote 7 de la guanine semble être la cible principale des nitrosourées pour former des ponts intra- ou inter caténaux. Cependant, l'alkylation sur l'oxygène de la guanine joue un rôle primordial dans l'activité thérapeutique [46].

En fait, après une attaque initiale de l'ion chloroéthyl carbonium sur l'O-6 de la guanine, formant un O-6 chloroéthyl-déoxy-guanosine, il se produit un réarrangement entre la guanosine du brin d'ADN attaqué et un résidu cytosine du bras opposé avec départ de l'atome d'halogène, la conséquence sera la formation de ponts inter caténares. La formation de ces ponts inter caténares est un mécanisme assez lent qui permet l'activation d'un système de réparases (O6-alkylguanine alkyltransférase) arrêtant la formation de ces ponts.

Ce qui est particulier avec les nitrosurées est qu'en plus de la formation des ions carbonium, il existe une dégradation spontanée de ces composés qui libère des isocyanates organiques qui fixent des groupes carbamoyl sur des résidus lysine inhibant de cette manière certaines enzymes de réparation de l'ADN [47].

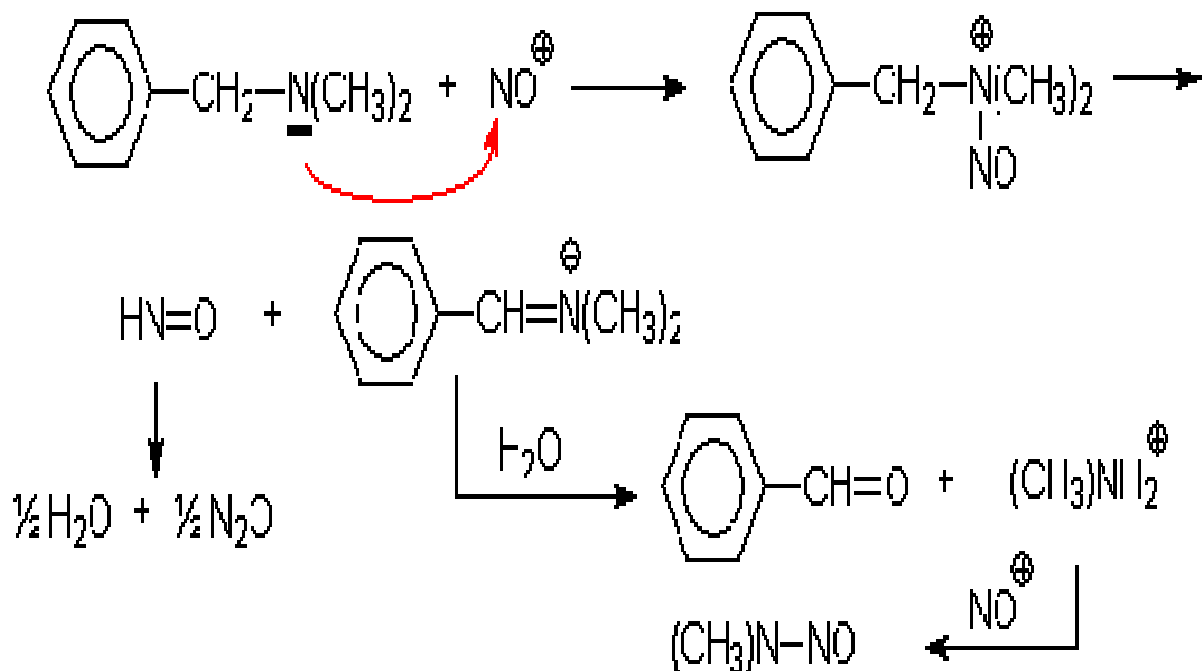


Figure 14: Métabolisation des nitrosurées [48]

II.1.4. Les dérivés du platine

Les dérivés du platine constituent à l'heure actuelle une classe majeure d'agents anticancéreux. Depuis la découverte du cisplatine, de nombreux composés de platine ont été

synthétisés et évalués en tant que cytotoxiques: le cisplatine, le carboplatine et l'oxaliplatine (**Figure 15**). Si ces molécules partagent la propriété fondamentale de former des adduits sur l'ADN, ils présentent néanmoins des différences tant pharmacocinétiques qu'au niveau de leur spectre antitumoral. Les dérivés de platine sont des agents alkylants puisqu'ils possèdent un groupement chimique pouvant former des liaisons covalentes ou adduits avec les acides nucléiques de la cellule. Ces adduits vont inhiber la réplication de l'ADN et entraîner la mort de la cellule. Les trois dérivés sont constitués d'un atome de platine lié à deux ligands, un ligand transporteur et un ligand hydrolysable, variable en fonction du dérivé. Pour le cisplatine ou cis-diaminodichloroplatine et le carboplatine, dérivés de première et deuxième génération, les ligands hydrolysables sont respectivement deux atomes de chlore et un cyclobutane dicarboxylate qui, sous l'effet de l'hydrolyse, sont remplacés par des molécules d'eau formant ainsi un composé commun, le cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ ou diaquoplatine . [49] Pour l'oxaliplatine, le ligand transporteur est le diaminocyclohexane (DACH) et le ligand hydrolysable est l'acide oxalique. L'oxaliplatine est activé par la perte du groupement oxalate qui est remplacé par deux ions chlore. L'oxaliplatine est ainsi transformé en DACH-dichloroplatine, métabolite actif. Ces composés formés par hydrolyse spontanée vont exercer leur cytotoxicité en formant des adduits sur l'ADN, plus particulièrement au niveau de l'atome N7 des bases guanine et adénine. Ces adduits peuvent être monofonctionnels (liés à une seule base) ou bi-fonctionnels (liés à deux bases). L'analyse de la structure des adduits formés par le cisplatine montre que les ponts intra-brins guanine-guanine (dGdG) représentent 60 à 65 % du platine lié avec l'ADN, les ponts adénine-guanine (dAdG) représentent 20 à 25 % et les ponts intra-brins guanine-guanine non adjacents 5 à 6 %. Les adduits restants sont constitués de diverses liaisons telles que des liaisons interbrins et des adduits monofonctionnels. Bien que les adduits formés par le carboplatine soient identiques, sa cytotoxicité est plus faible que celle du cisplatine car l'hydrolyse est plus lente. Pour l'oxaliplatine, la réactivité du DACH-platine vis-à-vis de l'ADN est largement inférieure à celle du cisplatine c'est-à-dire qu'en concentration équimolaire, l'oxaliplatine forme moins d'adduits que le cisplatine. Cependant, le potentiel cytotoxique de l'oxaliplatine est plus fort que celui du cisplatine dans de nombreuses cellules tumorales. Le groupement DACH fait saillie à l'extérieur du sillon

majeur de l'ADN et produit un adduit plus encombrant que ceux formés par le diaquoplatine [51].

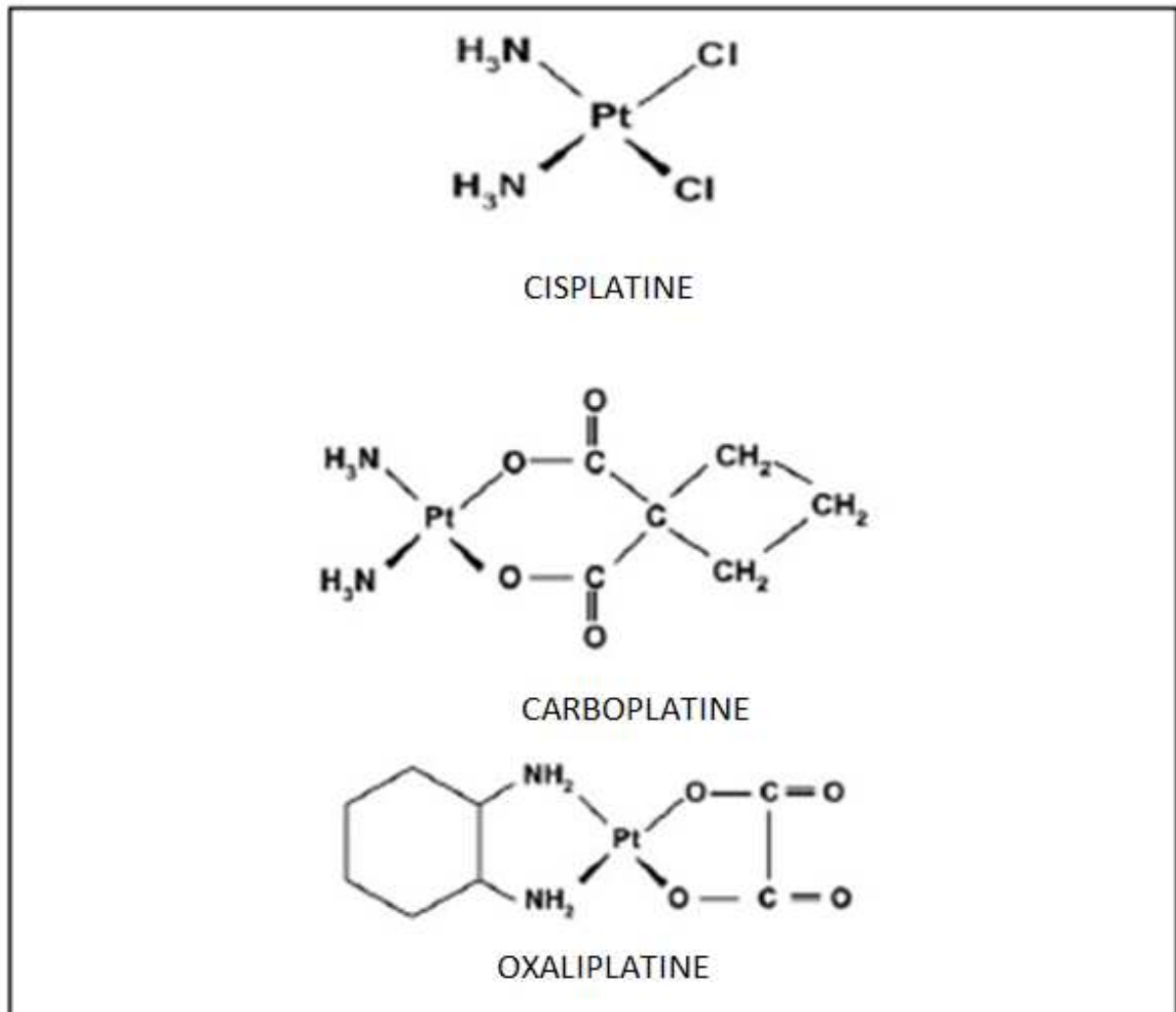


Figure 15: Structure des dérivés du platine [50]

Le positionnement du groupement cyclohexane, son encombrement, sa nature apolaire et le fait qu'il induit un rétrécissement du sillon majeur empêcheraient sa reconnaissance par les systèmes de réparation (notamment celui de réparation des mésappariements ou MMR). L'échec des chimiothérapies anticancéreuses est en partie dû à des phénomènes de résistance

intrinsèque à la tumeur et présente d'emblée ou acquise au cours du traitement. Six processus majeurs ont été répertoriés dans la résistance au cisplatine :

- 1) une diminution de l'accumulation intracellulaire de médicament
- 2) une inactivation par conjugaison avec des groupements thiols
- 3) une augmentation de la réparation de l'ADN
- 4) une modification de la fonction de certaines protéines régulatrices du cycle cellulaire
- 5) la tolérance aux lésions formées par une synthèse translésionnelle
- 6) l'altération de l'induction de la mort cellulaire (par surexpression de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou Bcl-xl) [50].

Une diminution de 20 à 70 % de la concentration en cisplatine a été observée dans les lignées cellulaires résistantes au cisplatine. Les mécanismes potentiellement impliqués dans cette diminution de l'accumulation sont les phénomènes d'influx et d'efflux notamment par les transporteurs du fer (Ctr1, ATP7B et ATP7A), mais aussi par MRP2 (ABCC2 ou cMOAT) [52].

La voie de conjugaison au glutathion intervient dans la détoxification des dérivés de platine et diminue leur cytotoxicité en inhibant la formation d'adduits à l'ADN. Des concentrations augmentées de GSH ont été observées dans des lignées cellulaires résistantes au cisplatine et dans des tumeurs issues de patients résistants au cisplatine. Les métallothionéines, qui jouent un rôle dans l'homéostasie des ions Zn^{2+} et dans les mécanismes de détoxification des métaux lourds, peuvent être impliquées dans la détoxification des dérivés de platine [57].

Les mécanismes impliqués dans la réparation des adduits de platine sur l'ADN sont majoritairement le système de réparation par excision de nucléotides (NER) qui élimine les mutations induites par des carcinogènes environnementaux et le système de réparation des mésappariements (MMR) qui répare des erreurs de réplication. Le NER répare les adduits des trois dérivés de platine et diminue donc leur cytotoxicité. Les protéines du NER comme XPA, ERCC1-XPF et XPB ont une expression plus élevée dans les tumeurs résistantes aux dérivées de platine [58].

Le MMR fonctionne différemment puisque les protéines du MMR reconnaissent les adduits formés par le cisplatine et le carboplatine sur l'ADN, mais ne permettent pas de les réparer. Tout au contraire, elles vont induire l'apoptose de la cellule et par conséquent participer à la

cytotoxicité. Aussi, les cellules déficientes en MMR (souvent lié au phénotype d'instabilité des microsatellites MSI) présentent une résistance au cisplatine et au carboplatine. L'oxaliplatine, en revanche, n'est pas reconnu par le MMR donc ce système ne contribue pas à sa cytotoxicité et peut être utilisé dans des tumeurs déficientes en MMR, comme les tumeurs colorectales dans lesquelles le cisplatine ou le carboplatine ne sont pas actifs.

Le cisplatine, le carboplatine et l'oxaliplatine ont des profils de toxicité différents, en partie expliqués par leurs propriétés pharmacocinétiques. La toxicité dose limitante du cisplatine est sa néphrotoxicité qui nécessite, avant son administration, une hyperhydratation de 2 à 3 litres qui doit être instituée 8 à 12 heures avant la première injection de cisplatine, poursuivie tant que dure l'administration du produit et au moins pendant les 24 heures suivantes. Les autres effets indésirables provoqués par le cisplatine sont : myélosuppression, ototoxicité, neuropathies, nausées et vomissements (ces derniers étant corrigés par l'utilisation de sétrons). La néphrotoxicité du cisplatine est due à son accumulation au niveau des tubules proximaux terminaux et distaux du néphron. La concentration toxique intracellulaire du platine va déclencher des phénomènes d'apoptose et de nécrose. La production de ROS (*Reactive Oxygen Species*) semble intervenir dans le déclenchement de l'apoptose, mais pas dans la nécrose [59].

L'ototoxicité du cisplatine semble être, elle aussi, provoquée par la production de ROS au niveau des cellules ciliées de la cochlée (oreille interne) qui déclenche des signaux de mort cellulaire, entraînant des déficits fonctionnels.

La toxicité dose limitante du carboplatine est la myélotoxicité et plus particulièrement la thrombocytopenie. L'anémie et la leucopénie surviennent également et sont moins sévères en monothérapie. La néphrotoxicité, l'ototoxicité et les neuropathies sont beaucoup plus rares avec le carboplatine, excepté avec les protocoles utilisant des hautes doses [58].

La toxicité de l'oxaliplatine se manifeste par des neuropathies sensorielles, notamment des paresthésies et dysesthésies apparaissant au niveau des extrémités, majorées par le froid. La sévérité de ces troubles augmente avec la dose cumulée d'oxaliplatine mais est partiellement voire complètement réversible. La physiopathologie de cette neurotoxicité implique l'oxalate, produit par hydrolyse de l'oxaliplatine, qui est un chélateur du calcium et qui va interférer avec l'ouverture des canaux calcium-dépendants. Ces canaux sont impliqués dans la

transmission du potentiel d'action des cellules excitables lors de la dépolarisation cellulaire et leur dysfonctionnement est responsable des manifestations neurotoxiques. Les autres effets indésirables de l'oxaliplatine sont hématotoxicité, nausées et vomissements [60].

II.1.5. Les cytotoxiques intercalants

II.1.5.1. Les camptothécines (inhibiteurs de topoisomérases I)

La camptothécine (**Figure 16**) est un alcaloïde naturel extrait d'un arbuste chinois le *Camptotheca acuminata*. La camptothécine est un agent cytotoxique particulièrement puissant dont l'activité clinique a été étudiée dans les années 1970.

Son développement a été arrêté en raison d'une toxicité non contrôlable à type de cystite et d'entérocolite hémorragiques. Le mécanisme original de la camptothécine (inhibiteur de topoisomérase I) a suscité de nouvelles recherches afin de contourner cette toxicité. Dans les années 1980, des dérivés plus hydrosolubles ont été synthétisés dont le topotécan et l'irinotécan. Ces dérivés de la camptothécine sont des inhibiteurs sélectifs de la topoisomérase I. Cette enzyme intervient dans le déroulement et la fragmentation transitoire de l'ADN en segments simples brins, étapes indispensables à la réplication et à la transcription de celui-ci. L'inactivation de l'enzyme par les dérivés de la camptothécine induit une stabilisation du complexe topoisomérase-I-ADN avec induction de cassure simple brin [61].

II.1.5.2. Les anthracyclines (inhibiteurs de topoisomérases II)

Les anthracyclines, que l'on appelle également antibiotiques anticancéreux, ont été initialement développées comme antibactériens, elles font partie d'une des plus importantes classes de médicaments cytotoxiques. Ces molécules sont produites par un champignon, le *Streptococcus peucetius* variété *caesius*, seule l'idarubicine est un dérivé synthétique. Bien qu'il n'existe que peu de différences structurales entre tous ces composés, la daunorubicine et l'idarubicine présentent une activité majeure dans les leucémies aiguës alors que la doxorubicine possède un spectre d'activité beaucoup plus large incluant de nombreuses tumeurs solides. Un nombre important d'effets biochimiques ont été décrits pour les anthracyclines et leurs dérivés anthracènediones. Ces composés empêchent la transcription de

l'ADN par un mécanisme d'intercalation. Ces molécules vont en effet s'insérer entre deux paires de bases consécutives de l'ADN, entraînant ainsi leur éloignement. L'ADN, ainsi déstructuré, n'est plus fonctionnel. On a longtemps cru que le phénomène d'intercalation était la base de l'activité de ces anthracyclines, en fait ce mécanisme ne permet que la stabilisation des complexes ADN-topoisomérase II-médicament. Les anthracyclines, par leur fonction quinone, génèrent également des radicaux libres à la fois dans les cellules cancéreuses, mais également dans les cellules saines. Les défenses enzymatiques telles que les superoxydes dismutases et catalases permettent de protéger les cellules de la toxicité des anthracyclines en particulier sur le myocarde. L'utilisation concomitante de chélateur de fer augmente cet effet protecteur. De plus des liposomes d'anthracyclines ont été fabriqués pour diminuer la toxicité cardiaque de cette classe de médicaments. L'exposition des cellules aux anthracyclines conduit à l'apoptose *via* la p53, l'activation des caspases mais également le système ligand-récepteur fas. Il n'est pas possible d'évoquer les mécanismes d'action des anthracyclines (**Figure 17**) sans mentionner le phénomène de *multi drug resistance* (MDR). En effet, alors que pendant longtemps il a été suggéré que l'entrée des anthracyclines dans la cellule se faisait par l'intermédiaire d'un transporteur, nous savons maintenant que cette pénétration se fait par diffusion passive de la molécule non ionisée. À l'inverse, la sortie des anthracyclines de la cellule est médiée par une protéine que l'on appelle la p170-glycoprotéine ou PgP qui est une protéine transmembranaire capable de pomper hors de la cellule de nombreuses substances anticancéreuses, de structures très différentes, telles les anthracyclines, les vincalcoïdes, les épipodophyllotoxines...C'est pourquoi lors d'une hyper expression de cette protéine, il est question du phénomène de résistance multi drogue [62].

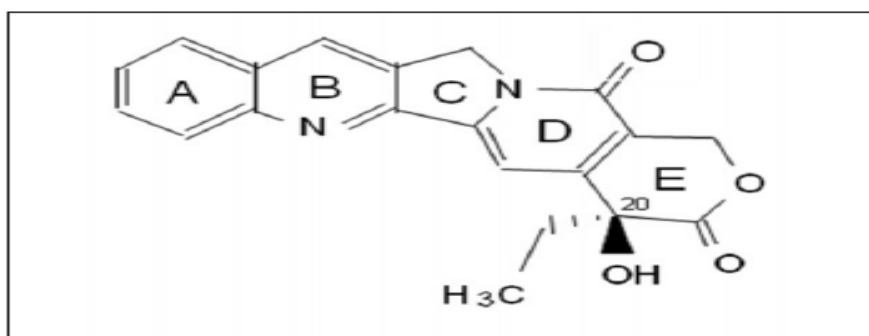


Figure 16: Structures des camptothécines [63]

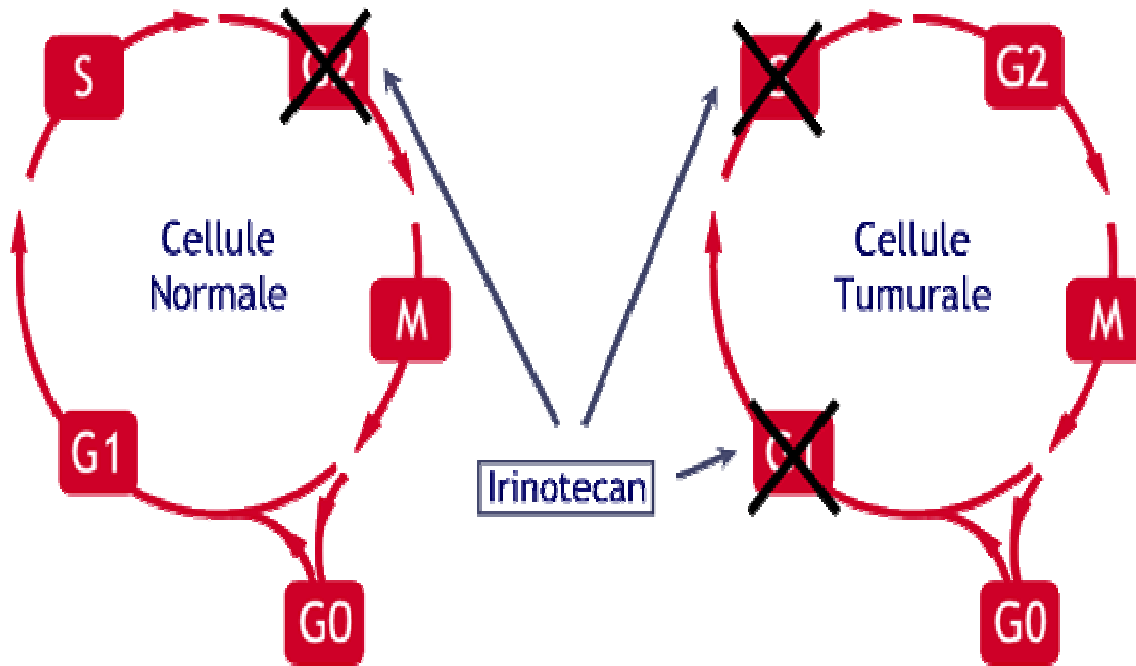


Figure 17: Arrêt du cycle cellulaire des cellules normales et tumorales en présence d'Irinotecan [64]

II.2. Médicaments cytotoxiques agissant indirectement sur l'ADN

II.2.1. Médicaments anticancéreux inhibant la synthèse de l'ADN

II.2.1.1. Les antimétabolites

Les cytotoxiques antimétabolites inhibent la synthèse des acides nucléiques (ADN et ARN), indispensables pour la multiplication et la différenciation des cellules.

Leur structure chimique est voisine de celle des composés naturels que les cellules utilisent pour synthétiser les bases azotées (purine, pyrimidine), précurseurs des acides nucléiques. Les cytotoxiques antis métabolites bloquent le fonctionnement de certaines enzymes qui interviennent dans le métabolisme cellulaire. Ce sont des produits de synthèse, ayant subi des modifications de structure qui en font une « fausse clé » bloquant la « serrure » de l'activité cellulaire. Ils sont connus et utilisés depuis la fin des années 1940. Ils se répartissent en trois classes principales, selon qu'ils interfèrent avec l'acide folique, les bases puriques ou pyrimidiques [65].

II.2.1.2. Analogues de l'acide folique

Ce furent les premiers anti-métabolites utilisés en clinique. Farber et ses collaborateurs ont montré dès 1948 que l'aminoptérine, un analogue de l'acide folique, présentait des propriétés anti-leucémiques avec mise en rémission d'enfants atteints de leucémies aiguës. Puis, petit à petit, l'utilisation des anti métabolites et en particulier du méthotrexate (MTX) (**Figure 18**) s'est étendue aux tumeurs solides, cancer du sein, cancer ORL, choriocarcinome et même à des pathologies non cancéreuses pour des propriétés immunosuppressives comme par exemple la polyarthrite rhumatoïde, la réaction du greffon contre l'hôte après greffe de moelle osseuse et le psoriasis [66].

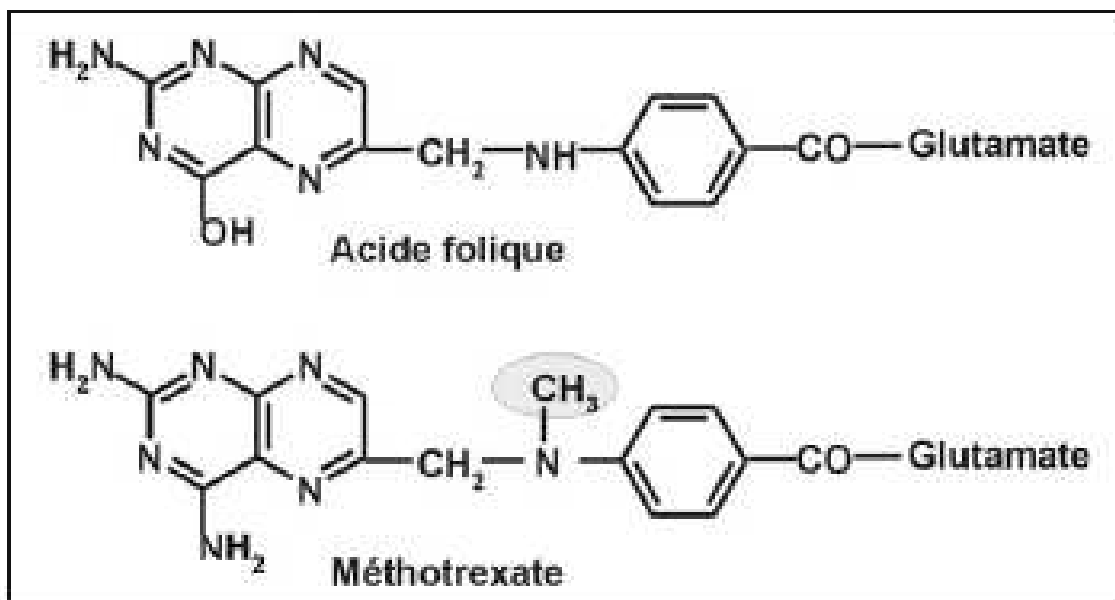


Figure 18: Structure du methotrexate comparée a celle de l'acide folique [68]

Le MTX est le chef de file des antifolates et constitue depuis un demi-siècle l'un des médicaments anticancéreux les plus utilisés en poly-chimiothérapie dans de multiples indications tumorales. Il interagit avec le cycle de l'acide folique en inhibant la dihydrofolate réductase (DHFR), enzyme responsable de la conversion de l'acide folique en folates réduits, entraînant une accumulation de forme oxydée inactive et l'arrêt de la synthèse des purines et de l'ADN. La recherche de nouveaux anti-folates s'est orientée vers la synthèse de nouveaux

médicaments inhibiteurs de la DHFR (comme le trimétrexate, l'édatrexate ou le piritrexim) ou de molécules ciblant d'autres enzymes folate-dépendantes comme la thymidilate synthétase (TS) (raltitrexed, plévitrexed, nolatrexed), la glycinamide ribonucléotide formyltransférase (GARFT) et la 5-aminoimidazole- 4-carboxamide ribonucléotide formyltransférase (AICARFT) [lométrexol, LY309887, AG2034].

Le pemetrexed, découvert au début des années 1990 au cours des études de relations structure-activité du lométrexol, est actuellement le seul antifolate ciblant plusieurs enzymes impliquées dans la synthèse des purines et des pyrimidines. Lors de son développement clinique, il a présenté un large spectre d'action, avec une activité antitumorale intéressante dans les cancers des voies aérodigestives supérieures (**Figure 19**). Ainsi que du côlon, du sein, du poumon non à petites cellules et dans le mésothéliome pleural. Le pemetrexed ou acide L-glutamique, N-[4-[2-(2-amino-4,7-dihydro-4-oxy-1H-pyrrolo [2,3-d] pyrimidine-5-yl) éthyl] benzoyl] possède deux particularités structurales par rapport au MTX : l'azote benzylique est remplacé par un chaînon méthylène, et un cycle pyrrole se substitue au cycle pyrazine du noyau ptéridine de l'acide folique [67].

La modification au niveau de la charnière centrale avait été proposée pour le lométrexol, analogue direct du MTX. La structure du pemetrexed avait été choisie pour pallier un problème de synthèse du lométrexol. Le remplacement du cycle à 6 atomes par un cycle à 5 atomes renforce l'activité antifolate du produit. Le pemetrexed inhibe plusieurs enzymes impliquées dans la synthèse des purines et des pyrimidines, en particulier la TS, la DHFR, la GARFT et l'AICARFT [69].

Le pemetrexed inhibe principalement la TS, enzyme responsable de la transformation par méthylation de la désoxyuridine monophosphate (dUMP) en thymidine monophosphate (dTMP), précurseur direct du nucléotide thymidine triphosphate (dTTP) incorporé dans l'ADN. Mais il agit sur les trois enzymes (GARFT, TS et DHFR), car c'est un antagoniste du folate réduit ou 5,10-méthylène tétrahydrofolate, cofacteur de ces trois enzymes. Le pemetrexed pénètre dans la cellule grâce à deux systèmes de transport : les protéines membranaires transporteuses des folates et le système de transport des folates réduits. Le *reduced folate carrier* (RFC) est le transporteur bidirectionnel majeur du pemetrexed. L'affinité de ce dernier pour le RFC est deux fois plus importante que celle du MTX. En

outre, le pemetrexed est un substrat de choix, d'affinité supérieure à celle des folates, au récepteur des folates, ce qui entraîne son entrée dans la cellule et son internalisation sous forme de vésicules d'endocytose. Enfin, le transporteur à pH optimal bas joue un rôle mineur dans son internalisation. L'efflux du pemetrexed est également assuré par les protéines de résistance multiple de type *multidrug resistance proteins* (MRP). Une fois dans la cellule, le pemetrexed est transformé en formes poly glutamates par la foylpolylglutamate synthétase (FPGS). Cette polyglutamylation de la molécule (pemetrexed-[cglu] n) par la FPGS potentialise considérablement son action anti-TS et anti-GARFT, mais ne change pas l'activité anti-DHFR. De plus, la forme polyglutamate, fortement polarisée, facilite sa rétention intracellulaire. Des taux intracellulaires élevés en pemetrexed (cglu) 5 inhiberaient d'autres enzymes normalement peu sensibles au pemetrexed non glutamylé, telles que la C1-tétrahydrofolate synthétase et l'AICARFT [70].

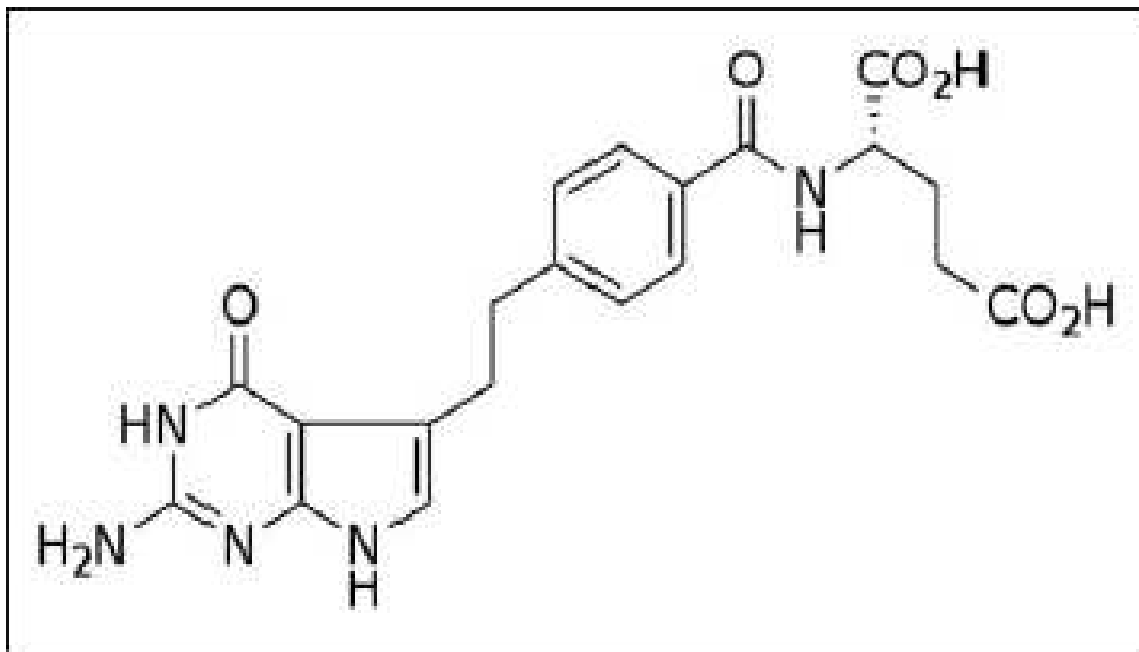


Figure 19: Structure du pemetrexed [71]

L'inhibition conjointe de multiples enzymes se traduit par des perturbations majeures et irréversibles du stock intracellulaire de folates réduits. La forme pentaglutamate (pemetrexed-[cglu] 5) est à l'origine de l'efficacité du pemetrexed et pourrait être considérée comme une pro drogue à l'origine des métabolites polyglutamylés, responsables de l'action cytotoxique.

La très forte affinité du pemetrexed vis-à-vis de la FPGS rend la polyglutamylation du pemetrexed (**Figure 20**) 90 à 195 fois plus efficace que celle du MTX et donnerait à cette molécule un avantage thérapeutique important par rapport aux autres antifolates. Après l'action du pemetrexed, il existe une chute importante du taux de dTTP associée à une disparition, concomitante du dCTP (désoxycytidine triphosphate) et du dGTP (désoxyguanosine triphosphate), et à une augmentation du taux de d'ATP (désoxyadénosine triphosphate) [72].

La déplétion en dTTP lève l'inhibition de la dCMP (désoxycytidine monophosphate) désaminase. N'étant plus inhibée, la dCMP désaminase joue pleinement son rôle, convertit la dCMP en dUMP et induit ainsi une perte en dCTP. Dans le même temps, la déplétion en dTTP réduit l'activation de la ribonucléoside diphosphate réductase, enzyme responsable de la transformation du GDP (guanosine diphosphate) en dGDP (désoxyguanosine diphosphate). L'inhibition de la GARFT observée uniquement avec le pemetrexed serait une cause non encore élucidée de l'augmentation du d'ATP. Le mécanisme d'action particulier du pemetrexed a un effet très caractéristique sur le cycle cellulaire. Avant d'induire l'apoptose, il synchronise une population de cellules leucémiques lymphocytaires (CCRF-CEM) à l'interface G1/S. Celles-ci entrent ensemble en phase S tout en préservant leur aptitude à incorporer un précurseur nucléosidique dans la chaîne d'acide nucléique en formation. Cet effet atypique de synchronisation cellulaire a été observé avec le pemetrexed et le raltitrexed, antifolate inhibiteur de TS, mais non pas avec les antifolates sélectifs de la GARFT. En outre, l'expression de l'ARN des enzymes cibles est liée à la toxicité du pemetrexed [73].

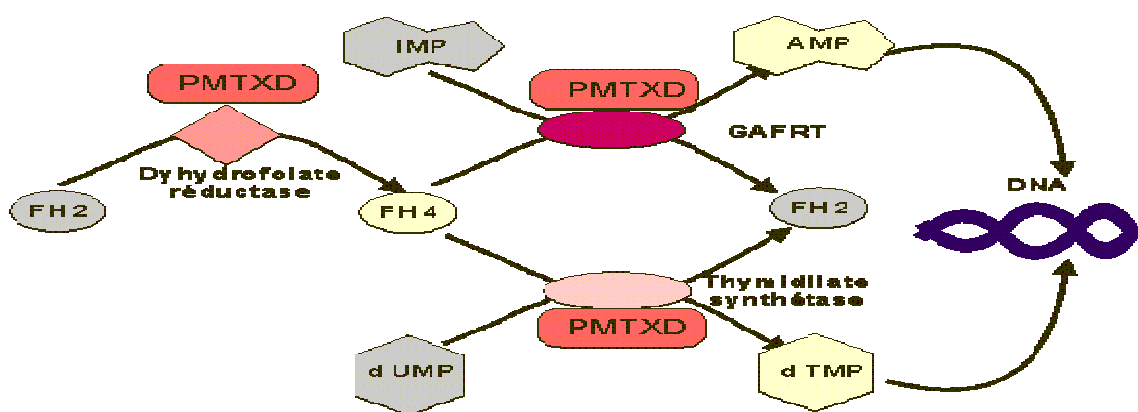


Figure 20: Mécanisme d'action du pemetrexed [74]

II.2.1.3. Analogues des bases pyrimidiques

*Les pyrimidines fluorées

La première des pyrimidines fluorées, le 5-fluorouracile (5-FU) (**Figure 21**), a été synthétisée par l'équipe de Heidelberger en 1957 à l'université du Wisconsin aux États-Unis. Le 5-FU est une drogue majeure dans l'arsenal thérapeutique de lutte contre le cancer puisqu'au moins 50 % des protocoles utilisés contiennent cette molécule. Le 5-fluorouracile (5-FU), comme la plupart des agents anticancéreux, possède un index thérapeutique étroit. De nombreuses toxicités, parfois sévères, sont rapportées chez les patients traités en situation conventionnelle, adjuvante ou métastatique : 31 % de toxicités de grade III-IV et 0,5 % de mortalité dans une population de 1 219 patients traités par 5-FU bolus, et 20 à 25 % de toxicités de grade III-IV en perfusion continue [75].

Ces effets toxiques peuvent être dus à une surexposition au médicament, liée à une importante variabilité interindividuelle du métabolisme. La dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) est la principale enzyme responsable du catabolisme du 5-FU en le transformant en dihydrofluorouracil [36]. Cette transformation touche la majorité du 5-FU, laissant une faible part à l'anabolisme et à l'activité cytotoxique. Une activité élevée de la DPD n'améliore pas le pronostic, mais s'il est insuffisamment métabolisé, le 5-FU peut présenter des effets toxiques. Il existe différents effets indésirables liés à l'usage du 5-FU : érythrodysesthésies palmoplantaires (10 %), stomatites (10 %), hyperbilirubinémie (6 %) et surtout neutropénie grave (6 %) et diarrhées fréquentes. Dans 39 à 59 % des cas de toxicité sévère liée au 5-FU, une diminution de l'activité enzymatique de la DPD peut être détectée au niveau des leucocytes circulants. En particulier, il est retrouvé une neutropénie chez 55 % des patients déficients par opposition aux 13 % de neutropénies retrouvées chez des patients non déficients.

Ce déficit d'activité est principalement d'origine génétique. Le gène codant la DPD est localisé sur le chromosome 1 et comprend 23 exons [74].

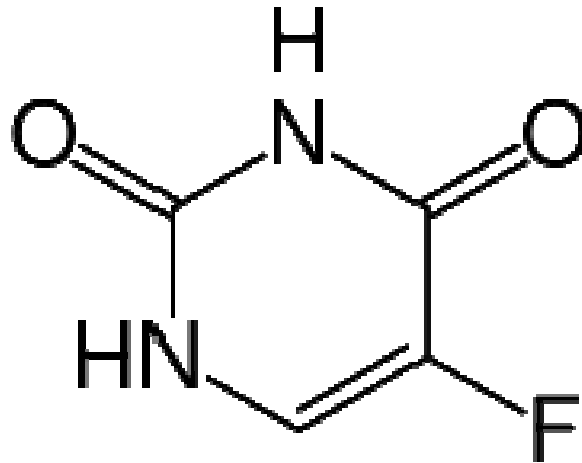


Figure 21: Structure du 5-fluorouracile [76]

II.2.1.4. Les poisons du fuseau

Les poisons du fuseau qui agissent directement sur la mitose sont les vrais médicaments antiméitotiques, la cible de ces antiméitotiques « vrais » est le microtubule, constituant cellulaire ubiquitaire. Son rôle le plus connu se situe au niveau du fuseau méitotique, au moment de la division cellulaire, les microtubules deviennent très nombreux et constituent le fuseau de division. Ils interviennent également dans de nombreuses fonctions cellulaires : ils contribuent à maintenir en forme les cellules. Ils sont particulièrement nombreux dans les axones des cellules nerveuses, ils jouent un rôle dans la mobilité cellulaire, dans les liaisons intercellulaires et dans les transports intracellulaires et enfin ils jouent un rôle modulateur sur les interactions facteurs de croissance-récepteurs de surface [77].

Les microtubules sont constitués par des polymères de tubuline, d'un poids moléculaire de 100 kilodaltons. La tubuline est elle-même constituée de deux sous-unités qui diffèrent par quelques polypeptides acides. Les microtubules sont en équilibre dynamique avec les dimères solubles de tubuline. Cet équilibre peut être modifié, dans un sens ou dans un autre, par les signaux générés par les différentes phases du cycle cellulaire et régulé par la guanosine 5'-triphosphate (GTP) ou par le calcium [75].

De nombreuses substances issues de plantes agissent sur les microtubules.

Cette action est probablement à la base des vertus médicinales attribuées à ces plantes depuis des siècles. Les antiméitotiques, dont les dérivés synthétiques restent encore aujourd'hui des médicaments de choix dans le traitement des cancers. Les alcaloïdes de la pervenche (vincristine et vinblastine étant les prototypes) sont utilisés depuis plus de 40 ans notamment dans le traitement des hémopathies [78].

Des substances issues de l'écorce de l'if, les taxanes, font partie des drogues de référence dans le traitement du cancer du sein.

Les vinca alcaloïdes et les taxanes ont des sites de fixation distincts et des effets opposés sur la polymérisation de la tubuline *in vitro*. *In vivo*, l'effet se traduit par un ralentissement ou un arrêt de la mitose entre métaphase et anaphase, avec parfois apparition de figures de mitoses anormales.

Les médicaments antiméitotiques sont des composés qui interviennent pendant la mitose elle-même, quand les chromosomes dédoublés doivent migrer le long des tubules du fuseau cellulaire, vers un des deux pôles, avant la séparation des cellules [79].

II.2.1.5. Les vinca alcaloïdes

Les alcaloïdes sont issus de la pervenche de Madagascar, *Catharanthus roseus* ou *Vinca rosea*. Le premier alcaloïde extrait en 1952 fut la vincéine puis d'autres furent extraits ou fabriqués chimiquement par hémisynthèse avec ou sans modification de leur structure. Ce sont de vrais antiméitotiques et interviennent en empêchant la formation du fuseau chromatique qui permet la séparation des chromosomes au cours de la mitose.

Ainsi, les cellules restent bloquées au stade de la mitose et ne peuvent pas se diviser. La caractéristique commune de ces alcaloïdes est la présence de deux noyaux couplés dans la plante qui sont la catharantine et la vindoline. Ces produits diffèrent essentiellement par leurs constantes pharmacologiques et par leur aptitude à diffuser dans les différents secteurs de l'organisme [80].

La vinblastine, découverte en 1957, fut le premier alcaloïde de la classe utilisé en clinique puis vinrent la vincristine, la vindésine, la vinorelbine et enfin, beaucoup plus récemment, la vinflunine (**Figure 22**) [82].

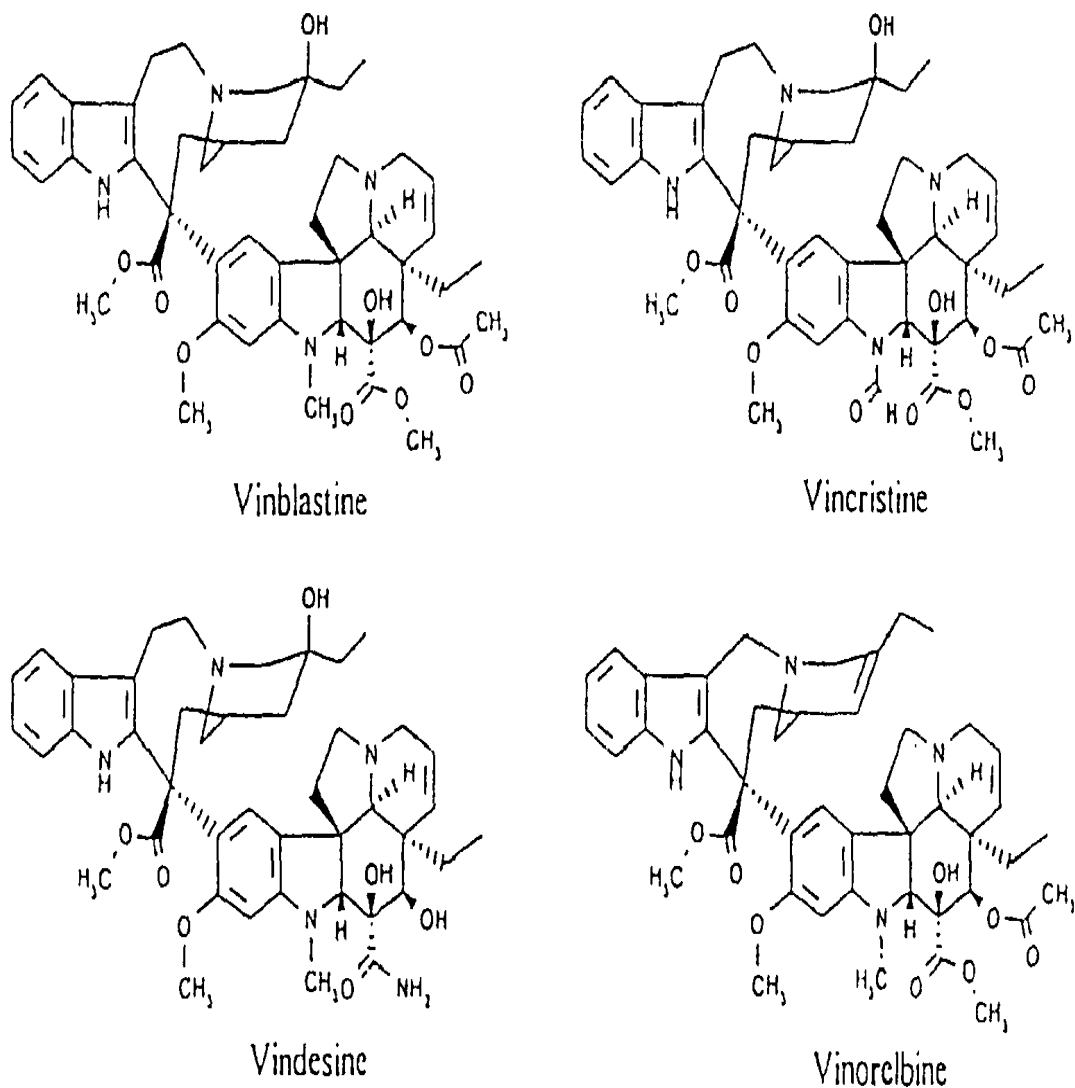


Figure 22: Structure des vinca alcaloïdes utilisé en chimiothérapie. [81]

Les vinca alcaloïdes sont des agents antimicrotubulaires qui se fixent sur la sous-unité de la tubuline, à un site différent de celui de la colchicine, le plus ancien des antimitotiques. Elles inhibent sa polymérisation en microtubules, ces composants majeurs du cytosquelette qui interviennent dans de nombreuses fonctions cellulaires, comme la mitose et la motilité.

La vinblastine est active sur les cellules qui sont engagées dans le cycle cellulaire, les bloque en G2/M et provoque une apoptose [83].

Toutes les vinca alcaloïdes sont métabolisées dans le foie par le cytochrome P450 et leur élimination est essentiellement biliaire. Elles interfèrent dans le métabolisme de certains acides aminés conduisant à l'acide glutamique.

Les mécanismes de résistance aux vinca alcaloïdes font intervenir le système MDR, l'hyperexpression du gène, par l'intermédiaire de la glycoprotéine P, entraînant une augmentation de la sortie du médicament et une diminution de sa concentration intracellulaire [82].

II.2.1.6. Les taxanes

Les taxanes que l'on a longtemps appelés les « taxoïdes » sont des dérivés alcaloïdes extraits de l'if. Deux médicaments cytotoxiques ont été développés, le paclitaxel extrait de l'écorce de l'if américain, *Taxus brevifolia* et le docétaxel, produit hémi-synthétique, obtenu à partir d'une substance, non elle-même cytotoxique, extraite des aiguilles de l'if européen, *Taxus baccata* [82].

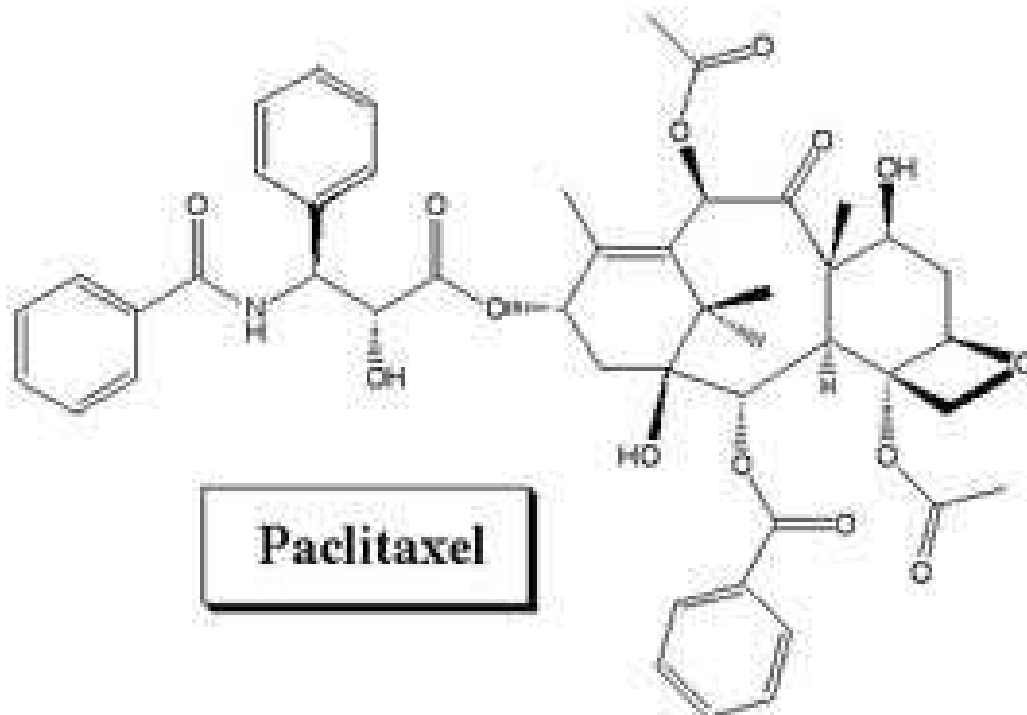


Figure 23: Structure du Paclitaxel [85]

II.2.1.7. Le paclitaxel

Le paclitaxel (**Figure 23**) se lie préférentiellement aux microtubules plutôt qu'aux dimères de la tubuline. Cette fixation est spécifique et réversible. Le site de liaison du paclitaxel sur les microtubules est différent de celui de la GTP, de la colchicine et des vinca alcaloïdes. [86]

Contrairement aux autres antimitotiques qui empêchent la polymérisation de la tubuline en microtubules, le paclitaxel modifie l'équilibre microtubules-tubuline en faveur des microtubules, en abaissant la concentration critique de la tubuline nécessaire à la formation des microtubules. Ceci se réalise sans GTP. Au cours de la mitose normale, les centrioles migrent aux deux pôles de la cellule, formant chacun l'aster du fuseau mitotique, qui joue un rôle primordial dans la séparation du matériel chromosomique dupliqué, avant la séparation tubulaire. Dans les cellules traitées par le paclitaxel se forme un nombre excessif d'asters anormaux qui ne sont pas associés au centriole. Apparaissent également des microtubules groupés en paquets, alignés de façon parallèle dans le cytoplasme [87].

Les asters anormaux se forment pendant la mitose alors que les paquets de microtubules se forment pendant les phases G0/G1, S et G2 du cycle cellulaire. Le paclitaxel empêche donc la dépolymérisation de la tubuline [88].

II.2.1.8. Le docétaxel

Le docétaxel agit de la même manière que le paclitaxel sur la formation de microtubules (**Figure 24**).

Mais en plus de son action facilitatrice de l'assemblage de la tubuline, le docétaxel est capable d'altérer certaines classes de microtubules, tels que les microtubules Tau-dépendants.

Ainsi, les polymères générés par le docétaxel seraient différents de ceux obtenus avec le paclitaxel. Le docétaxel induit également l'assemblage de microtubules en paquets, mais n'altère pas le nombre de protofilaments dans les microtubules, contrairement au paclitaxel.

Des molécules proches par leur mécanisme d'action des taxanes sont en cours de développement, ce sont les épothilones, dérivés semi-synthétiques de produits naturels. [90]

Toutes les molécules présentées ont des marges thérapeutiques étroites ne laissant que peu de place à une modulation importante des doses d'autant plus que ces molécules ne sont plus que très rarement utilisées seules. La poly-chimiothérapie rend leur utilisation encore plus

complexe du fait du risque d'interaction médicamenteuse qu'elle soit pharmacocinétique ou pharmacodynamique.

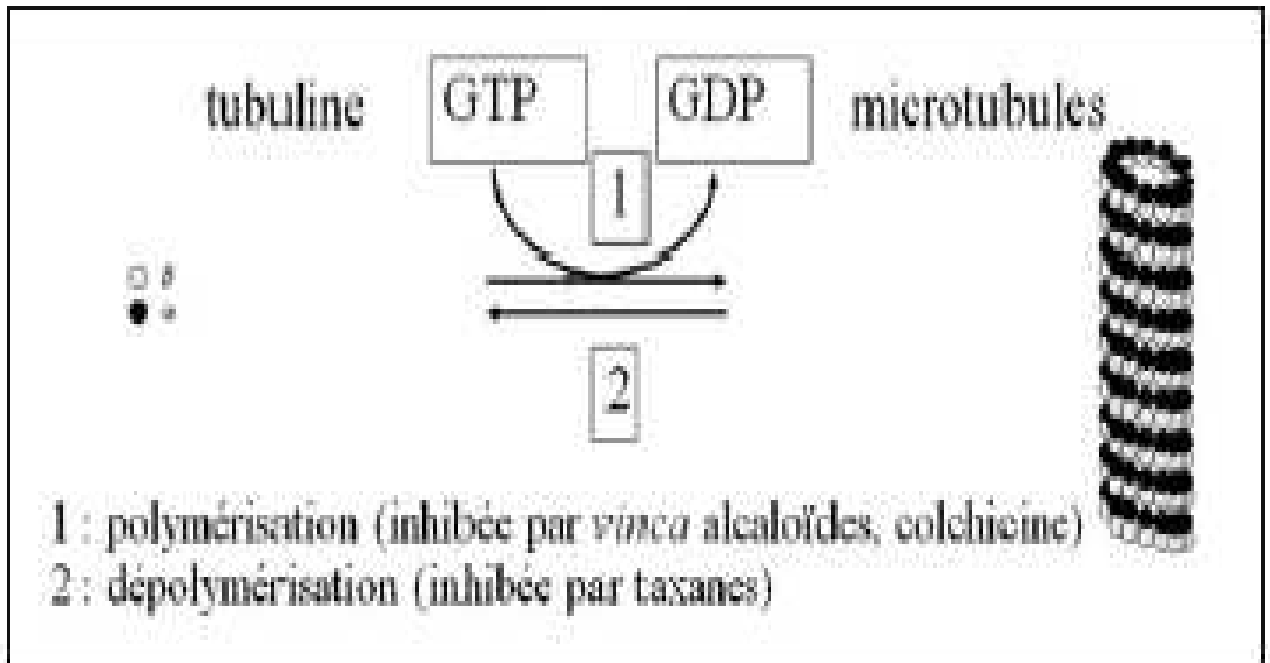


Figure 24: Comparaison du mécanisme d'action des vinca alcaloïdes et des taxanes sur la tubuline [89]

L'association des cytotoxiques aux nouvelles chimiothérapies dites « ciblées » ouvre une nouvelle ère du traitement de la maladie cancéreuse sans, obligatoirement, la rendre plus simple [91].



**DEUXIEME PARTIE
LES NOUVELLES
APPROCHES**



Chapitre I
LA THERAPIE
GENIQUE

La thérapie génique est une nouvelle approche thérapeutique utilisant l'ADN comme médicament. Cette stratégie consiste à introduire un gène étranger, appelé transgène, pour corriger un défaut génétique ou palier au déficit d'une protéine essentielle (**Figure 25**). La thérapie génique a initialement suscité de grands espoirs.

Elle repose sur une idée simple : dans le cas des maladies monogéniques, le traitement consiste à remplacer le gène défectueux par le gène intact. Dans le cas des maladies acquises ou multigéniques, les choix sont plus larges et ne sont plus dictés par la génétique [92].

Malgré d'énormes avancées accomplies ces quinze dernières années afin de faire de cette utopie thérapeutique une réalité clinique, l'enthousiasme des années 90 a fait place aujourd'hui à un optimisme plus raisonné. En particulier à cause des difficultés techniques liées au transfert de gène qui ont considérablement freiné sa mise en pratique.

Après un rappel des différentes modalités de transfert de gène en usage à ce jour, nous définirons les situations pour lesquelles cette approche est possible, avec une attention toute particulière au traitement des cancers du tube digestif et les premiers essais cliniques s'y rapportant [93].

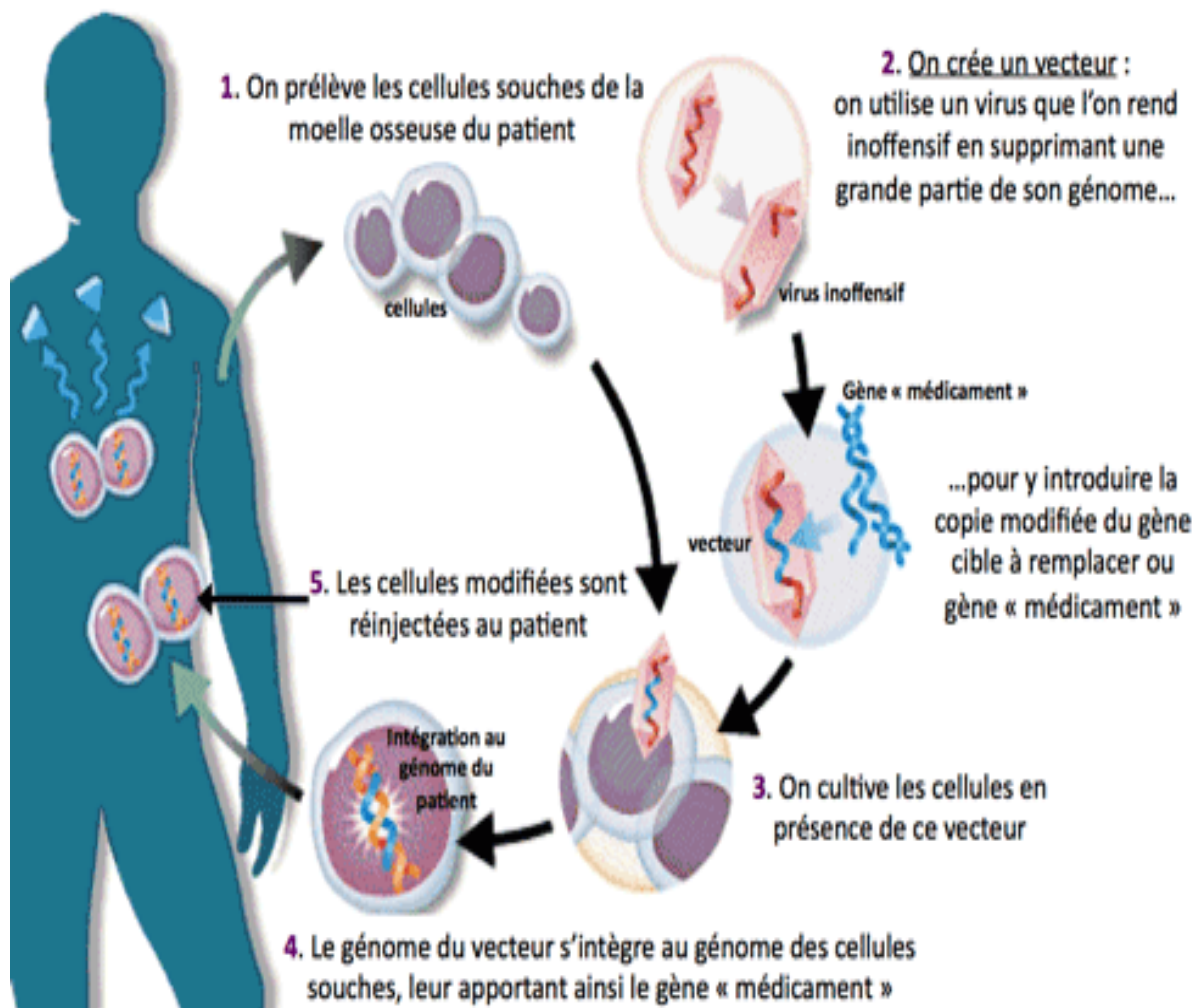


Figure 25: Principe de la thérapie génique [96]

I.1. les différentes approches de transfert de gène et de thérapie génique

La thérapie génique a été appliquée selon des stratégies ou des modalités multiples variant selon le but recherché (complémentation ou réparation), le type de nucléotide transféré (ADN complémentaire, ADN génomique, oligonucléotide synthétique ou chimère d'ADN et d'ARN), la modalité de transfert de gène (à l'aide d'un vecteur viral ou d'un vecteur synthétique) et enfin le protocole clinique d'administration retenu (*in vivo*, *in situ* ou *ex vivo* dans des cellules préalablement prélevées et purifiées). Le transfert du gène (appelé aussi transgène) peut être opéré soit *in vivo* (injection du transgène dans la circulation générale ou

dans un organe) ou *in situ* (injection directement dans le site pathologique) : il s'agira là de l'administration directe de la combinaison vecteur gène thérapeutique. Le transfert peut aussi être effectué *ex vivo* : après prélèvement des cellules du malade, une culture desdites cellules est effectuée dans des conditions de laboratoire appropriées favorisant leur multiplication, puis ces cellules sont transfectées (on dit aussi transduites) par la combinaison vecteur-gène thérapeutique et finalement réimplantées *in situ* après avoir intégré le transgène. [94]

Les vecteurs de transfert de gène doivent remplir plusieurs conditions essentielles. Ils sont chargés de protéger le transgène dans le milieu extracellulaire, d'assurer la reconnaissance de la cellule à transduire et de permettre le transport du transgène jusqu'au noyau. Pour faciliter la pénétration du transgène dans la cellule ou l'organe, on utilise des vecteurs viraux ou non viraux [95].

I.1.1. Les vecteurs viraux classiques

Le gène thérapeutique est incorporé dans un vecteur qui le transportera dans les cellules cibles du malade. Les virus, naturellement doués pour pénétrer dans la cellule vivante et détourner sa machinerie pour s'y multiplier, ont très tôt fait figure de vecteurs idéaux. On ne peut cependant les employer tels quels, en raison notamment de la toxicité des virus lytiques ou transformants et des réactions immunitaires qu'ils déclenchent. La conception d'un virus pour le transfert de gène requiert donc la délétion des régions du génome viral commandant la réplication du virus tout en maintenant son pouvoir infectant. Les inconvénients et risques de ce type de transfert sont la taille limitée de l'ADN transféré, une possibilité d'intégration mutagène et donc la transformation maligne des cellules transduites, la possibilité de recombinaison du virus administré avec un virus sauvage déjà présent et les réactions immunitaires dirigées contre les protéines de l'enveloppe virale [97].

I.1.2. Les vecteurs rétroviraux

Initialement, seuls les rétrovirus et les adénovirus furent utilisés pour le transfert de gène. Les rétrovirus thérapeutiques, dérivés habituellement d'onco-rétrovirus murins comme le virus de Moloney, sont constitués d'un seul brin d'ARN linéaire. L'ARN viral est alors transcrit en ADN par la transcriptase inverse virale. Les rétrovirus sont principalement utilisés dans des

stratégies de thérapie génique *ex vivo* pour infecter notamment les cellules de la moelle osseuse. Les rétrovirus recombinants sont incapables d'atteindre le noyau cellulaire sans rupture de la membrane nucléaire, et ne s'intègrent donc que dans le génome des cellules en division [98].

Le gène transféré est transmis aux cellules filles expliquant ainsi la durée prolongée d'expression. Malgré une bonne efficacité de transduction *ex vivo*, ces virus présentent une faible efficacité de transduction *in vivo* en raison d'une inactivation massive des particules virales par les protéines du complément. Le risque de mutagenèse activante et/ou transformante des cellules transduites par des rétrovirus reste bien présent, comme l'a malheureusement démontré le cas des « enfants bulles », souffrant d'une grave immunodéficience. La survenue récente de leucémies parmi les malades traités et guéris par transfert de gène dans les cellules souches hématopoïétiques pour un syndrome d'immunodéficience liée à l'X, nous rappelle le danger potentiel de ce système de transfert de gène [99].

I.1.3. Les vecteurs adénoviraux

Les adénovirus, responsables d'infections laryngo-pharyngées chez l'homme, sont constitués d'un double brin d'ADN linéaire. Dans les vecteurs adénoviraux recombinants, la région E1 du génome viral qui contrôle la réplication du virus est remplacée par le transgène d'intérêt. Ces vecteurs sont ensuite amplifiés dans des lignées cellulaires de complémentation pour la protéine adénovirale E1, permettant la production de stocks viraux au titre élevé. [100]

Ces virus capables d'infecter les cellules quiescentes et en division avec une grande efficacité assurent une expression transitoire du gène d'intérêt. Cependant, l'utilisation de ces virus comme vecteur de thérapie génique est grandement limitée par les réactions inflammatoires et immunitaires consécutives à l'injection de particules adénovirales. En effet, les anticorps préexistants provenant d'une exposition antérieure à un adénovirus sauvage de même sérotype, fréquent chez la population adulte, et ceux produits à l'occasion de la nouvelle injection neutralisent les adénovirus avant même le transfert de gène. D'autre part, ces anticorps peuvent entraîner l'accumulation de lymphocytes T au point d'injection.

Malgré le perfectionnement des techniques de production afin de réduire le caractère immunogène des adénovirus de premières générations, ces vecteurs font de moins en moins figure de premier choix pour le transfert de gène chez l'homme. De plus, le protocole de thérapie génique réalisé par le groupe de Jim Wilson avait connu une issue dramatique puisqu'il avait entraîné le décès d'un malade de 18 ans. Le but de cet essai était de traiter un déficit en ornithine carbamyl transferase par injection d'adénovirus recombinants par voie parentérale. Les doses de virus injectées, peut-être trop fortes, ont entraîné le décès de ce jeune malade dans les jours suivants par défaillance multiviscérale [101].

I.1.4. Les nouveaux vecteurs viraux

Aujourd'hui, l'évolution de la thérapie génique repose essentiellement sur le développement de nouveaux systèmes de transfert de gènes. Ils doivent être sûrs, efficaces, spécifiques d'un type cellulaire et capable de fonctionner dans des cellules qui ne se divisent pas en assurant la stabilité de l'expression du gène d'intérêt. Enfin, leur production industrielle doit être fiable et rentable. En réponse à ces attentes, les vecteurs recombinants SV40, les virus associés aux adénovirus (AAV), les virus de l'herpès simple (HSV) et les lentivirus ont été développés et modifiés pour le transfert de gène [102].

I.1.4.1. Les vecteurs recombinants SV40

Les vecteurs recombinant SV40 (pour simian virus-40) appartiennent à la famille des parvovirus à double brin d'ADN. L'antigène grand T, ou *Tag*, est excisé et remplacé par un site de clonage multiple et empêchant non seulement la réplication virale, mais aussi le risque de transformation des cellules transduites. Une fois « débarrassés » de la séquence codante pour l'antigène T, ces vecteurs recombinants peuvent être produits à de très forts titres, ne sont pas immunogènes, et sont capables d'assurer une expression à long terme du transgène dans des cellules quiescentes ou en division [100].

La principale limitation de ce système vectoriel est la taille du transgène délivré, qui ne doit pas excéder 5 000 paires de bases. Les vecteurs recombinants SV40 se sont montrés particulièrement efficaces pour le transfert de gènes thérapeutiques dans les cellules souches

hématopoïétiques, le foie, les cellules du système nerveux central et les lymphocytes T, *in vitro* et *in vivo*. Enfin, ces vecteurs permettent le développement de stratégies thérapeutiques innovantes, notamment par transfert d'ARN interférents [103].

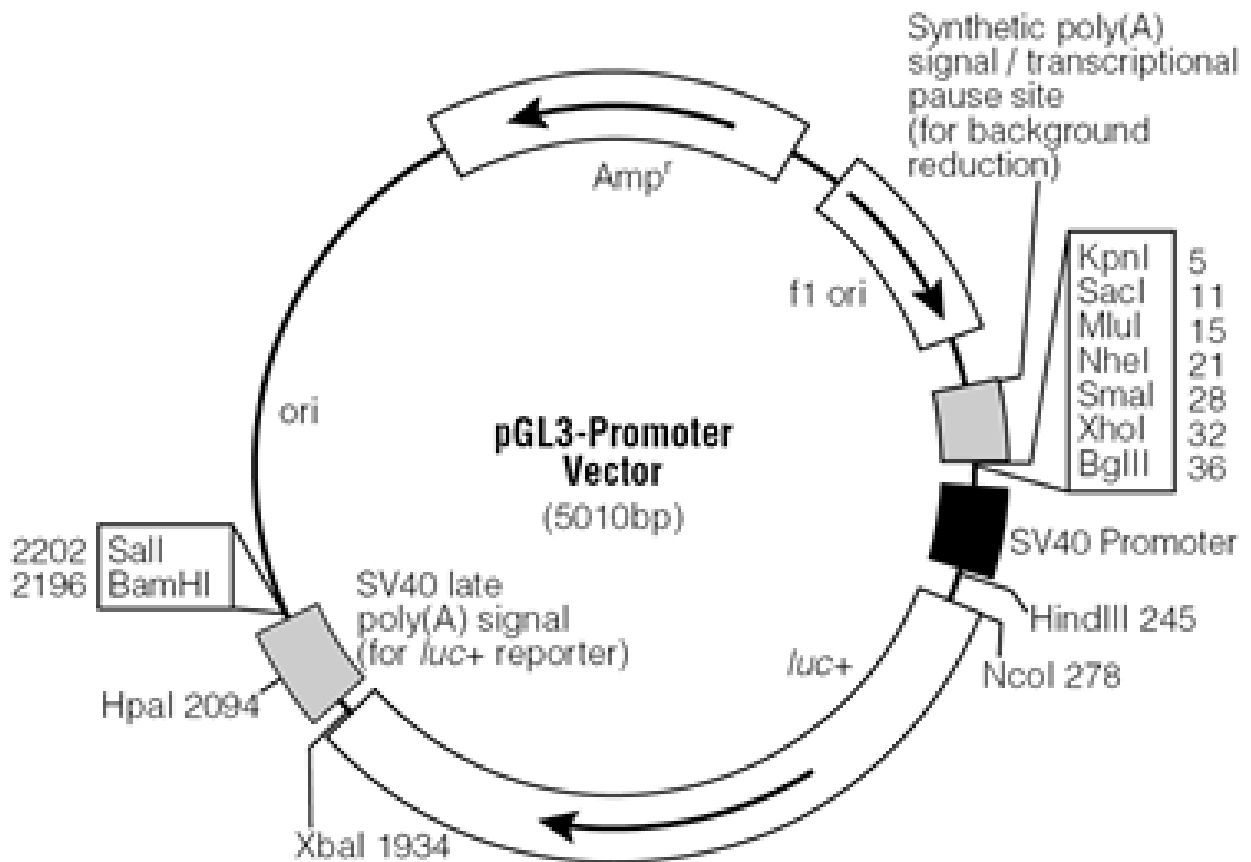


Figure 26: Structure des vecteurs recombinants [104]

I.1.4.2. Les vecteurs AAV

Les AAV sont des parvovirus de type 2 non enveloppés à ADN simple brin, dépourvus de pouvoir pathogène chez l'homme. Malgré leur fragilité, ils peuvent infecter les cellules quiescentes avec une bonne efficacité, et s'intègrent dans une région spécifique du génome hôte (bras court du chromosome 19 humain). Cependant, ils présentent certaines limites. En effet, une stimulation chimique, physique (irradiation) ou virale (co-infection avec des adénovirus) est nécessaire à la production d'AAV recombinants (**Figure 27**). D'autre part, la relative petite taille du virus sauvage (4,8 kb) impose le transfert de gènes de petite taille. Malgré une immunogénicité moins marquée que celle des vecteurs adénoviraux, les

protocoles d'administrations répétées sont peu efficaces en raison de l'apparition d'anticorps neutralisants, limitant les possibilités d'application thérapeutique chez l'homme [105].

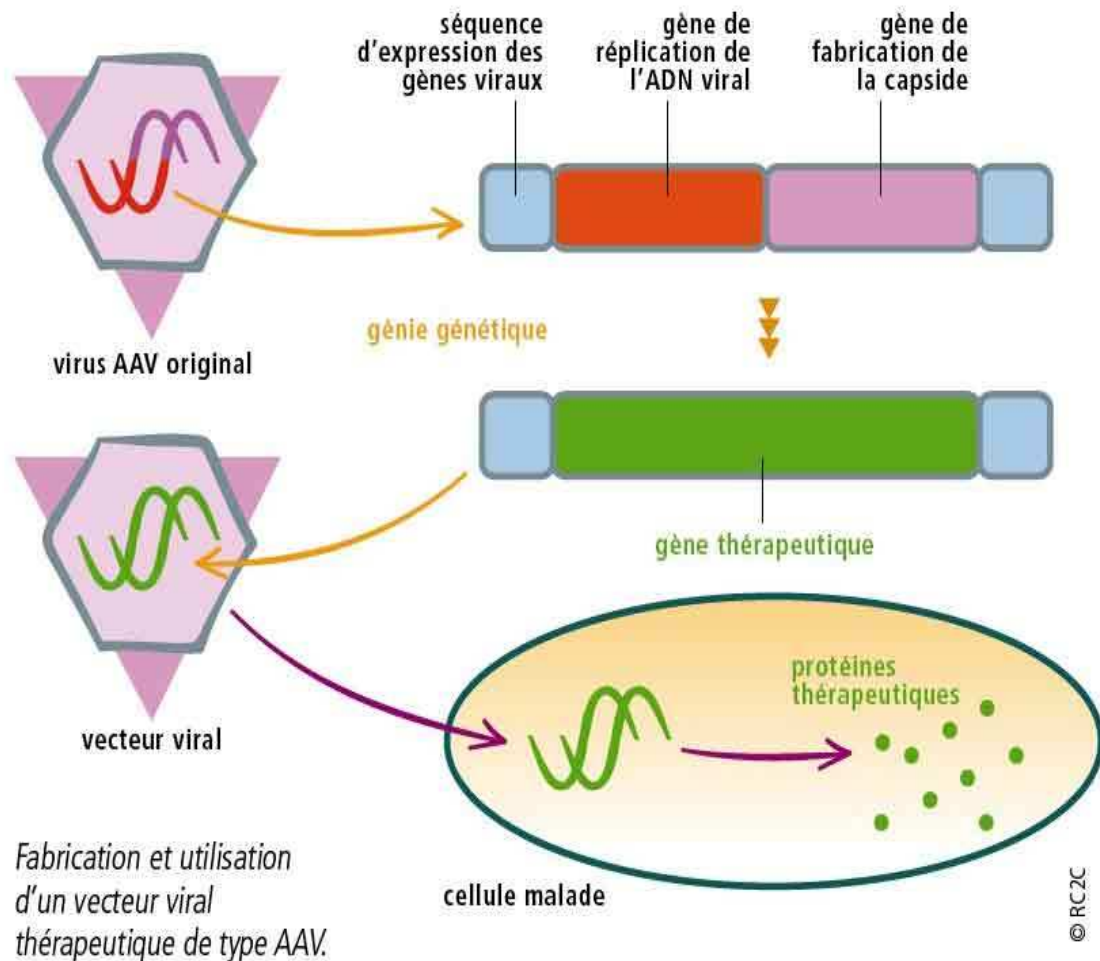


Figure 27: Étapes de la fabrication d'un vecteur viral thérapeutique de type AAV [106]

I.1.4.3. les vecteurs lentiviraux

Les lentivirus sont des rétrovirus apparentés au virus d'immunodéficience humaine (VIH). Ils sont capables d'infecter des cellules au repos avec une grande efficacité. Ils s'intègrent dans le génome permettant ainsi une expression de longue durée : en l'absence de division cellulaire, le complexe de préintégration gagne le noyau par l'intermédiaire des pores nucléaires. Leur production s'apparente à celle des rétrovirus classiques.

Des études préliminaires sembleraient établir leur supériorité par rapport aux rétrovirus murins [107].

<i>Retrovirus genera</i>	
Genus	Examples
Alpharetrovirus	Avian leukosis virus (ALV)
	Rous sarcoma virus (RSV)
Betaretrovirus	Mouse mammary tumor virus (MMTV)
	Mason-Pfizer monkey virus (MPMV)
	Jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV)
	<u>Murine leukemia viruses (MuLV)</u> → Retroviral vectors
Gammaretrovirus	Feline leukemia virus (FeLV)
	Gibbon ape leukemia virus (GaLV)
	Reticuloendotheliosis virus (RevT)
	Human T-lymphotropic virus (HTLV)-1, -2
Deltaretrovirus	Bovine leukemia virus (BLV)
	Simian T-lymphotropic virus (STLV)-1, -2, -3
	Walleye dermal sarcoma virus
Epsilonretrovirus	Walleye epidermal hyperplasia virus 1
	<u>Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)</u> → Lentiviral vectors
Lentivirus	

Figure 28: Différents types de vecteurs utilisés en thérapie génique [108]

I.1.4.4. Les vecteurs synthétiques

La nécessité d'éviter les réactions immunitaires a forcé certains chercheurs à mettre au point des vecteurs inertes, lipides ou polymères cationiques, dont la structure est proche de celle de la membrane cellulaire, dans lesquels sont insérés les transgènes. Les constructions non virales, retrouvées sous forme d'ADN nu ou d'ADN lipo-complexé, peuvent véhiculer de très grands morceaux d'ADN. Ces méthodes d'administration facilitent la production de l'ADN médicament en supprimant toutes les étapes complexes relatives à la préparation et aux dangers liés à l'utilisation de vecteurs viraux. En revanche, ces techniques non virales souffrent d'une faible efficacité de transfert *in vivo* et n'assurent pas une expression du transgène de longue durée [109].

I.1.4.5. L'ADN nu

L'ADN nu (contenant la séquence thérapeutique) est injecté dans le tissu cible sous forme de plasmides minicercles (molécule circulaire) ou pCOR (pour origine de répllication

conditionnelle). Il est ensuite intégré dans les cellules par des mécanismes encore inconnus. Les minicercles ne contiennent ni séquences de résistance aux antibiotiques pour éviter les dangers éventuels de leur dissémination dans l'environnement, ni séquence d'origine de réplication dans les bactéries.

Tableau I: Principales caractéristiques des vecteurs viraux utilisés dans les protocoles pré-cliniques et/ou cliniques de thérapie génique [109]

Désignation	Rétrovirus	Adénovirus	AAV	Herpes	lentivirus	SV40r
Taille maximale du transgène	8 kb	35 kb	4.8 kb	30 kb	10 kb	5 kb
Cellules cibles	Division active	Division active et quiescente	Division active (+/- quiescente)	Division active et quiescente	Division active et quiescente	Division active et quiescente
Mode d'administration	<i>Ex vivo</i> <i>In situ</i>	<i>Ex vivo</i> <i>In situ</i>	<i>Ex vivo</i>	<i>Ex vivo</i> <i>In situ</i>	<i>Ex vivo</i> <i>In situ</i>	<i>In vivo</i> <i>In situ</i>
Expression du transgène	Stable	Transitoire	+/- stable	Transitoire	Stable	Stable
Taux d'expression	Modéré	Elevé	Modéré	Modéré	Modéré	Elevé
Risques	Intégration mutagène	Inflammation immunogénicité	Intégration mutagène	Neurotoxique Intégration mutagène	Intégration mutagène, recombinaison VIH sauvage	Intégration mutagène réacquisition T
Immunité préexistante	Non	Oui	Oui	Oui	Non	Non

Ce système de transfert de gène est limité par une très courte durée d'expression du transgène dans la plupart des tissus, et un taux de transduction extrêmement faible *ex vivo* et *in vivo*. La faible efficacité de transfert de l'ADN nu peut être compensée par la technique d'électrotransfert. Cependant, cette dernière approche est pour l'instant quasi exclusivement réservée au transfert de gène dans le muscle squelettique [110].

I.1.4.6. L'ADN complexé

L'ADN est une molécule chargée négativement, d'où l'idée de la complexer avec des molécules chargées positivement (lipides cationiques ou autres polymères) par des interactions électrostatiques. Le « voyage intracellulaire de l'ADN » est long et difficile, mais possible. Le complexe ADN/vecteur pénètre plus facilement dans la cellule: le liposome cationique ou le polycation fusionne avec la membrane cellulaire après liaison aux protéines membranaires chargées négativement (**Figure 29**) [111].

L'ADN est ensuite incorporé par endocytose pour éviter une dégradation extracellulaire. L'ADN quitte ensuite l'endosome et doit échapper aux lysosomes afin d'atteindre le noyau cellulaire. L'absence de stimulation immunitaire encourage les protocoles de ré-injection, permettant une expression soutenue du transgène thérapeutique [110].

Quel que soit le vecteur synthétique utilisé, l'expression du transgène reste temporaire du fait de l'absence d'intégration dans le génome de la cellule hôte. Cependant, l'incorporation de séquences peptidiques de localisation nucléaire améliore la translocation du transgène dans le noyau et donc le niveau d'expression général. Parmi ces vecteurs, les polymères linéaires d'éthylèneimine de 22 KDa ou polyéthylèneimine (PEI) se sont avérés particulièrement efficaces pour le transfert de gènes thérapeutiques reproductible et non toxique. Ce vecteur peut être administré par injection intraveineuse, intracérébrale, ou intrapéritonéale. Le PEI condense l'ADN en particules chargées positivement capables d'interagir avec les protéoglycans anioniques de la surface cellulaire [111].

Après entrée par endocytose, le PEI joue le rôle d'une éponge à protons permettant de tamponner le pH des endosomes et ainsi protéger l'ADN transgénique, pour ensuite le libérer dans le cytoplasme des cellules transfectées. Le PEI a été utilisé plus particulièrement comme vecteur de transfert *in vivo* dans des modèles de cancers ORL implantés chez la souris athymique et cancer du pancréas établi chez le hamster doré [110].

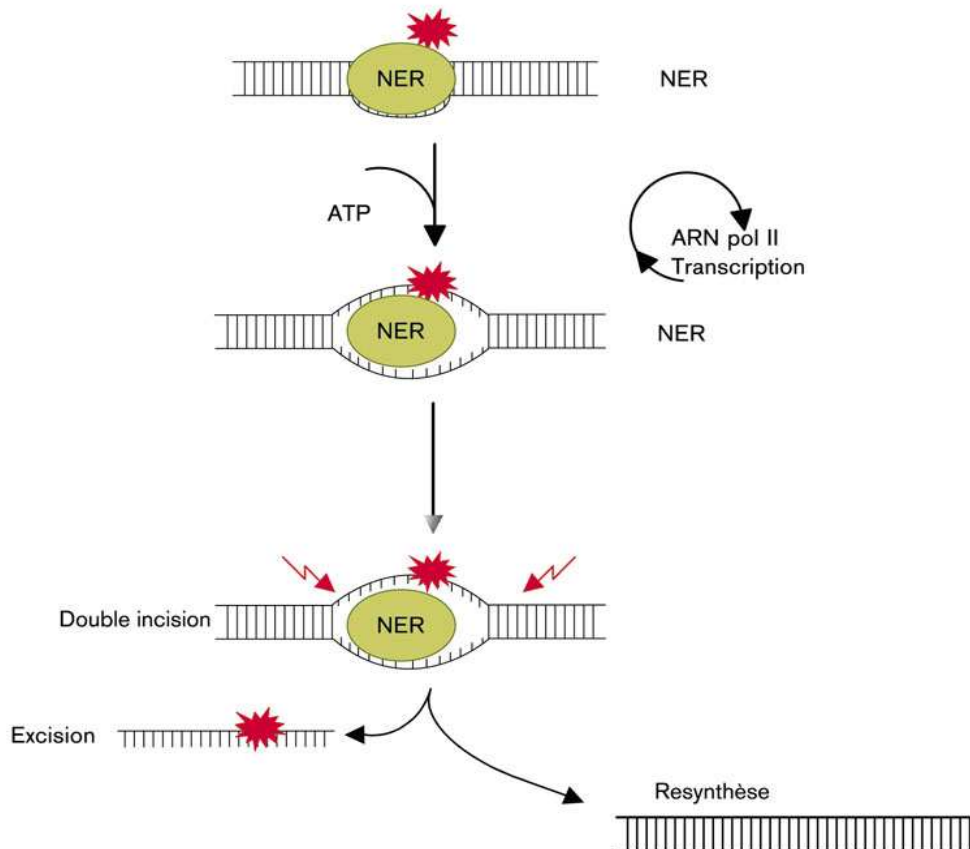


Figure 29: Synthèse de l'ADN complexé [112]

I.1.5. Les techniques de ciblage

Afin de cibler l'action du gène thérapeutique, il est possible de modifier par pseudotypage la reconnaissance entre le vecteur et la surface cellulaire, ou d'utiliser des éléments géniques spécifiques du tissu ciblé [113].

I.1.5.1. Le pseudotypage

Le pseudotypage consiste à produire des glycoprotéines d'enveloppe chimères, par l'utilisation le plus souvent de protéines d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G). Cependant, ces modifications peuvent affecter l'aptitude des vecteurs à fusionner leur membrane avec celle de la cellule, et donc leur capacité à réaliser le transfert de gène.

L'incorporation dans les complexes polycationiques de composés reconnaissables par certains récepteurs membranaires (intégrines, asialoglycoprotéines) améliore et rend plus spécifique l'endocytose cellulaire. Enfin, le ciblage des cellules tumorales peut être obtenu par l'incorporation d'anticorps spécifiques d'antigènes tumoraux membranaires dans le complexe ADN-transporteur [112].

I.1.5.2. Le ciblage moléculaire

Le transfert de gène peut être ciblé au niveau moléculaire, à l'aide de séquences d'ADN régulatrices. Il est possible de contrôler la transcription du transgène d'intérêt à l'aide de promoteurs permettant l'expression génique dans un type cellulaire défini, en fonction de son équipement en facteurs de transcription. On peut ainsi utiliser des promoteurs dits tissus spécifiques. L'exemple le plus couramment retenu est celui de la télomérase, enzyme surexprimée dans 85 % des tissus cancéreux. Son promoteur est ainsi utilisé pour assurer l'expression des transgènes dans les tissus tumoraux. Le ciblage du transfert de gène peut de même être réalisé à l'aide de séquences d'entrée interne des ribosomes (IRES), assurant cette fois une traduction tissu-spécifique [114].

I.2. Bases clinique de la thérapie génique

Les insuffisances de certains traitements disponibles doivent justifier la recherche de nouvelles approches thérapeutiques telle que la thérapie génique. L'évaluation du risque encouru par rapport au bénéfice escompté est nécessaire de même que le choix de l'outil de transfert. Deux questions se posent : est-ce que seul le tissu cible sera touché (en particulier, est-on sûr de l'absence d'atteinte des gamètes) ; le gène transféré va-t-il persister dans les cellules avec ses avantages (effet thérapeutique prolongé) et ses inconvénients éventuels (mutagenèse). En marge des données précliniques classiques de toxicologie, pharmacologie, tolérance locale et générale, des effets plus spécifiques incluant les réactions immunitaires sont à rechercher [115].

Ces études se heurtent à l'insuffisance prédictive de certains modèles animaux. Enfin, le devenir du transgène dans l'organisme doit être connu avant tout essai clinique ainsi que la

biodisponibilité du vecteur et la durée de son expression. Les essais réalisés ces dix dernières années ont démontré que les causes essentielles d'échec des essais de thérapie génique étaient la faible efficacité de transfert, le temps limité d'expression du transgène et la difficulté, dans les maladies polygéniques, de définir le meilleur gène candidat.

Les indications logiques de ce traitement sont donc essentiellement les situations où ces problèmes peuvent être résolus :

- a) maladies héréditaires monogéniques avec déficit fonctionnel dont le gène muté responsable est connu.
- b) besoin limité en protéine thérapeutique de sorte que la guérison peut être obtenue même lorsque la synthèse du transgène est peu importante.
- c) cas où la population cellulaire va acquérir un avantage sélectif par rapport aux autres cellules lui permettant de se multiplier.

En préalable il faut noter que l'expression à long terme du transgène, cruciale pour le traitement de maladies génétiques constitutionnelles, n'est pas indispensable pour la thérapie génique des cancers. D'autre part, le gène thérapeutique, souvent toxique, doit être concentré dans le tissu tumoral, tout en épargnant le tissu sain afin de limiter les effets secondaires [116].

I.3. Thérapie génique des cancers digestifs

Les cancers du tractus gastro-intestinal et des glandes annexes foie et pancréas sont des néoplasmes représentant la plupart du temps un réel défi médical en raison du manque de traitements curatifs lorsque la chirurgie d'exérèse n'est pas ou plus possible. Le transfert de gènes thérapeutiques dans la masse tumorale ou ses métastases est une alternative prometteuse aux traitements palliatifs actuels. D'intenses efforts ont ainsi été réalisés lors d'études précliniques afin de développer des stratégies de thérapie génique pour ces tumeurs digestives avancées [117].

I.3.1. Transfert génique dans le tractus gastro-intestinal

Plusieurs méthodes pour le transfert de gène *in vivo* dans le tractus gastro-intestinal ont été utilisées. La plupart de ces techniques ciblent l'épithélium et les cellules de la couche sous muqueuse, afin d'éviter une dégradation massive et rapide des particules de transfert par les enzymes digestives [118].

L'injection directe d'ADN nu dans la sous-muqueuse gastrique de rat a permis d'obtenir une expression transitoire de gènes rapporteurs. L'utilisation de liposomes cationiques se traduit par une amélioration conséquente de la transduction de l'estomac et du côlon.

L'efficacité de cette méthode de transfert de gène est en rapport avec la fréquence de renouvellement des cellules épithéliales du tractus digestif.

Les vecteurs rétroviraux ont permis l'administration de gènes thérapeutiques dans des carcinomes gastriques *ex vivo* chez la souris athymique. Ces vecteurs présentent un intérêt certain compte tenu de l'index de prolifération élevé de ces tissus.

Cependant, leur capacité restreinte à transduire l'intestin, limite leur utilisation chez l'homme. Au contraire, les vecteurs adénoviraux sont capables de transduire les cellules intestinales *in vivo* [118].

Cette efficacité de transduction est sûrement le reflet d'un tropisme naturel de ces virus pour ces cellules. Le transfert de gène par utilisation de vecteurs adénoviraux a par la suite été appliqué à de nombreux autres organes du tractus gastro-intestinal. Dans certains cas, ces vecteurs ont été administrés par voie vasculaire périphérique, par injection directe dans l'artère mésentérique supérieure, ou même oralement chez le rat [119].

Les vecteurs AAV se présentent comme des candidats prometteurs pour le transfert de gène dans l'intestin. Ces vecteurs administrés oralement entraînent une expression persistante de gènes marqueurs dans les cellules épithéliales intestinales et de la *lamina propria* chez l'animal. Le transfert de gènes thérapeutiques selon ce procédé s'accompagne d'une correction phénotypique d'intolérance au lactose. Outre les caractéristiques des virus AAV préalablement exposées, la résistance de ces virus aux changements de pH, de température ou aux solvants en font un véhicule facilement administrable oralement. La persistance de l'expression génique (près de 6 mois) dans un modèle animal suggère une transduction efficace des cellules souches cryptiques par ces vecteurs. L'efficacité d'autres systèmes plus

« marginaux », tels que les vecteurs recombinants poxvirus, vaccinia, et sendai, n'a pas encore été évaluée pour le transfert de gène dans le tractus gastro-intestinal [120].

I.3.2. Transfert de gène dans le foie et le pancréas

Le foie fait figure de cible thérapeutique idéale pour le transfert de gène, en raison de son accessibilité et de la présence d'un endothélium fenestré. Cette structure permet l'extravasation de structures macromoléculaires de grande taille, tels que les virus recombinants. De ce fait, la quasi-totalité des vecteurs de transfert de gène a été testée pour leur capacité à transduire le foie [121].

Une stratégie de transfert de gène *ex vivo* par vecteur rétroviral a déjà été développée pour le traitement de l'hypercholestérolémie familiale de type IIa. Plus récemment, le déficit en β -glucuronidase a été corrigé avec succès *in vivo* chez le chien par utilisation de vecteurs rétroviraux [122].

Les adénovirus ne sont plus utilisés pour le traitement des pathologies hépatiques en raison de l'échec du protocole de thérapie génique dirigé par le Dr Jim Wilson. Les vecteurs AAV ont été utilisés avec succès pour assurer la sécrétion de facteur IX après transfert de gène dans le foie pour le traitement de l'hémophilie B, chez l'homme. Une même approche basée sur l'utilisation de vecteurs lentiviraux est en cours de développement. Parmi les nouveaux vecteurs viraux, les vecteurs SV40 recombinants ont été utilisés avec succès pour le transfert de gène *in vivo*.

Récemment, les vecteurs recombinants HJV ou Sendai, ont été utilisés avec succès pour le transfert de gène dans les hépatocytes [123].

Le pancréas offre un environnement défavorable au transfert de gène, en raison d'une forte concentration en enzymes digestives, et d'une faible accessibilité autre que par l'échoendoscopie. L'utilisation de vecteurs rétroviraux par voie intrapéritonéale ne conduit qu'à un faible taux de transfection, de l'ordre de 2 % [124].

Tableau II: Protocoles de phase I-II de thérapie génique du cancer pancréatique non résecable (séries de 14 à 23 malades) [122]

Auteur, année	Type de thérapie génique	Vecteur	Gène	Résultats
Gilly FN, 1999	Administration intratumorale directe	Adénovirus	Interleukine	Bonne tolérance régression tumorale
Mulvihill S, 2001	Administration intratumorale directe	Adénovirus	Adénovirus oncolytique ONYX-015	Bonne tolérance
Löhr M, 2001	Administration par voie artérielle	Cellules fibroblastique encapsulée	Cytochrome P450 2B1 + chimiosensibilisation par ifosfamide	Tolérance moyenne régression tumorale
Hecht R, 2003	Administration intratumorale directe	Adénovirus	Adénovirus oncolytique ONYX-015 + gemcitabine	Bonne tolérance régression
Sangro B, 2004	Administration intratumorale directe	Adénovirus	Interleukine -12	Bonne tolérance
Chang K, 2004	Administration intratumorale directe	Adénovirus	TNF-alpha + Radio-chimiothérapie	Bonne tolérance Régression tumorale

Les adénovirus assurent en général un meilleur rendement de transduction notamment dans les modèles tumoraux expérimentaux. Cependant, ces virus par ailleurs impliqués dans le développement de pancréatites et dans l'inhibition de la fonction exocrine pancréatique ne possèdent pas de récepteurs propres (CAR) sur les cellules d'adénocarcinome pancréatiques. En alternative, les AAV et les vecteurs lentiviraux semblent efficaces pour le transfert de gène dans le tissu pancréatique [123].

I.3.3. Stratégies de thérapie génique des cancers digestifs

Différentes stratégies ont été envisagées pour le traitement des tumeurs digestives par transfert de gène. Toutes ont pour objectif de détruire le plus spécifiquement possible les cellules tumorales [125].

I.3.3.1. Le contrôle de l'apoptose tumorale

L'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs est impliquée dans le développement de nombreux cancers du tractus digestif. Ainsi, p53, protéine contrôlant l'entrée des cellules en apoptose, est retrouvée mutée ou délétée dans 50 % des tumeurs humaines [126].

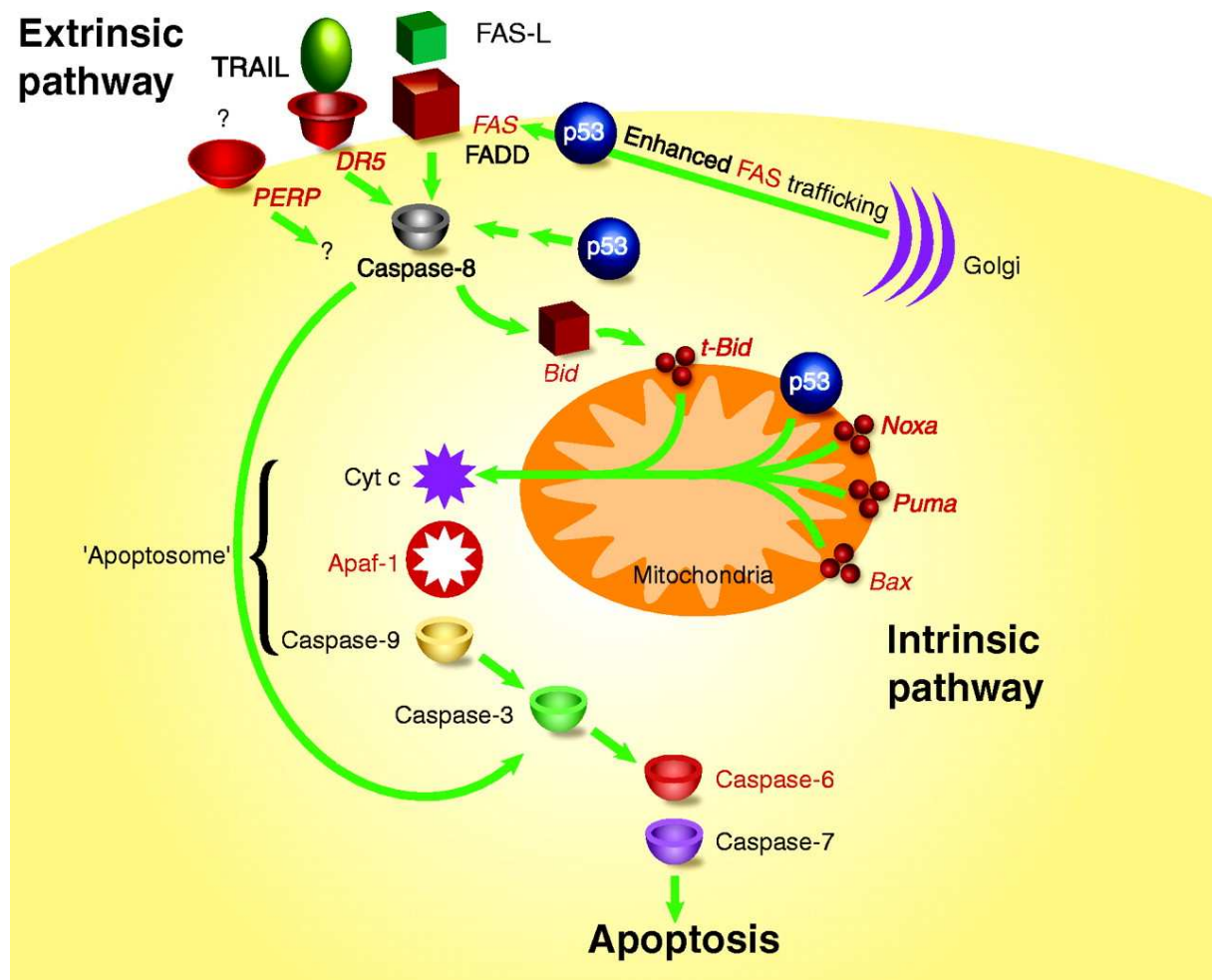


Figure 30: Contrôle de l'apoptose [127]

L'effet inhibiteur direct *in vitro* de la restauration de l'expression de p53 sur la croissance tumorale est complété par une action inhibitrice *in vivo* sur la néoangiogénèse. Cette stratégie a été appliquée au traitement par transfert de gène des tumeurs du foie, du pancréas, de l'estomac et du côlon. Les résultats obtenus sont médiocres et souvent le reflet d'une faible efficacité du transfert de gène *in vivo*, mais aussi des différences de sensibilité des types cellulaires au transgène choisi [128].

I.3.3.2. La piste des gènes suicides : l'effet de voisinage par chimiosensibilisation

L'exemple le plus classique de stratégie de gène suicide est celui de la thymidine kinase du virus de l'herpès (HSV-tk) [129].

Cette protéine est capable de métaboliser le ganciclovir en un composé toxique qui interfère avec la réplication de l'ADN et entraîne la disparition des cellules par apoptose. Ce système assure une toxicité conditionnelle basée sur la présence du gène sensibilisant et de son substrat. Par l'utilisation de cette approche thérapeutique, il est rapidement apparu *in vitro* que l'expression de l'enzyme chimiosensibilisante HSV-tk dans 10 % de la population cellulaire suffit à entraîner la mort de l'ensemble des cellules en culture après traitement par le GCV. Cet effet de voisinage a été appelé « effet bystander ». Plusieurs travaux ont démontré que cette toxicité à distance est due à la diffusion de la prodrogue phosphorylée des cellules exprimant la protéine HSV-tk vers celles ne l'exprimant pas. *In vivo*, ce système induit également une réponse immunitaire forte dirigée contre les cellules tumorales. On parle alors d'effet bystander à distance. Ce système présente un effet tumoral bien documenté *in vitro* et *in vivo* sur de nombreuses lignées cellulaires d'origine digestive. D'autres stratégies de gène suicide telle que la combinaison cytosine déaminase/5-Fluorocytosine et uracile phosphoribosyltransférase/5FU ont été envisagées, notamment pour le traitement d'adénocarcinomes pancréatiques [127].

Chez l'homme, les résultats des premières études cliniques concernant le traitement des métastases hépatiques d'adénocarcinomes coliques et de glioblastomes ont récemment été diffusés. Les résultats rapportés sont plutôt décevants avec, dans chacune de ces études, un seul malade n'ayant pas récidivé. Une étude plus récente de phase III, incluant plus de 300

malades, a été interrompue devant l'absence de bénéfice direct dans le groupe des malades traités par transfert de gène [130].

I.4. L'immunothérapie

L'absence de reconnaissance et d'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire est impliquée dans le développement et la progression des tumeurs. Ainsi, des cytokines comme l'interféron, l'IL-2 ou l'IL-12 sont employées dans le traitement de tumeurs malignes. Cependant, l'administration systémique de fortes doses de ces protéines purifiées ou recombinantes induit des effets secondaires importants et l'efficacité reste limitée. La thérapie génique a donc été proposée pour induire une production locale de cytokines antitumorales [129].

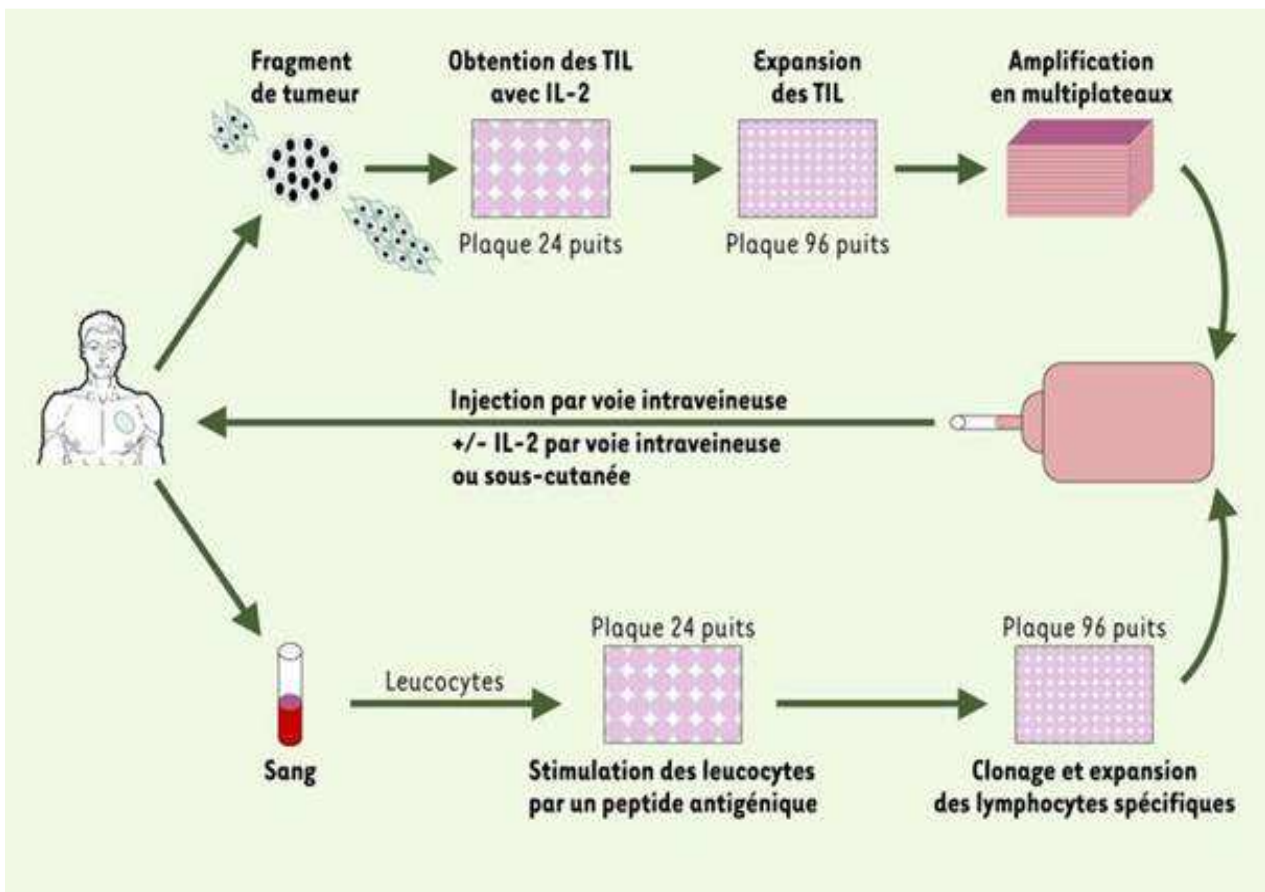


Figure 31: Production de lymphocytes spécifiques pour l'immunothérapie [131]

Une stratégie de thérapie génique pouvant permettre la production locale de doses thérapeutiques de cytokines, tout en améliorant la tolérance du traitement. Ainsi, des fibroblastes ont été transduits *ex vivo* à l'aide de vecteurs rétroviraux afin qu'ils expriment le gène de l'IL-12. Ces fibroblastes sont ensuite réinjectés dans le lit tumoral, afin d'induire une inflammation locale et ainsi attirer les cellules du système immunitaire dans la tumeur. Le risque est de précipiter, dans le cas de tumeurs sur cirrhose, une insuffisance hépatocellulaire. Une autre approche d'immunothérapie par transfert de gène utilise des adénovirus réplicatifs pour délivrer les gènes de l'interleukine 1 et 2, pour le traitement de modèles de cancer pancréatique [132].

L'immunothérapie par transfert de gène peut améliorer la reconnaissance des antigènes tumoraux par les cellules du système immunitaire. Ainsi, l'alpha-foetoprotéine a servi d'antigène tumoral spécifique des carcinomes hépatocellulaires permettant au système immunitaire d'éliminer ce type de cancer. Les résultats obtenus après immunothérapie par transfert de gène sont encourageants. Cependant, ils ne concernent à l'heure actuelle que des modèles de tumeurs implantées chez l'animal [133].

I.5. Un exemple de développement préclinique : le récepteur de la somatostatine sst2

La somatostatine est un neuropeptide naturel ubiquitaire inhibiteur de nombreuses fonctions cellulaires telles que les processus sécrétoires exocrines et endocrines. Cette hormone agit via des récepteurs membranaires spécifiques, nommés sst1 à sst5. La somatostatine et ses analogues stables exercent un effet antiprolifératif *in vitro* et *in vivo* sur de nombreuses cellules normales et cancéreuses. Ces propriétés sont utilisées pour le traitement médical des tumeurs neuroendocrines hypophysaires et gastro-entéro-pancréatiques qui expriment les récepteurs de la somatostatine. Chez certains de ces malades, le traitement par analogue a permis une réduction ou une stabilisation du volume tumoral [134].

Une perte d'expression spécifique du récepteur de somatostatine sst2 a été démontrée dans les cancers pancréatiques et leurs métastases ainsi que dans la plupart des lignées cellulaires qui en dérivent. La correction du déficit d'expression de ce récepteur s'accompagne d'une réduction significative de la croissance et tumorigénicité des cellules cancéreuses

pancréatiques humaines *in vivo*, d'un effet antitumoral local de voisinage et d'une chimiosensibilisation de la masse tumorale aux analogues stables cytotoxiques de la somatostatine et aux ligands de mort après transfert du gène codant pour sst2. Ce récepteur agit donc comme suppresseur de tumeur pour le cancer pancréatique. Ce contexte pré-clinique fort permettra dans un avenir proche de réaliser des essais cliniques de phase I chez l'homme pour le traitement de tumeurs du pancréas par transfert *in vivo* du gène sst2 associé à une chimiosensibilisation [135].



Chapitre II
Irathérapie génique
anticancéreuse utilisant
le NIS

L'iode est un composant essentiel des hormones thyroïdiennes et un modulateur de différentes fonctions de la glande thyroïde. Cet élément étant rare dans l'atmosphère, les mammifères ont développé des moyens pour le concentrer dans cet organe. Cette capacité d'accumulation d'iode dans la thyroïde a permis, depuis plusieurs années, son utilisation en tant que radio-isotope dans le diagnostic scintigraphique et le traitement par radiothérapie métabolique des cancers thyroïdiens. Ces dernières années, le métabolisme de l'iode dans l'organisme, et particulièrement dans la thyroïde, a été très exploré, la découverte par Dai et al. d'un symporteur spécifique catalysant l'accumulation d'iode dans la glande thyroïde mais également dans plusieurs tissus extrathyroïdiens en particulier la glande mammaire pendant la lactation. Le terme de « symporteur » sodium-iodure lui a été définitivement attribué (NIS pour sodium iodide symporter) [136].

Son identification moléculaire a été réalisée par le groupe Carrasco qui avait réussi le clonage du gène de rat codant pour la protéine (rNIS). Très rapidement, le clonage de son homologue humain (hNIS) a été réalisé et plus tard, de celui de la souris [137].

La capacité d'accumulation d'iode dans la thyroïde avait permis l'essor de la médecine nucléaire pour la prise en charge des cancers de la thyroïde. L'identification récente du NIS a permis de fournir des bases moléculaires susceptibles d'expliquer les variations des capacités d'accumulation d'iode dans les cancers thyroïdiens et d'étudier ses implications physiopathologiques et thérapeutiques potentielles dans les maladies thyroïdiennes, en particulier les cancers [136].

Un intérêt tout particulier démontré par un nombre croissant de travaux réalisés tant *in vitro* qu'*in vivo*, est celui d'induire des accumulations d'iode dans les cellules, qui normalement n'expriment pas le NIS par transfert de son gène. L'imagerie est associée à ces travaux pour suivre les étapes de cette stratégie thérapeutique. Cette thérapie génique constitue une approche séduisante, dans la mesure où elle permettra d'étendre l'utilisation d'iode radioactif et de radio-isotopes substrats du NIS pour la prise en charge des tumeurs non thyroïdiennes [137].

II.1. Le symporteur Na⁺/I⁻: données structurales et physiologiques

II.1.1. Structure

Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire comportant 643 acides aminés d'un poids moléculaire de 75-90 KDa. L'analyse de sa structure lui prédit 13 domaines transmembranaires (**Figure 32**).

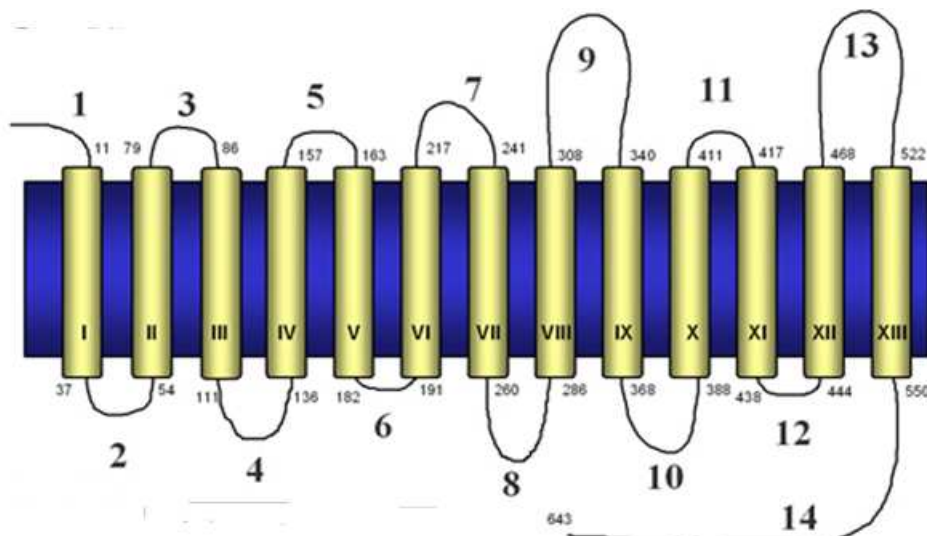


Figure 32: Structure du système symporteur de l'iode [138]

Elle appartient à la famille 5 des transporteurs de soluté (SCL5A), selon la classification de l'Online Mendelian Inheritance in Man Classification (OMIM), chargés d'assurer le transport d'un soluté simultanément et dans le même sens que le sodium. Le gène humain est situé sur le bras court du chromosome 19. Des homologies inter-espèces ont été établies: le NIS humain présente une haute identité et une forte homologie avec le NIS porcin et murin [139].

II.1.2. Localisation

Son expression est retrouvée par immunomarquage au niveau de la membrane basolatérale des cellules thyroïdiennes folliculaires et ce de façon hétérogène selon les cellules et les follicules.

En dehors de la thyroïde le NIS a été mis en évidence dans différents tissus de l'organisme: une forte expression est retrouvée dans des tissus connus pour concentrer l'iode comme les glandes salivaires, gastriques ou mammaires, l'intestin grêle et le placenta. L'expression mammaire est maximale en fin de grossesse et au cours de l'allaitement. Une expression faible a été notée dans d'autres tissus qui ne concentrent pas l'iode comme l'hypophyse, le pancréas, les gonades, la prostate, les surrénales ou le thymus [140].

Bien que le NIS exprimé dans les tissus extrathyroïdiens possède une grande similitude avec le symporteur thyroïdien, il en diffère par l'absence d'organification des iodures accumulés [141].

II.1.3. Rôle du symporteur Na/iode

L'iode apporté par l'alimentation générale est transformé en iodure au niveau intestinal, puis capté par la cellule thyroïdienne. C'est à ce stade qu'intervient le symporteur NIS, en assurant le cotransport de deux ions Na^+ puis d'un ion I^- de manière séquentielle et ordonnée. La pompe membranaire Na^+/K^+ ATPase génère l'énergie nécessaire à ces transports ioniques par un gradient de concentration en Na^+ . La concentration intracellulaire des iodures est ainsi 20 à 40 fois plus élevée que la concentration plasmatique dans les conditions physiologiques [140].

Enfin, grâce à leur structure chimique le technétium ($\text{Tc}^{99\text{m}}$), le rhénium188 (Re^{188}) et l'astate 211 (At^{211}) sont également transportés par le NIS, permettant des perspectives intéressantes en imagerie médicale et en thérapie de certains cancers [141].

II.1.4. Régulation

II.1.4.1. Régulation du symporteur Na/iode thyroïdien

L'expression du NIS est essentiellement sous le contrôle de la TSH (et plus particulièrement du couplage entre le récepteur et la voie de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et de l'iode circulant. Ces régulations se traduisent par des modifications des niveaux d'ARNm

codant pour le NIS. En l'absence de TSH, le symporteur est partiellement redistribué dans les compartiments subcellulaires. La TSH pourrait donc agir sur l'expression membranaire du symporteur en modulant son adressage cytoplasmique et en favorisant sa distribution vers la membrane cytoplasmique, la polarisation et l'organisation spatiale du NIS dans la membrane étant fondamentales pour sa fonctionnalité. Indépendamment de la TSH, les voies de signalisation impliquant une phosphorylation pourraient aussi être impliquées dans l'activité, la localisation subcellulaire et la dégradation du symporteur [142].

La régulation de l'expression du gène du NIS commence à être connue et l'implication de facteurs de transcription spécifiques de la thyroïde a été décrite: le facteur Pax-8 localisé dans la zone NIS Upstream Enhancer (NUE) du gène et les facteurs TTF1 et TTF2 situés au niveau de sa zone promotrice.

Dans les lignées de cellules murines immortalisées, il a été rapporté que le niveau d'activation oncogénique pourrait moduler le degré de transcription du NIS et diminuer son expression [141].

II.1.4.2. Régulation du symporteur Na/iode extra thyroïdien

La TSH n'est pas responsable de l'expression du NIS dans les tissus extra thyroïdiens. Les mécanismes dépendent dans ce cas du type cellulaire et de son environnement. Au niveau de la glande mammaire par exemple l'expression est induite pendant la période de lactation, mais l'implication des hormones (prolactine, ocytocine ou œstradiol), dans cette activation, doit être précisée [143].

Les mécanismes de régulation du NIS demeurent donc très complexes et d'autres voies de régulation peuvent être envisagées, notamment dans les tissus extra thyroïdiens exprimant le NIS [142].

II.2 Expression du symporteur Na/iode dans les cancers

II.2.1. Dans le cancer de la thyroïde

Il est bien admis que la plupart des cancers thyroïdiens (un tiers des cancers différenciés et l'ensemble des carcinomes anaplasiques) s'accompagnent d'une diminution du transport cellulaire des iodures. La participation du NIS à ce processus a été envisagée en recherchant l'expression du NIS par immunomarquage ou en détectant l'ARNm spécifique. Une forte diminution de l'expression de la protéine est ainsi observée dans la plupart des cancers thyroïdiens, avec une expression de l'ARNm dix à mille fois plus faible que dans le tissu normal. Cette faible expression diminue encore lorsque la différenciation est moindre [144].

Certains travaux ont au contraire montré des surexpressions des transcrits et de la protéine NIS dans certains carcinomes, non corrélées à une activité de transport d'iodure dans ces tumeurs. Des études complémentaires de la fonctionnalité du NIS sont encore requises pour comprendre ces dérégulations. De plus des études d'immunohistochimie avaient montré un marquage essentiellement localisé dans le cytoplasme et pratiquement absent au niveau de la membrane plasmique. En 2010 une étude menée par Pevrottes et al. a montré que le marquage intracellulaire, obtenu avec les anticorps anti-NIS correspondait à une liaison non spécifique avec l'anticorps et que le niveau d'expression de la protéine était bel et bien faible sur les échantillons sélectionnés [145].

II.2.2. Dans les cancers non thyroïdiens

Les études, concernant ce sujet restent encore préliminaires. L'expression du NIS fonctionnel dans les tissus extrathyroïdiens a été signalée principalement dans le cancer du sein où il a été identifié chez 87 % des patients présentant un cancer du sein et sur la lignée de cancer mammaire MCF7. Le NIS a été identifié à la surface des cellules tumorales mammaires, mais aussi à l'intérieur des cellules. La même étude, menée récemment par Pevrottes et al. avait inclus des cellules de cancer mammaire et a conclu que l'expression de la protéine était faible et que le marquage intracellulaire correspondait à un signal non spécifique [146].

Des accumulations d'iode ont été également observées par scintigraphie sur des tumeurs mammaires. Une étude réalisée en 2009, sur 23 patientes ayant un cancer du sein triple négatif a montré que le NIS était fortement exprimé dans une proportion significative de ces cellules. La même équipe, dans une autre étude, constate une présence significative du NIS sur les métastases cérébrales du cancer du sein [145].

Spitzberg et al. avaient également identifié le symporteur sur des cellules issues de carcinomes de la prostate. Depuis, peu de données sont disponibles sur son expression dans ces tissus. Dans l'étude réalisée par Navarra et al. sur une large série de patients avec adénocarcinome de la prostate, la protéine a été mise en évidence dans la moitié des tissus examinés et son expression était corrélée avec l'agressivité de la tumeur [146].

L'absence du NIS, observée au niveau des lésions gastriques malignes, pourrait être utile pour distinguer ces lésions des lésions gastriques bénignes, selon une étude réalisée par Farnedi et al. sur un large spectre de lésions gastriques. Enfin, des études sont nécessaires pour confirmer les expressions spontanées de la protéine retrouvées dans de nombreux autres cancers: ovaires, poumons, côlon... et pour mesurer les accumulations d'iode qu'elles pourraient induire [145].

II.3. Thérapie génique utilisant le symporteur Na/iode

II.3.1. Principe et avantages

La connaissance de la structure du gène de la protéine NIS a permis le développement d'un nombre croissant de travaux sur l'utilisation du NIS en thérapie génique anti tumorale. Cette nouvelle approche est basée sur le transfert ciblé du gène NIS dans des cellules cancéreuses. Son expression induit ensuite des accumulations d'iode dans ces cellules. Ces accumulations, visibles par des techniques d'imagerie, permettent de détruire ces cellules par la radiothérapie à l'iode 131. Cette approche cumule un certain nombre d'avantages: les techniques et équipements, mis en œuvre et nécessaires pour les premiers essais cliniques sont identiques à ceux couramment utilisés dans les départements de médecine nucléaire. Toutes les étapes de

cette stratégie peuvent être suivies par des techniques d'imagerie et il sera également possible d'évaluer la dose de radioactivité spécifique qui sera reçue par les cellules, en estimant le niveau d'expression du NIS exogène fonctionnel par un simple examen scintigraphique. En plus, la radiothérapie métabolique permet d'induire un effet ciblé sur les cellules tumorales qui sont parfois plus radiosensibles, générant ainsi un minimum d'effets secondaires. L'apport de la radiothérapie métabolique, pour cette approche de thérapie génique, est qu'elle rend possible une efficacité complète du traitement due à l'effet *bystander*, alors même que le transfert génique ne serait que partiel [147].

II.3.2. Essais de thérapie génique et perspectives thérapeutiques

II.3.2.1. Dans le cancer différencié de la thyroïde

Les carcinomes différenciés de la thyroïde et leurs métastases présentent souvent une réduction de l'absorption d'iodure, agissant sur l'efficacité de l'iode radioactif. Il a été démontré en plus, que le tissu cancéreux thyroïdien exprimant le NIS captait l'iode radioactif plus que les tissus qui ne l'exprimaient pas. Une perspective thérapeutique consiste à restaurer l'expression du NIS afin de palier aux mécanismes d'échappement au traitement des cellules cancéreuses. Les agents déméthylants, tels que le 5-azacytidine ou encore le butyrate sodique, permettent de restaurer l'expression du symporteur, si l'on sait que la méthylation aberrante du gène NIS conduit à une diminution du transport des iodures dans les carcinomes thyroïdiens. Le niveau d'expression varie également selon l'état de différenciation cellulaire. L'utilisation de l'acide rétinoïque, en tant qu'agent de différenciation cellulaire sélectif des cellules carcinoïdes en association, trouverait son intérêt en clinique dans la prise en charge des tumeurs non cumulantes de la thyroïde, comme en attestent les études réalisées [148].

D'après une étude, réalisée par Mishra et al., l'expression du NIS ne peut prédire avec précision de la fixation d'iode radioactif par les métastases de cancers thyroïdiens. Il a été démontré que le *PTTG binding factor* (PBF), proto-oncogène impliqué dans la pathogénie du cancer de la thyroïde inhibe l'absorption de l'iodure en se liant au NIS et en modifiant sa

localisation subcellulaire; ce qui pourrait avoir des conséquences profondes sur l'optimisation de l'irathérapie, étant donné que le PBF est surexprimé dans les cancers thyroïdiens [149].

L'étude du dysfonctionnement du métabolisme des iodures dans les cellules cancéreuses et la compréhension des mécanismes d'échappement au traitement des cellules cancéreuses exigent d'effectuer des études expérimentales et cliniques complémentaires sur la fonctionnalité du symporteur NIS [148].

II.3.2.2. Dans les autres cancers

La stratégie utilisée comporte plusieurs étapes. La première étape est le transfert du gène dans les lignées cellulaires cancéreuses. Dans la majorité des travaux publiés, le transfert du gène a été effectué en premier lieu, sur les cellules cultivées *in vitro* et les cellules modifiées ont été implantées chez l'animal. Dans les travaux plus récents, les cellules tumorales étaient préalablement implantées chez l'animal et modifiées *in vivo* dans une seconde étape après transfection du gène du NIS, par injection IV de particules virales recombinantes portant le NIS, un contexte qui est plus proche d'une éventuelle thérapie génique chez l'homme. Beaucoup de travaux ont mis à profit des rétrovirus ou des adénovirus recombinants pour vectoriser le gène du NIS. L'utilisation de virus recombinants de la rougeole a permis, par la suite de cibler plus spécifiquement la vectorisation vers un type cellulaire [149].

Une fois le gène vectorisé, sa transcription est sous le contrôle d'un promoteur. Dans les premiers travaux effectués, le promoteur induisait un haut niveau d'ARNm dans la plupart des types cellulaires. Toutefois Spitzweg et al. utilisent un promoteur spécifique des cellules de la prostate, puis un second pour cibler l'expression dans cet organe. Cette spécificité d'organe est déterminante pour le succès de ce type de thérapie, car elle permet d'accroître la cytotoxicité du tissu tumoral, tout en minimisant les effets toxiques sur les cellules normales [148].

Après transcription du gène, les tests d'accumulation d'iode ont été étudiés. Les capacités d'accumulation, induites dans les cellules *in vitro* sont mesurées et malgré les importantes variations de la capacité d'accumulation d'une lignée à une autre, les accumulations obtenues sont souvent suffisantes pour détruire ces cellules. Les accumulations d'iode, catalysées par

les cellules implantées chez les souris, sont visualisées par imagerie à l'aide de gamma-caméras. Ces captations d'iode, dépendantes des concentrations extracellulaires en sodium et iodure, sont prolongées après thyroïdectomie préalable de l'animal ou après instauration d'un régime carencé en iode [150].

Les essais de radiothérapie métabolique succèdent à ces tests et des lignées de cellules cancéreuses, d'origines très diverses ont été testées. Les premières expériences de radiothérapie métabolique chez l'animal n'ont généralement pas abouti à une réduction de la masse des cellules tumorales implantées et les réductions de cellules obtenues étaient dues à des doses disproportionnées d'iode 131 [149].

II.3.2.2.1. Dans le cancer du cerveau

Des augmentations du temps de survie des animaux avaient été rapportées par Cho et al. sur des cellules gliales implantées dans le cerveau. Elles étaient dépendantes de la dose utilisée. La même équipe montre, par la suite, que l'utilisation du Rhénium 188 est plus efficace [151].

II.3.2.2.2. Dans le cancer du pharynx

Gaut et al. ont rapporté une régression des cellules tumorales du pharynx exprimant le NIS et implantées dans des souris [152].

II.3.2.2.3. Dans le myélome multiple

Dingli et al. ont obtenu des résultats très encourageants sur des lignées de myélome multiple implantées chez des souris, avec des régressions complètes des tumeurs après une dose unique d'iode 131; ce qui laisse présager une meilleure efficacité de l'irathérapie génique sur les tumeurs radiosensibles [153].

II.3.2.2.4. Dans les hépatocarcinomes

Les résultats, obtenus par Faivre et al. sur des hépatocarcinomes induits chimiquement chez le rat, n'en sont pas moins intéressants, puisque les temps de rétention importants de l'iode obtenus entraînent une réduction complète des métastases avec un effet sélectif sur les

cellules tumorales. Ce phénomène a pu être accentué, dans une étude publiée par Willhanck et al. , par l'utilisation d'un promoteur spécifique des cellules tumorales: le promoteur AFP qui a permis des accumulations d'iode suffisamment élevées pour induire, d'une manière sélective, un effet thérapeutique sur les cellules cancéreuses du foie. Kim et al. ont testé avec succès un autre promoteur (hTERT) sur des lignées cellulaires de cancer du foie. Ma et al. utilisent, eux, un promoteur spécifique du carcinome hépatocellulaire associé à un amplificateur (AdPLEN), qui s'est avéré très efficace pour induire de fortes accumulations d'iode. Un nouveau promoteur chimérique (EIIAPA), élaboré par Liu et al., a également permis d'augmenter le transport d'iode radioactif dans les cellules cancéreuses du foie. L'association à une autre stratégie basée sur d'autres gènes suicide, dans une étude menée par Lee et al. semble potentialiser l'effet de cette approche sur les carcinomes hépatocellulaires [154].

II.3.2.2.5. Dans le cancer de la prostate

Spitzweg et al. avaient rapporté un premier promoteur spécifique des cellules de la prostate et puis un second, pour cibler l'expression du NIS dans cet organe. Mitrofanova et al. obtiendront un arrêt de l'accroissement de la tumeur et une augmentation de la survie des animaux avec un promoteur non spécifique. Willhauck et al. suggèrent un effet thérapeutique supérieur du rhénium 188 sur les grandes tumeurs de la prostate, par rapport à l'iode 131. La même équipe publie par la suite, un travail sur l'utilisation de l'astate 211 et son effet thérapeutique potentiel sur les tumeurs de petite taille. Plus récemment (en 2011), Navarra et al. considèrent que la présence du NIS pourrait éventuellement être utile pour définir les personnes avec un cancer de la prostate biologiquement actif. L'activité antitumorale d'un virus oncolytique de la rougeole, conçu pour exprimer le NIS sur le cancer de la prostate, se voit renforcée par l'administration d'iode 131, dans une étude menée par Msaouel et al. et dans une deuxième étude par Trujillo et al.; ce qui suggère une nouvelle thérapie multimodale pour ce type de cancers [155].

II.3.2.2.6. Dans le cancer du sein

La stimulation indirecte de l'expression du NIS par l'acide rétinoïque, dans le cancer du sein, est très bien documentée. Willhauck et al. utilisent avec succès ce dernier en association avec

la dexaméthasone pour induire de fortes accumulations d'iode. Récemment (en 2010), Alotaibi et al. proposent un nouveau mécanisme direct par lequel l'acide rétinoïque induit la transcription du gène du NIS. Toujours dans le but d'augmenter les capacités d'accumulation d'iode, Trujillo et al. utilisent avec succès un promoteur mucin 1 (MUC-1) qui pourrait permettre d'étendre cette approche aux cancers du sein surexprimant la glycoprotéine MUC-1. La forte expression du NIS, constatée par Renier et al. sur une proportion significative de cellules de cancer du sein triple négatif, suggère un rôle potentiel de cette approche sur cette tranche de patients. La constatation, par la même équipe, d'une expression fréquente de la protéine NIS sur les métastases cérébrales de cancers du sein permettrait d'appliquer cette approche à ce type de métastases. Ekaterina et al. montrent sur un modèle de souris, que le rhénium 188 est plus efficace sur le cancer du sein que l'iode 131, avec moins d'effets sur la fonction thyroïdienne [156].

II.3.2.2.7. Dans les tumeurs neuroendocrines

Les résultats, obtenus dans l'étude publiée par Schipper et al., montrent une diminution significative du volume des tumeurs neuroendocrines exprimant le NIS, après traitement par l'iode 131 ou le technétium 99 m. Ries et al. démontrent qu'il serait également possible de traiter ces tumeurs par le rhénium 186 [157].

II.3.2.2.8. Dans le cancer du pancréas

Cette approche pourrait également être étendue aux tumeurs du pancréas et à toutes les tumeurs MUC-1 positif, en utilisant le promoteur MUC1, comme il a été démontré dans les études menées par Dwyer et al., ainsi que par Chen et al. et par Zhou et al. Carlson et al. démontrent le potentiel oncolytique d'un virus de la rougeole, conçu pour exprimer le NIS (MV-NIS), sur le cancer du pancréas. La distribution intratumorale non uniforme de l'infection par le virus (MV-NIS) constitue, toutefois, un obstacle à une éventuelle radiovirothérapie combinée utilisant le NIS dans les cellules cancéreuses du pancréas, selon une étude publiée, en 2010, par Penheiter et al [158].

II.3.2.2.9. Dans le mésothéliome

Cette thérapie multimodale a en revanche, permis d'optimiser l'effet de cette virothérapie sur des cellules de mésothéliome dans une étude réalisée par Li et al [159].

I.3.2.2.10. Dans les autres cancers de la thyroïde

Spitzweg et al. rapportent l'effet thérapeutique de l'iode 131 sur le cancer médullaire de la thyroïde, grâce à un promoteur carcinoembryoncantigen (CEA), par induction des accumulations d'iode dans ces cellules. L'association de cette stratégie, à une autre thérapie génique accentue son effet cytotoxique sur le cancer anaplasique de la thyroïde, selon l'étude réalisée par Lee et al. une autre perspective d'optimisation de cette approche est son association avec la radiothérapie externe. Hingorani et al. ont constaté que la radiothérapie externe augmentait le niveau et la durée d'expression du gène *NIS*. Ils démontrent, dans une étude plus récente (en 2010), que cette association serait une stratégie idéale pour exploiter les bienfaits des nouveaux radiosensibilisants.

Enfin, il faut noter que dans le cadre de l'irathérapie génique utilisant le NIS, la glande thyroïde peut être protégée par un prétraitement hormonal [160].

II.4. Limites et perspectives d'amélioration

Les capacités d'accumulation obtenues sont très faibles pour envisager, à l'état actuel, un traitement par radiothérapie métabolique à l'iode 131 des cancers non thyroïdiens. Il reste, en effet beaucoup d'améliorations à apporter à cette stratégie. Certaines sont communes à toutes les approches de thérapie génique, comme l'amélioration de la vectorisation par la recherche de nouvelles particules virales plus efficaces et plus spécifiques. Le développement de tels vecteurs est actuellement réalisé par de nombreuses équipes. Un autre aspect à évaluer est l'absence de nocivité des systèmes de transvection pour l'organisme receveur. Les nouveaux polymères biodégradables, en tant que vecteurs non viraux hautement efficaces, semblent les plus prometteurs pour le développement d'une stratégie de thérapie génique sûre et efficace. Klutz et al. démontrent que l'utilisation des nouveaux polymères non viraux pour le transfert du gène *NIS* induisait une efficacité thérapeutique de l'iode 131 sur les neuroblastomes. Le

succès, qu'ils ont obtenu, récemment en 2011, avec les mêmes polymères couplés à un ligand EGFR spécifique, représente une stratégie novatrice prometteuse pour la thérapie génique utilisant le NIS dans les cancers métastatiques. De même, la découverte d'autres promoteurs spécifiques de tumeurs permettrait de cibler l'expression du NIS pour une meilleure efficacité. L'activité de transcription de la majorité de ces promoteurs spécifiques étant faible, il est possible de l'augmenter par la construction de promoteurs chimériques ou l'amplification en deux étapes de la transcription [161].

Plus spécifiquement, et en complément de l'obtention de l'expression du gène et de la protéine, l'efficacité de la radiothérapie métabolique passe par l'obtention de transporteurs fonctionnels à la membrane plasmique, permettant d'induire de fortes accumulations d'iode, et cela dans tous les types cellulaires. En effet, de fortes variations dans les capacités d'accumulation ont été observées dans les lignées tumorales d'origines diverses. Des différences entre niveaux d'expression du NIS et niveaux d'accumulation d'iode ont été, également, observées dans des cellules exprimant de façon endogène le transporteur [162]. Cela suggère une meilleure connaissance des régulations transcriptionnelles, mais également post-transcriptionnelles, du NIS modulant son activité dans les cellules cibles. Dans ce contexte, Pourcher et al. ont identifié des sites de phosphorylation importants pour le contrôle et l'adressage de la protéine de souris. Ils ont également généré toute une collection de mutants testés pour leur capacité à échapper aux régulations des cellules hôtes. La même équipe a élaboré des transporteurs chimériques, en conservant une séquence protéique correspondant essentiellement à celle de l'homme, pour corriger la faible capacité de transport. Ils ont également identifié un transporteur AIT impliqué dans la sortie de l'iode au pôle apical des thyrocytes. Kogai et al. démontrent que l'inhibition de la voie PI3 K de signalisation augmentait l'expression du NIS et par conséquent l'effet thérapeutique de l'iode 131 sur les lignées cellulaires de cancer différencié de la thyroïde [163].

L'étude, réalisée par Jung et al., démontre aussi que le contrôle des voies de signalisation peut contribuer à améliorer l'efficacité de la radiothérapie à l'iode sur les cancers, par la régulation de la fonction du NIS [162].

Une des limitations, rapportée dans nombre d'essais réalisés est le temps de rétention des radioisotopes. Des auteurs ont montré que le lithium pouvait ralentir la vitesse d'efflux de l'iode *in vitro* et sur les cellules implantées dans des souris. Toutefois le temps de rétention de l'iode reste un phénomène complexe. En effet, l'organisation tridimensionnelle des cellules et leur irrigation sont des paramètres à considérer lorsque la thérapie génique est appliquée dans un contexte clinique. Les expériences menées par Faivre et al. en sont la preuve, puisque le temps de rétention de l'iode dépassait les 11 jours pour des hépatocarcinomes chimiquement induits chez le rat. Certaines équipes ont tenté la transvection du gène de la thyroperoxydase, couplée à celle du gène NIS, avec comme objectif de promouvoir la rétention du radioisotope par une organification. Toutefois, cette stratégie pose le problème lié à l'activité de l'enzyme dans les cellules. Une autre perspective d'amélioration consiste à utiliser des substrats du NIS autres que l'iode 131, comme le rhénium 188 sous la forme de perrhénate, le rhénium 186 ou encore l'Astate 211, émetteur alpha de haute énergie. Ces substrats du NIS ont des périodes physiques plus courtes, compatibles avec des temps de rétention plus réduits que dans la thyroïde, et des émissions de plus haute énergie que l'iode 131, leur conférant un pouvoir destructeur plus important du tissu tumoral. Ils ont déjà permis de potentialiser l'effet de l'irathérapie génique dans les études réalisées et devraient aboutir à une meilleure efficacité thérapeutique [163].

Bien que l'instrumentation utilisée dans ces essais de thérapie génique, permette des études de qualité avec une résolution spatiale de l'ordre du millimètre, il est important d'augmenter encore la sensibilité et la résolution pour développer les études sur des tumeurs de petite taille et sur les rongeurs. Il est également nécessaire d'accroître le nombre de plateformes d'imagerie équipées de caméras TEMP, particulièrement pour l'expérimentation animale. Il est tout aussi important de développer les moyens nécessaires pour parvenir à effectuer des mesures plus quantitatives [164].

Enfin, l'amélioration de cette stratégie de thérapie passe également par la gestion de la variabilité de métabolisme selon l'origine cellulaire et l'état de différenciation [163].

La relative facilité d'utilisation de l'iode radioactif, sa bonne efficacité, la disponibilité des structures nécessaires aux premiers essais cliniques, associées au nombre croissant de travaux de recherche faisant suite à la découverte du symporteur, offrent un potentiel séduisant pour le traitement des cancers par thérapie génique. Toutefois, les perspectives d'application clinique exigent que beaucoup d'améliorations soient apportées à cette stratégie, notamment la connaissance des mécanismes de régulation de l'expression et la fonctionnalité du NIS. Cette approche semble, à la lumière des travaux réalisés, particulièrement adaptée à certains cancers radiosensibles et aux hépatocarcinomes. Son développement permettrait d'optimiser la prise en charge des cancers thyroïdiens et d'offrir une autre alternative thérapeutique aux cancers non thyroïdiens, lorsque les possibilités thérapeutiques disponibles auraient échoué. Le développement de moyens pour effectuer des mesures plus quantitatives rendrait possible, en plus, une thérapie individualisée. Selon les études réalisées, son utilisation dans le cadre d'une thérapie multimodale serait une perspective très intéressante [165].

Le bilan est mitigé, car malgré la multitude d'études précliniques, nous ne disposons que de peu d'informations quant à la sécurité et à l'efficacité des approches de thérapie génique pour le traitement des cancers. L'efficacité thérapeutique et la toxicité du traitement dépendent grandement du gène thérapeutique choisi, du type de vecteur utilisé, de la dose et du mode d'administration, et du type de tumeur traité. Il faut noter que la plupart de ces essais cliniques ont été menés chez des malades présentant des tumeurs avancées, ayant progressé malgré un traitement par chimiothérapie et donc peut-être au-delà de toute ressource thérapeutique. Des efforts considérables ont été réalisés depuis une dizaine d'années, tout particulièrement en France, aux États-Unis et au Royaume-Uni, afin de rendre possible l'application de la thérapie génique en clinique humaine. Les résultats actuels ne sont pas encore à la hauteur des espoirs que suscitait au départ cette nouvelle approche thérapeutique. Néanmoins, un examen objectif de ce qui a déjà été atteint permet d'être raisonnablement optimiste pour l'avenir. Les études tant expérimentales que cliniques effectuées jusqu'à présent ont permis de cerner les principales difficultés inhérentes au développement de la méthode : le manque d'efficacité du transfert de gène semble une cause essentielle d'échec à ce jour. Dans le cas de traitement de tumeurs malignes, notamment du tractus digestif, il sera nécessaire de poursuivre

l'identification des gènes codant pour des protéines dont l'absence ou l'insuffisance de production jouent un rôle déterminant dans le développement de la maladie [166].

Enfin, l'approche combinée en particulier avec la chimiothérapie et/ou la radiothérapie est une voie très prometteuse. De manière générale les approches combinées « biothérapies » (comprenant la thérapie génique) chimiothérapies, radiothérapie voir chirurgie sont une voie d'avenir pour les cancers digestifs avancés ou métastatiques [167].

Chapitre III
NOUVELLES APPROCHES
DANS LES
THERAPEUTIQUES
CIBLEES



III.1. Les récepteurs des facteurs de croissance de type insuline (IGF) et les cyclines

Dernièrement l'arsenal anticancéreux s'est enrichi d'une nouvelle famille de molécules, les thérapies ciblées. Elles résultent des progrès de la biologie qui ont permis de mieux appréhender les molécules et les voies de signalisation prépondérantes dans les cellules tumorales. Ainsi, les avancées thérapeutiques ne reposent plus sur une approche empirique comme pour les cytotoxiques conventionnels mais sur une véritable ingénierie pour bloquer les cibles déterminées par la recherche fondamentale. La connaissance fine des phénotypes tumoraux et les thérapies ciblées permettent de proposer de véritables traitements à la carte aux patients. Dans cette partie nous allons détailler deux nouvelles voies en cours d'exploration et porteuses d'espoir: la voie du récepteur du facteur de croissance de type insuline (IGF1R) et le ciblage des cyclines impliquées dans le cycle cellulaire [168].

III.1.1. Insulin-like growth factor receptors de type I (IGF1R)

III.1.1.1. Structure moléculaire et physiologie:

La structure des IGFR, surtout leur sous-unité, est proche de celle des récepteurs à l'insuline. Ainsi les thérapies ciblant IGF1R doivent être très spécifiques et seules des molécules répondant à ce critère seront sélectionnées pour un éventuel développement.

En effet, il est hors de question d'interagir avec le métabolisme glucidique dont les perturbations sont responsables de nombreuses pathologies comme le diabète ou les hypoglycémies [169].

Le lien des IGF sur leurs récepteurs est modulé par les IGF binding proteins (IGFBP) dont il existe six isoformes. Leur rôle est complexe, car elles augmentent la demi-vie des IGF et donne leur effet biologique, mais comme leur affinité pour les IGF est très supérieure à celle des IGFR, elles peuvent séquestrer les IGF et exercer un contrôle négatif [170].

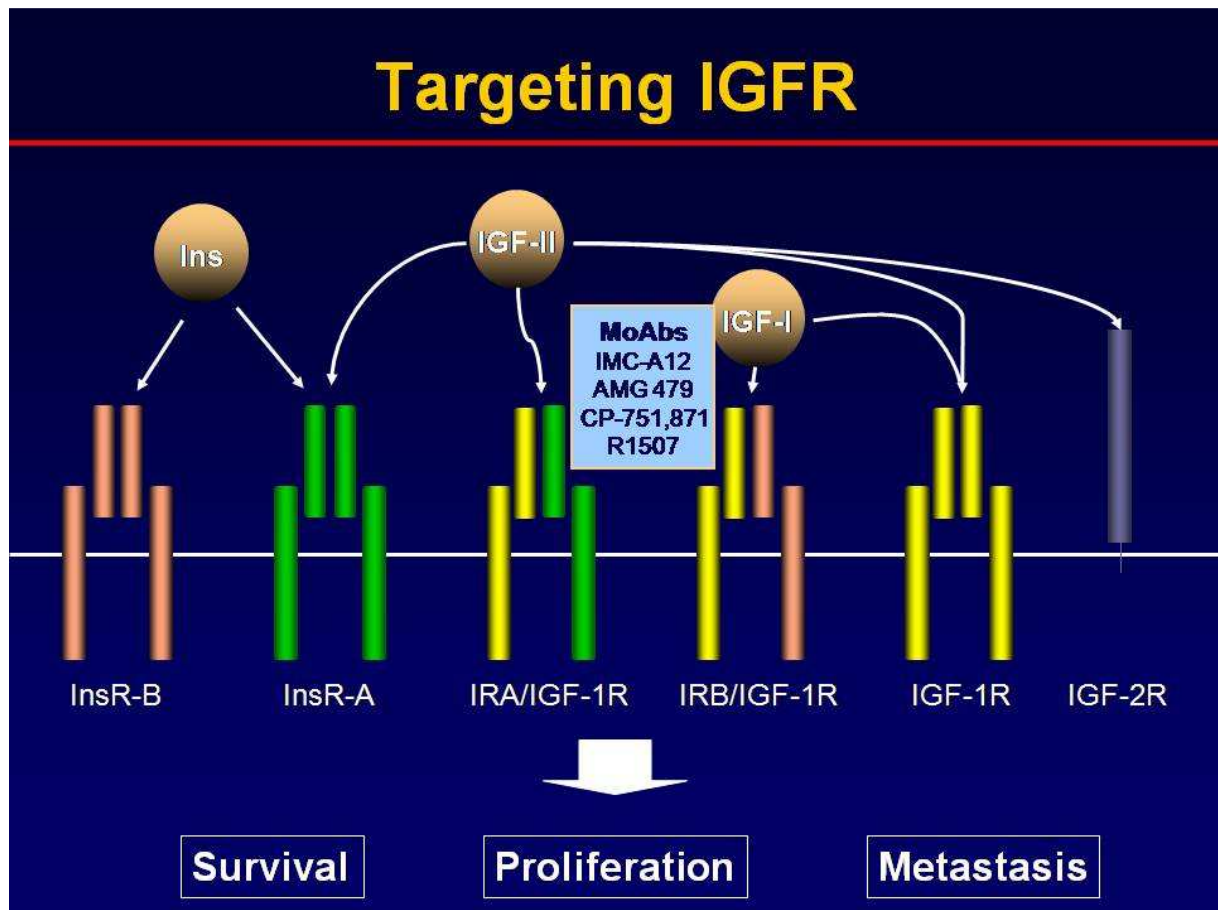


Figure 33: Ciblage des IGFR [171]

La liaison du ligand avec l'IGF1R induit une modification conformationnelle du récepteur et une autophosphorylation des trois résidus tyrosine kinase en position 1131, 1135 et 1136 de chacune des sous-unités 13. Cette phosphorylation initie la transduction du signal via les voies de la MAPK (Ras/Raf/Mitogen Activated Protein Kinase) et de la PI3K-protein kinase B (PKB). IGF1R n'est pas un oncogène en tant que tel, mais il régule positivement la prolifération, la différenciation, la survie cellulaire, et favorise les métastases.

Les IGF1 et IGF2 sont produits essentiellement dans le foie et ont une action endocrine sur les cellules tumorales [172].

Des données expérimentales ont montré l'effet antitumoral des traitements dirigés contre IGFR (Figure 33), permettant le développement de thérapies ciblées, d'autant plus que de

nombreux cancers (mammaires, colorectaux, pulmonaires, prostatiques...) surexpriment les IGF1R et/ou ont une activité IGF1R augmentée.

Comme pour les autres types de thérapies ciblées, le blocage de la voie visée peut se faire à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-IGF1R qui empêchent la liaison IGF1 ou IGF2 (endocrine et paracrine) avec l'IGF1R, ou d'inhibiteurs de tyrosine kinases qui bloquent l'initiation de la transduction du signal, ces molécules sont encore en cours de développement [173].

III.1.1.2. Anticorps anti IGF1R

En 2008, 5 anticorps anti IGF1R étaient en développement clinique. Nous rapportons ici quelques résultats précliniques.

EM164 est un des premiers anticorps murins démontrant une efficacité *in vitro*. Il empêche la transautophosphorylation de IGF1R, inhibe la prolifération induite par IGF1 ou IGF2, arrête le cycle cellulaire et stimule l'apoptose de diverses lignées cancéreuses (sein, poumon, colon, col utérin, ovaire, pancréas, mélanome, prostate, neuroblastome, rhabdomyosarcome, ostéosarcome).

In vivo, l'EM164 ralentit la croissance tumorale de tumeurs pancréatiques humaines (BxPC-3) implantées dans des souris SCID. L'effet est potentialisé par la gemcitabine. Alors que l'anticorps n'interagit pas avec le récepteur de l'insuline (condition nécessaire pour la poursuite de son développement), des études *in vivo* montrent malgré tout qu'il entraîne une diminution de l'expression du récepteur de l'insuline ainsi qu'une inhibition fonctionnelle (il n'est plus phosphorylé en présence d'insuline). Ce phénomène est expliqué par la formation d'heterodimères entre IGF1R et le récepteur à l'insuline. On ignore à ce jour les conséquences de la formation de ces heterodimères en clinique [174].

L'anticorps humain A12 reconnaît les IGFR avec une haute affinité et inhibe leur liaison avec les IGF spécifiques de l'IGF1R, il ne lie pas les récepteurs à l'insuline. *In vitro* son action est double, il entraîne une diminution des phosphorylations donc de l'activité des protéines de la transduction du signal des voies MAPK et PI3K. Ils induisent également une internalisation des IGF1R1 conduisant à leur dégradation et de facto à une diminution de leur expression sur la surface cellulaire. Il inhibe la prolifération de différentes lignées tumorales [172].

In vivo l'efficacité de cette molécule a été démontrée sur différents modèles de xénogreffes. La croissance tumorale de lignées mammaires (MCF 7), pancréatiques (BxPC-3), rénale (Caki I) ou colique (Colo 205) est fortement ralentie par A12. Il a été observé une diminution des marqueurs de la prolifération tumorale (Ki67), une augmentation de l'apoptose. Les expériences sur des lignées prostatiques xénogreffées montrent un arrêt du cycle cellulaire à un stade différent selon la sensibilité aux androgènes: en G1 pour la lignée dépendante et en G2 pour la lignée indépendante. Cet anticorps augmente l'efficacité du docetaxel sur des lignées tumorales de prostate. De même, le blocage de l'IGF1R est synergique avec la radiothérapie sur diverses lignées [174].

D'autres anticorps sont en cours de développement. On peut citer le CP 751, 871 le h7C10 (F50035), le MK-0646, IgG humaines hautement spécifiques, le 19D12 ou le ScFv-Fc-IGF1R. Ces anticorps reconnaissent l'IGF1R et inhibent leurs liaisons avec les IGF. Ils bloquent ainsi la transphosphorylation des sous-unités I, puis la phosphorylation des protéines de la transduction du signal. Comme on l'a vu précédemment, ces anticorps entraînent l'internalisation et la dégradation du récepteur donc une diminution de son expression à la surface de la cellule. Le ScFv-Fc-IGF1R a la particularité d'entraîner une activation de l'IGF1R dans un premier temps avant de le bloquer [174].

Tous ces anticorps montrent une action inhibitrice in vitro ou dans des modèles de xénogreffes sur des lignées tumorales de divers types. Il est important de noter que l'action inhibitrice est synergique avec la chimiothérapie cytotoxique [172].

Par exemple l'effet de la doxorubicine est fortement augmenté sur une lignée d'ostéosarcome implantée chez des souris avec l'ajout du CP 751,871. On observe le même phénomène en traitant des lignées de cancer colique avec du 5FU. L'effet synergique est observé avec d'autres types de traitements anticancéreux, en effet, toujours avec le CP 751-871, ou avec le ScFv-Fc-IGF1R, on observe une potentialisation du tamoxifène dans des modèles de xénogreffes avec des lignées de cancer du sein hormonodépendantes. La synergie s'observe également avec les autres thérapies ciblées. En effet, le traitement de xénogreffes de cancers pulmonaires non à petites cellules par l'anticorps h7C10 montre une certaine efficacité. On observe une réponse quasi complète chez les souris en associant au h7C10 la vinorelbine ou le C225 anticorps dirigé contre l'EGFR [175].

Cette synergie avec l'EGFR a conduit au développement d'un anticorps bispécifique original humain, de type IgG, appelé Di-diabody. Il contient les régions variables de deux anticorps, un dirigé contre l'EGFR et l'autre contre l'IGFR. Des études in vitro ont montré qu'il bloquait bien la transduction du signal de deux voies et qu'il induisait aussi une internalisation de l'IGF1R. In vivo, sur des modèles de xénogreffes, les effets inhibiteurs sur la prolifération tumorale sont particulièrement intéressants [176].

Plusieurs de ces anticorps sont actuellement en développement clinique, avec des premiers résultats encourageants dans les cancers bronchiques, mais aussi, en monothérapie, dans des tumeurs décrites comme dépendantes de l'IGF1, notamment les sarcomes d'Ewing et les rhabdomyosarcomes. Des réponses prolongées dans des sarcomes d'Ewing réfractaires ont été notamment rapportées en 2007 dans un essai de phase 1. Plusieurs essais sont actuellement en cours pour explorer ces médicaments en monothérapie, et en combinaison avec des chimiothérapies cytotoxiques en première et deuxième lignes [175].

III.1.1.3. Inhibiteurs de tyrosine kinase

***NVP-ADW742**

C'est un inhibiteur de tyrosine kinase très spécifique d'IGF1R. In vitro, sur des lignées de cellules myéломatoses résistantes aux traitements conventionnels, le NVP-ADW742 stimule l'apoptose en diminuant les inhibiteurs des caspases. Des études protéosomique montrent une activation pléomorphe des effecteurs moléculaires antiprolifératifs ou proapoptotiques. Ces effets ont été confirmés in vivo, chez la souris, en stoppant la croissance tumorale et en prolongeant la survie, sans toxicité associée significative [176].

Cet inhibiteur a montré une synergie avec le melphalan. Une autre étude a montré également une synergie du NVP-ADW742 avec la carboplatine et l'étoposide en traitement de tumeurs établies à partir de lignées de cancer pulmonaire non à petites cellules.

Une molécule similaire, le NVP-AEW541 a montré une efficacité sur des cellules de neuroblastome [177].

***Cyclolignan PPP**

Cet inhibiteur de la tyrosine kinase est spécifique de la tyrosine 1136 et n'affecte pas les tyrosines 1131 et 1135. Ainsi, c'est la voie PI3K/Akt qui est principalement inhibée.

Une étude sur des lignées de myélome a montré que le traitement par le cyclolignan PPP bloque les cellules en phase G2/M et induit l'apoptose. L'effet est durable et il n'a pas été observé ou très peu de résistance à long terme, et une diminution de l'angiogenèse in vivo a été démontrée, avec dans une étude une diminution de 60 % de la densité de micro vaisseaux.

Tous ces médicaments décrits sont en cours de développement préclinique et certains en début de phase 1 [178].

III.1.2. Cyclines et kinases dépendant des cyclines: modulations du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire se compose de cinq phases:

G₀ (phase de quiescence)

G₁ (la cellule se prépare à la duplication de son ADN)

S (réplication de l'ADN)

G₂ (préparation à la mitose)

M (Mitose).

La succession de ces phases est régulée par des protéines serine/thréonine kinases dites kinases dépendant des cyclines (CDK). Le taux de cyclines contrôle l'activité de ces CDK.

Les cyclines se regroupent en deux grandes familles: la famille START (cyclines C, D -D1, D2, D3 et E) régule la phase G₁ et la transition G₁/S avant le point de restriction, et la famille des cyclines mitotiques (cyclines A et B) régule la transition G₂/M. Après le point de restriction, la cellule n'est plus soumise aux facteurs de croissance et elle entre inexorablement en mitose [179].

Les signaux mitotiques extracellulaires empruntent les voies de transduction RAS/RAF/MAPK pour permettre la production et l'accumulation de cyclines D qui se lient aux CDK4 et CDK6 pour commencer à phosphoryler la protéine Rb. Initialement la protéine Rb hypophosphorylée est liée au facteur de transcription E2F1 qui est alors inactif hormis pour la transcription de la cycline E. Cette cycline s'accumule, se lie à CDK2 qui phosphoryle Rb.

À l'état phosphorylé, Rb libère E2F1 qui peut alors transcrire les protéines de la phase S. Lors de cette phase S, les cyclines D et E, après ubiquitination, sont dégradées par le protéasome, alors que la cycline A s'accumule et se lie au CDK2 pour permettre la progression dans la phase S et neutraliser E2F1 par phosphorylation. En fin de phase S, la cycline B s'accumule, se lie à CDKI pour préparer le passage en mitose. Ce complexe active également la survivine protéine impliquée dans la survie cellulaire. Au cours de la mitose, la cycline B est dégradée et les cyclines E et D peuvent recommencer à être produites [180].

Les complexes cycline-CDK sont sous la dépendance de régulateurs du cycle cellulaire, les inhibiteurs des CDK (CDKI). Les protéines inhibitrices des kinases (KIP) comprennent p21waf1, p27kip1 et p57kip2, sous la dépendance de p53 et inhibent les complexes cyclines E ou A-CDK2. Les protéines de la famille des ink4 (pour inhibiteurs des CKK4) regroupent p15Ink4b, p16Ink4a, p19Ink4c et p19Ink4days qui inhibent les kinases associées aux cyclines D (CDK2, CDK4 et CDK6) [179].

Dans les cellules cancéreuses, les points de restriction du cycle cellulaire sont déficients. Ceci peut être dû à un déficit en CDKI ou au contraire à la surexpression de cyclines. Par exemple, dans de très nombreux cancers (mélanome, poumon, sein, colorectal), le gène de p16Ink4 est non fonctionnel à la suite d'une hyperméthylation de son promoteur qui inhibe sa transcription. De même, on observe souvent une hyper expression de la cycline D1.

Le ciblage des CDK ou des cyclines offre donc des potentialités importantes dans le traitement des cancers [180].

III.1.3. Molécules inhibitrices des CDK

III.1.3.1. UCN-O1

Cet inhibiteur de la PKC (protéine kinase C) arrête les cellules en phase G et S en induisant le CDKI p21waf qui déphosphoryle CDK2 et empêche ainsi la phosphorylation de Rb et la libération de E2F1. L'UCN-O1 supprime aussi le point de restriction en G2 autorisant l'entrée en mitose de cellules avec des dommages de l'ADN (surtout en association avec les chimiothérapies) ce qui conduit à l'apoptose. L'administration de la drogue doit être continue sur plusieurs jours.

Dans une étude de phase I chez 47 patients, l'hyperglycémie s'est révélée d'une toxicité limitante. On note également une toxicité pulmonaire, des hypotensions et des vomissements. Il a été observé une réponse partielle pour un mélanome et une réponse complète pour un lymphome. D'autres parts des essais d'association à la chimiothérapie ont été menés avec succès, même si on a pu craindre initialement que d'arrêter le cycle cellulaire puisse être un moyen de résistance de la cellule tumorale aux antimétabolites, en particulier les antimétabolites comme le 5FU ou le gemcitabine. L'UCN-O1 doit donc être administré après la chimiothérapie,

Une autre étude de phase I a inclus 35 patients 21 avec un cancer colique et 26 prétraités par 5FU pour recevoir une perfusion hebdomadaire de 5FU pendant 24 h suivie d'une perfusion de 135 mg/m² d'UCNO1 pendant 72 h (puis 67,5 mg/m² pendant 36 h les cycles suivants).

En plus des toxicités citées ci-dessus, on retrouve des syncopes et des arythmies comme effets indésirables. Sept patients ont été stabilisés (dont six prétraités par 5FU).

Dans une autre étude qui a associé l'UCN-O1 à l'irinotecan chez onze patients résistants à l'irinotecan, la tolérance a été acceptable et six stabilisations ont pu être obtenues.

Enfin une étude sur des cellules de leucémie ou de myélome a montré une forte synergie en associant à l'UCN-O1 une statine qui agit en inhibant l'activation de Ras [181].

III.1.3.2. Flavopiridol

Le flavopiridol est un inhibiteur de kinase avec une forte affinité pour les CDK (1, 2, 4, 6). Dans des lignées tumorales, il arrête le cycle cellulaire et induit l'apoptose (par induction des caspases et inhibition des protéines antiapoptotiques) (**Figure 34**). Le schéma d'administration initial sur plusieurs jours en continu a pu être simplifié à des perfusions d'une heure. Dans une phase I chez 76 patients, les principaux effets secondaires étaient asthénie, diarrhée, hypotension artérielle et accidents thromboemboliques. Une réponse partielle dans un cancer du rein et des stabilisations dans un lymphome, un cancer rénal et un cancer colique ont été observées. Une phase II a donc été menée dans des cancers rénaux, mais elle s'est révélée improductive. Le flavopiridol est également inefficace en phase II dans les cancers gastriques ou des sarcomes. L'association avec la chimiothérapie a été testée [182].

Dans une étude de phase I, 27 patients recevaient du docetaxel suivi de flavopiridol cinq réponses partielles dans des cancers du pancréas, du sein ou de l'ovaire et dix stabilisations (dont quatre cancers du pancréas) ont été observées.

Une autre étude de phase I a inclus 51 patients pour recevoir de l'irinotecan suivi 7 heures plus tard de flavopiridol. La toxicité hématologique et les diarrhées ont été notablement accrues. On a observé 3 réponses partielles et 18 stabilisations supérieures à six mois.

Finalement, les essais cliniques de phase II se sont révélés insuffisants et le développement de ce produit est actuellement arrêté. Il est probable que des études fondamentales ou de recherche de transfert aient été insuffisantes: le schéma optimal n'a pas vraiment pu être déterminé et aucun marqueur intermédiaire n'a été défini pour juger de sa réelle efficacité [183].

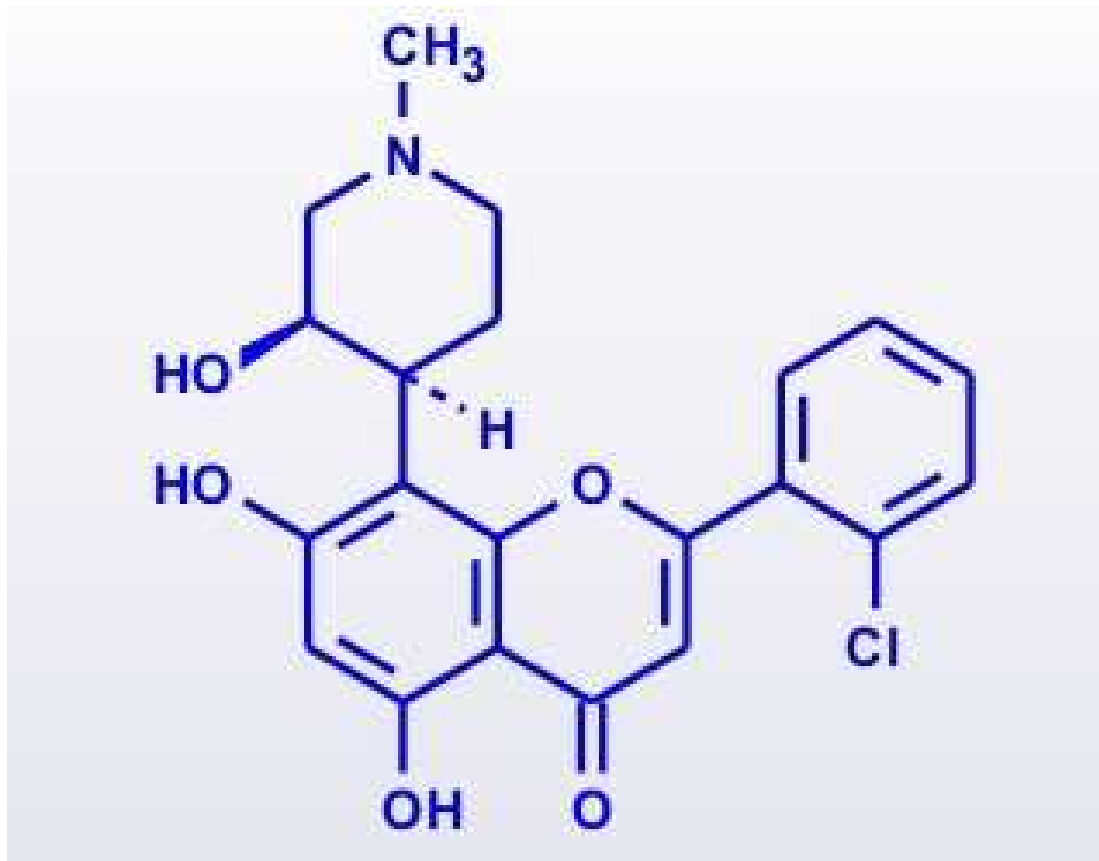


Figure 34: Structure du Flavopiridol [184]

III.1.3.3. E7070

E7070 (**Figure 35**) entraîne une déplétion du stock de cycline E, induit p21 et p53 et inhibe la phosphorylation de CDK1 [185].

En phase I, les effets secondaires limitants sont des leucopénies, thrombopénies, anémies, colites et diarrhées. Une étude de phase II a testé le E7070 sur des cancers ORL (une perfusion d'une heure toutes les 3 semaines), mais a été prématurément arrêtée car aucun patient n'a survécu plus de 4 mois.

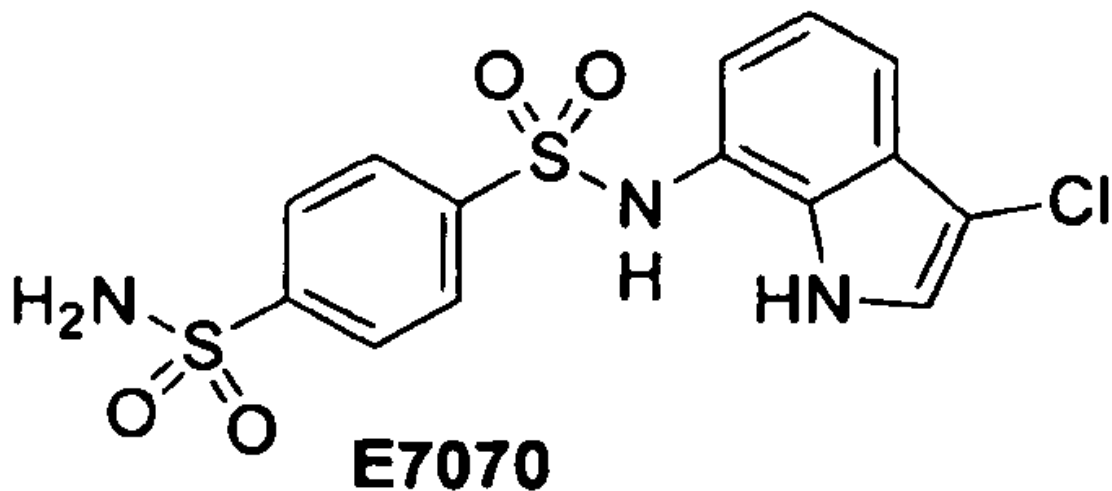


Figure 35: Structure de l'E7070 [186]

Une étude de phase I a montré qu'il pouvait être associé au carboplatine. Il a cependant été démontré une inhibition de la phosphorylation de Rb sur des biopsies après traitement. Ainsi, la modification du schéma d'administration pourrait améliorer les résultats cliniques [187].

III.1.3.4. Autres molécules

La roscovidine (CYC202) est un inhibiteur de tyrosine kinase particulièrement actif contre les CDK1, CDK2 et CDK5. Elle est administrée oralement en deux prises quotidiennes, cinq jours de suite toutes les trois semaines. Une étude de phase I a inclus 29 patients. Les effets secondaires observés étaient représentés par les vomissements, l'hypokaliémie et l'augmentation de la créatinine. Sur les 29 patients traités, seuls trois stabilisations ont été observées [188].

***Le BMS-387032 :**

C'est également un inhibiteur de CDK2.

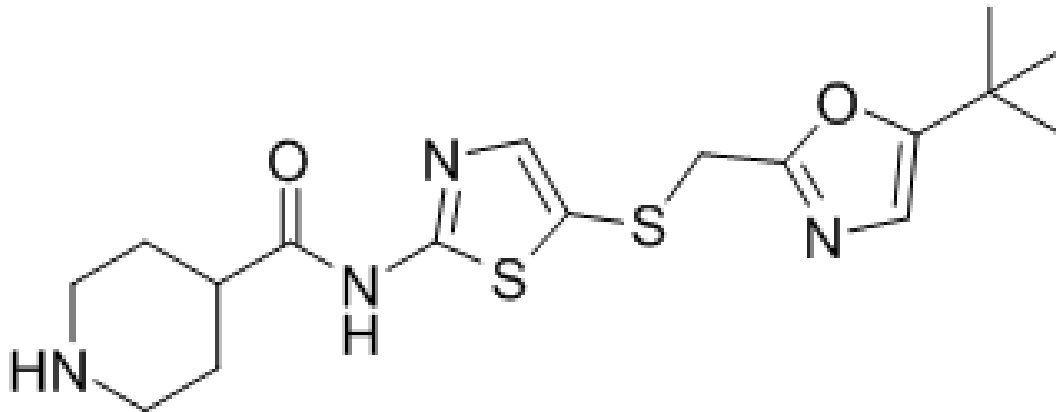


Figure 36: Structure du BMS-387032 [189]

Il a été administré en phase I chez 36 patients par perfusion d'une heure toutes les trois semaines. Les effets secondaires étaient l'asthénie, les nausées, les vomissements, la diarrhée, et la constipation. Il a été observé cinq stabilisations (2 cancers du rein, 1 cancer pulmonaire, 1 myosarcome, 1 cancer ORL). Il existe d'autres approches pour interférer avec les cyclines. L'une d'elles est l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome qui intervient pour la dégradation des cyclines ubiquitinées, Le bortezomib, inhibiteur du protéasome, montre une bonne efficacité dans les myélomes [190].

Le champ d'investigation des thérapies ciblées s'est donc considérablement élargi avec le ciblage des voies de l'IGFIR et des cyclines. Le développement des produits contre ces voies en est actuellement à ses débuts. Ils ont essentiellement une action cytostatique et montrent peu d'efficacité en monothérapie. Les associations à la chimiothérapie semblent prometteuses [191].

III.2. CTLA-4 et Toll-like récepteurs: de nouvelles cibles en immunothérapie

Plusieurs données cliniques suggèrent que la modulation des réponses immunitaires peut être une stratégie antitumorale efficace. L'administration de BCG est reconnue comme un traitement efficace des cancers superficiels de la vessie. Par analogie avec les vaccinations contre certains pathogènes intracellulaire, des protocoles de vaccination ont utilisé le BCG comme adjuvant et permis l'obtention de résultats cliniques intéressants. L'allogreffe de cellules hématopoïétiques a montré de longue date sa capacité à éradiquer des maladies leucémiques réfractaires aux traitements conventionnels. Récemment, l'introduction des anticorps monoclonaux dans l'arsenal thérapeutique de l'oncologie médicale et de l'hématologie a étayé l'importance du système immunitaire antitumoral. Ces résultats ont motivé un plus ample développement des biothérapies favorisant les réponses immunitaires antitumorales, ainsi, nous aborderons ici les données fondamentales et cliniques concernant l'utilisation de ligands agonistes des récepteurs de la famille TOLL et des anticorps neutralisant la molécule CTLA-4 [192].

III.2.1. Rappels

Le système immunitaire comprend l'ensemble des mécanismes biologiques qui agissent conjointement pour protéger l'organisme des agressions pathogènes extérieures (virales, bactériennes, parasitaires ou fongiques). Cette protection est possible grâce à la discrimination entre les cellules saines de l'individu (le soi) et les cellules infectées, potentiellement dangereuses pour l'organisme (le non-soi). L'immunité peut être divisée en deux compartiments distincts, l'immunité innée et l'immunité adaptative.

L'immunité innée comprend les barrières biologiques (peau, muqueuse), les systèmes du complément et de l'inflammation et les cellules lymphocytaires à cytotoxicité naturelle (NK), macrophages, cellules dendritiques et autres lymphocytes à TCR invariants. L'immunité adaptative est composée des lymphocytes T et B [193].

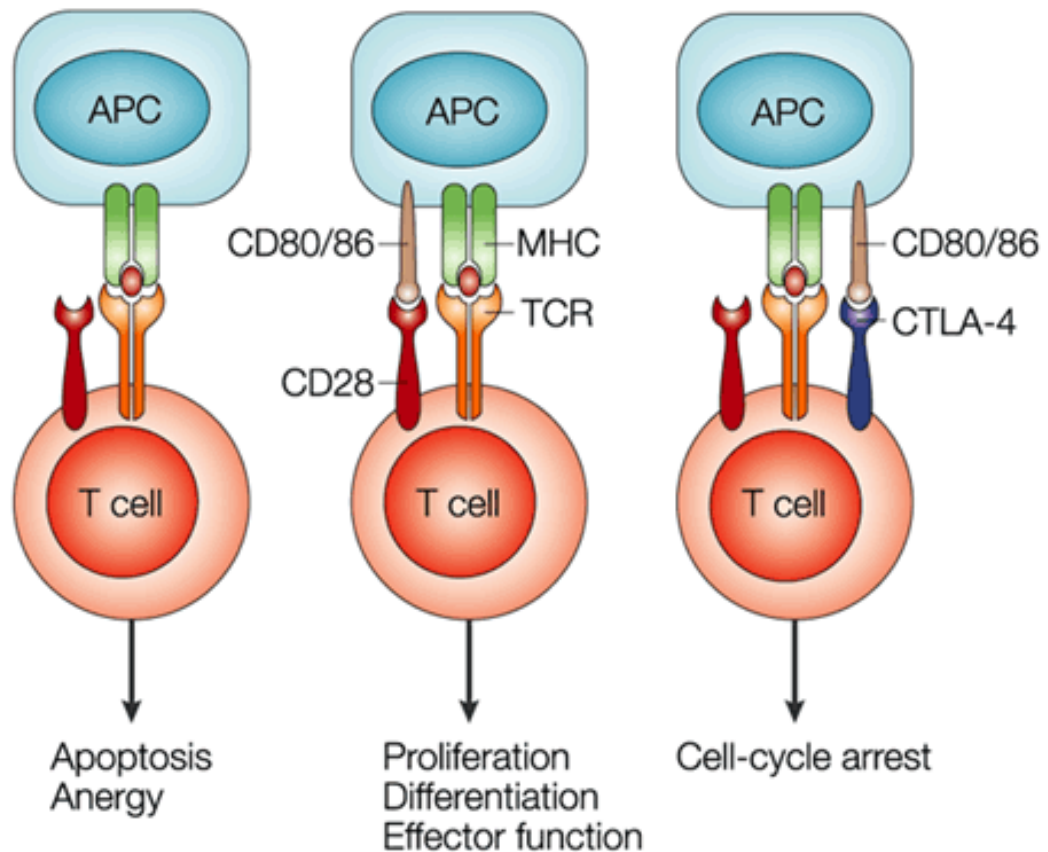


Figure 37: Structure des récepteurs du CTLA-4 [194]

Elle est spécifique de l'antigène qui a déclenché la réponse immunitaire et elle induit une mémoire à long terme qui protège plus efficacement l'organisme lors d'une seconde infection. Une coopération cellulaire et moléculaire entre ces deux compartiments est requise pour la genèse d'une réponse immunitaire efficace [195].

Les grandes étapes de l'initiation des réponses immunitaires sont maintenant bien connues. Les cellules dendritiques (DC) présentes en périphérie reconnaissent et captent des protéines exogènes, elles internalisent et clivent ces protéines en peptides, puis les présentent à leur surface associés aux molécules du CMH de classe I ou II. Dans un contexte inflammatoire, les cytokines et chimiokines produites par les cellules du compartiment inné et les signaux de danger perçus par la DC vont déclencher un processus de maturation. Les DC migrent dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS) les plus proches (ganglions, rate), pour initier

l'activation des lymphocytes T ou B naïfs. Cette activation nécessite trois signaux différents. Tout d'abord, la reconnaissance spécifique entre le complexe CMH/peptide et le TCR, récepteur spécifique du lymphocyte T. Cette première reconnaissance déclenche la phosphorylation de la partie intracytoplasmique du TCR, le recrutement de ZAP70 et des kinases de la famille syk et lck. Le signal n'est cependant pas suffisant pour permettre une activation efficace du lymphocyte. Des signaux de costimulation sont nécessaires, ces protéines Co-stimulatrices sont exprimées principalement sur les membranes des cellules présentatrices d'antigène (CPA) et sont induites au cours de leur maturation. La voie de costimulation la plus connue est la voie B7/CD28. CD28 est exprimé par les lymphocytes T, B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) sont exprimés par les DC matures. Ce second signal permet le recrutement de kinases complémentaires comme la phosphoinositide-3 kinase (PI3K), ainsi que le soutien de la phosphorylation initiée par le TCR. Un troisième signal reposant sur la présence de cytokines dans l'environnement des lymphocytes permet leur éducation et l'acquisition définitive des fonctions effectrices. Particulièrement, la différenciation Th1 qui favorise une réponse cytotoxique cellulaire (CTL) est nécessaire à la genèse d'une réponse immunitaire antitumorale. Cette réponse de type I est caractérisée par la production de cytokines, interféron- γ (IFN- γ) et tumor necrosis factor- α (TNF- α). Les réponses immunitaires doivent être finement régulées pour ne pas engendrer d'auto-immunité. Ainsi, des molécules comme CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4) (**Figure 37**) sont synthétisées lors de l'activation initiale des lymphocytes T et agissent comme répresseurs de l'activation T. Les polymorphismes génétiques de CTLA-4 produisent des protéines d'une activité biologique variable. Les personnes exprimant certaines formes de CTLA-4 sont sujettes au développement de maladies auto-immunes telles que la maladie de Graves, la maladie cœliaque, l'hypothyroïdie auto-immune, le diabète de type I ou la sclérose en plaques [196].

III.2.2. Historique des récepteurs de la famille Toll-like receptors (TLR)

Les récepteurs de type Toll (Toll-like receptors, TLR) (**Figure 38**) sont des homologues de la protéine Toll, une protéine impliquée dans le développement embryonnaire chez la drosophile et notamment l'établissement de la polarité dorsoventrale. En 1997, Ruslan Medzhitov dans le

laboratoire de Charles Janeway Jr, identifiait TLR4, le premier gène homologue de Toll découvert chez les mammifères. Ce TLR se révélera, un an plus tard, être le récepteur du composant majoritaire de la paroi des bactéries gram négatif, le lipopolysaccharide ou LPS [197].

Les ligands de TLRI et TLRII restent encore inconnus à ce jour. Ces récepteurs possèdent un domaine intracellulaire conservé homologue au domaine du récepteur pour l'interleukine-1 (IL-1 R). Ils sont impliqués dans la reconnaissance des motifs moléculaires des agents pathogènes conservés au cours de l'évolution et regroupés sous le terme anglo-saxon de pathogen associated molecular pattern (PAMP). A ce titre, les TLR font partie de la famille des PRR (pathogen recognition receptors), tout comme le récepteur au mannose ou encore NOD. Ces PRR sont localisés principalement à la surface des cellules de l'immunité naturelle: monocytes/macrophages, cellules dendritiques, cellules NK et polynucléaires neutrophiles. Comme nous le décrivons ci-après, certains TLR sont aussi exprimés par les cellules de l'immunité adaptative (lymphocytes B, lymphocytes T), ainsi que les cellules épithéliales et endothéliales [198].

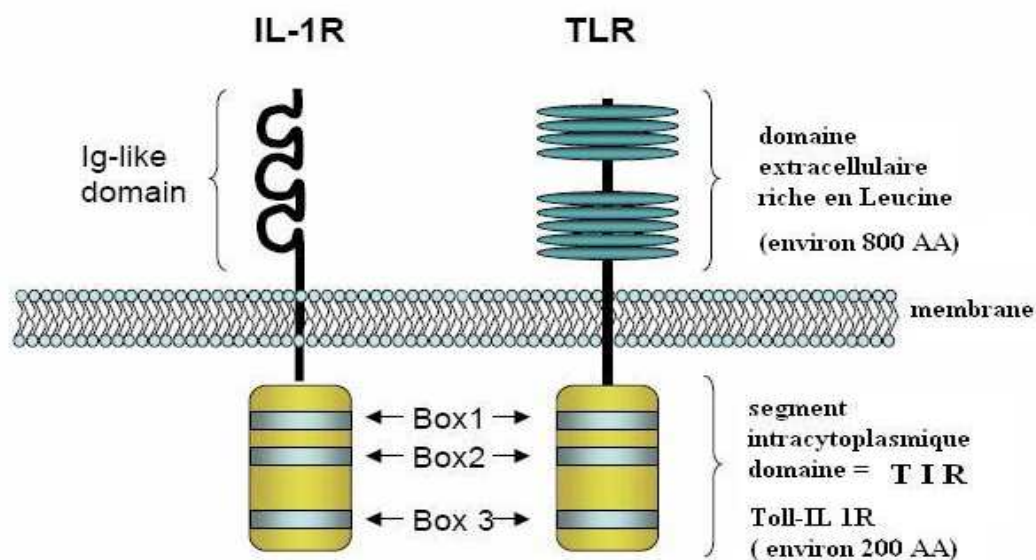


Figure 38: Structure des TLR [199]

La fonction générale de ces PRR et donc des TLR est de percevoir les signaux Danger. Cette notion de Danger a été énoncée pour la première fois en 1994 par Polly Matzinger [132]. Cette théorie du Danger indique que la capacité de réponse du système immunitaire est directement reliée à la perception du Danger. Schématiquement, en l'absence de Danger, le système immunitaire ne sera pas actif et il en résultera un phénomène de tolérance. A l'inverse, en cas de Danger, une activation efficace du système immunitaire s'initiera. Il est possible de distinguer deux types de signaux Danger: les signaux exogènes émis par les agents pathogènes (c'est-à-dire les PAMP) et les signaux endogènes émis par l'organisme hôte suite à des dommages ou des agressions tissulaires ou encore lors de dérèglements métaboliques. Afin de mieux clarifier cette notion de signaux Danger endogènes, nous citerons quelques exemples. Ainsi, rentrent dans cette catégorie les protéines du choc thermique ou HSP (pour Heat Shock Protein) [200].

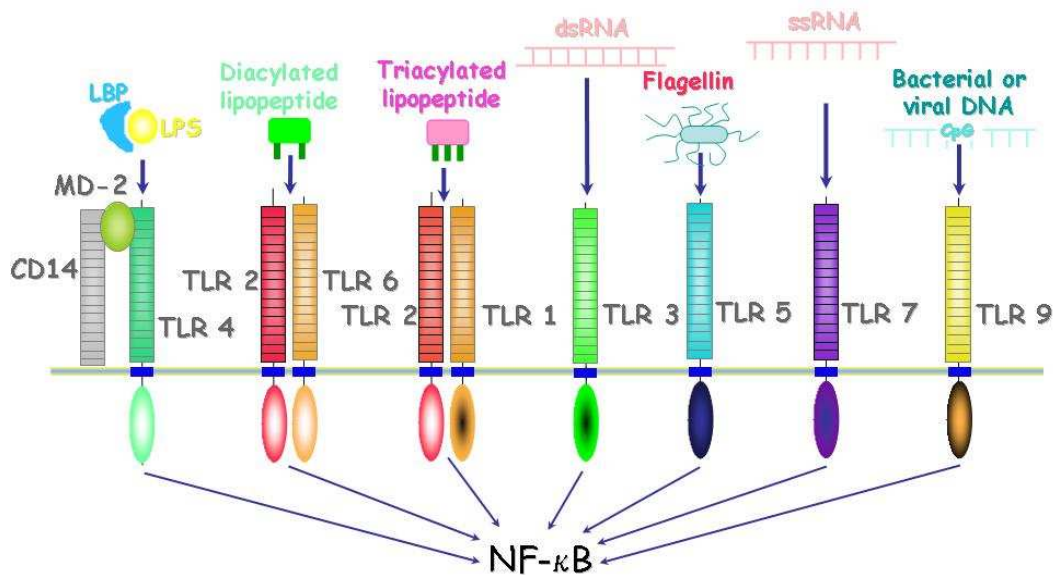


Figure 39: Activation des TLR [201]

Ces protéines chaperons intracellulaires, retrouvées en concentration élevée dans les cellules, voient leur expression augmentée lors du stress cellulaire. Certaines équipes ont proposé de les utiliser comme adjuvant en immunothérapie antitumorale. Des composés strictement ou majoritairement intracellulaires, comme l'acide urique ou les nucléotides intracellulaires (UTP

et ATP) associés au métabolisme énergétique deviennent des signaux Danger endogènes lors de la rupture accidentelle de la membrane plasmique d'une cellule. Cette observation de la rupture de la membrane plasmique est bien connue des anatomopathologistes lors de la nécrose. L'interaction des TLR avec leurs ligands déclenche l'activation de différents mécanismes (**Figure 39**) concourant à la réaction inflammatoire (induction de gènes de cytokines inflammatoires et de chimiokines, assurant le recrutement des polynucléaires neutrophiles et des macrophages) et à l'activation de la réponse immunitaire adaptative (induction des molécules HLA de classe II et de costimulation) [202].

Au préalable, nous aborderons la localisation cellulaire des TLR, leurs expressions et les principales voies de signalisation de ces récepteurs. Ceci permettra de mieux appréhender comment ces récepteurs PRR peuvent amplifier ou restaurer les réponses immunitaires antitumorales. Nous indiquerons également comment ces TLR peuvent aussi participer à la progression, l'invasion tumorale, la dissémination de métastases ou encore l'échappement au contrôle du système immunitaire [203].

III.2.3. Localisation, expression, et principales voies de signalisation des TLR

Les TLR peuvent être classés en deux catégories en fonction de leur localisation cellulaire. Les TLR extracellulaires localisés à la membrane plasmique (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR10) auront pour principale fonction de percevoir les signaux Danger provenant de l'extérieur, à savoir les PAMP exprimés à la surface des agents pathogènes (LPS, lipopeptides, acide lipoteichoïque, peptidoglycane des bactéries gram positif...). Sur la base de la séquence aminoacide et la structure génomique, les TLR1, TLR2, TLR6 et TLR10. Ces TLR agissent sous forme d'hétérodimère TLR1/TLR2, TLR6/TLR2 et TLR10/TLR2.

Les TLR intracellulaires (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9), localisés au niveau des compartiments endosomaux ou lysosomaux, détectent les PAMP intracellulaires et notamment les acides nucléiques (ARN viraux simple ou double brin) et les dinucléotides CpG (séquence de cytosine-guanosine associée à des nucléotides manquant) TLR2 agissent sous forme d'hétérodimères avec TLR1 ou TLR6. TLR10 pourrait s'associer sous forme d'hétérodimères avec TLR1 et TLR2. Les ligands de TLR10 et TLR11 restent actuellement inconnus [204].

On compte différentes classes d'oligodesoxynucléotides synthétiques CpG (CpD ODN) d'activité biologique différente: les CpG ODN classe A stimulent surtout la production d'IFN- γ par les PDC, les classes B activent la maturation des PDC et la prolifération des lymphocytes B (ce sont les plus utilisés en thérapie anti tumorale), les classes C possèdent les propriétés des classes A et B [205].

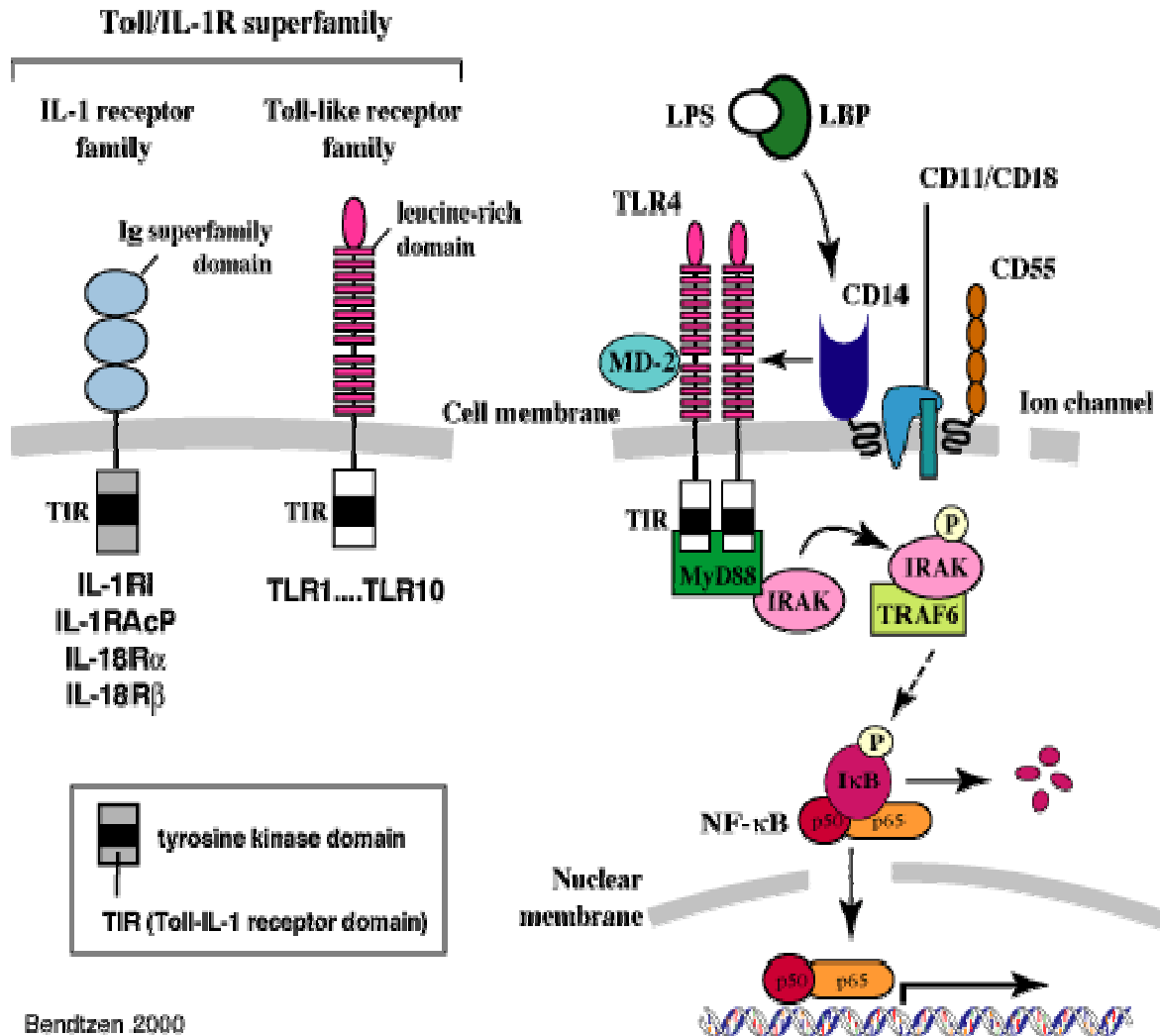


Figure 40: Voies de signalisation des TLR [206]

Les mammifères diffèrent des procaryotes dans le degré de méthylation des dinucléotides CpG, les procaryotes présentant beaucoup de motifs CpG non méthylés. La reconnaissance spécifique de ces dinucléotides CpG non méthylés et non des dinucléotides CpG méthylés par TLR9 permet d'établir la distinction entre de l'ADN du soi et des acides nucléiques viraux.

Cette compartimentation cellulaire (membrane plasmique/endosomes) des TLR n'est pas absolue.

Tableau III: Les principaux ligands des récepteurs TLR [208]

TLR	Principaux ligands exogènes (PAMP)	Ligands endogènes	Ligands ayant une activité thérapeutique en cancérologie
TLR1 TLR2	- Triacyllipopeptides, TLR2 lipoarabinomannane (mycobactéries)		
TLR2	- Peptidoglycanes (Bactéries à gram+) - Zymozan (fungus) - Protéines virales (HSV1, HCV, CMV, rougeole) - Phospholipides tréponémales - Phosphatidylinositol (protozoaires)	- Defenéines - HSP60 - HSP70 - Radicaux oxygénés - HMGB1	- BCG
TLR3	- ARN Double brin (virus, helminthes)	- ARN messenger	- Acide polyinosylique-polycytidique - Acide polyadénylique-polyuridylique
TLR4	- LPS (bactéries à gram négatif) - Protéines virales (protéine F du VRS) - Lipides (<i>trypanosoma crusi</i>)	- HSP70, HSP90 - Héparines - Fragments polysaccharidiques du hyaluronane - Fibrinogène - Défensine β - HMGB1	- CFA - BCG - Taxols (paclitaxel) - MPI
TLR5	- Flagelline		
TLR6+TLR2	- Diacyl-lipopeptides (mycoplasmes)		- Imiquimod - resiquimod
TLR7+TLR8	- ARN simple brin (Inflenza, VSV, VIH, VRS)		
TLR9	- Motifs CpG non méthylés (ADN viraux ou bactériens), schizontes de malaria	- Chromatine de l'hôte	- CpG ODN*

**On compte différentes classes d'oligodesoxynucléotides synthétiques CpG (CpD ODN) d'activité biologique différente: les CpG ODN classe A stimulent surtout la production d'IFN- α par les PDC, les classes B activent la maturation des PDC et la prolifération des lymphocytes B (ce sont les plus utilisés en thérapie antitumorale), les classes C possèdent les propriétés des classes A et B*

Les cellules dendritiques l'exprimeraient seulement au niveau intracellulaire, alors qu'une expression extracellulaire est aussi retrouvée pour les fibroblastes et les cellules épithéliales. TLR4 pourrait percevoir le LPS au niveau intracellulaire dans les cellules épithéliales intestinales [205].

Du point de vue de l'expression cellulaire, les TLR sont exprimés sur les cellules de l'immunité innée (cellules dendritiques, monocytes/macrophages, polynucléaires neutrophiles, polynucléaires éosinophiles, mastocytes, cellules NK), les cellules de l'immunité adaptative (lymphocytes B, lymphocytes T CD4 comme CD8 et mêmes régulateurs), et les cellules non immunes comme les fibroblastes, les cellules endothéliales et certaines cellules épithéliales (bronchiques, gastro-intestinales, urogénitales). De ce fait, les TLR pourront être aussi exprimés par les cellules provenant de ces tissus et soumis à un processus de transformation. Le profil d'expression des TLR répond ainsi à une distribution spécifique en fonction des tissus et des types cellulaires. Ceci permet de réguler plus finement la réponse immunitaire [208].

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont la principale source d'interférons- α (IFN- α) de l'organisme et jouent un rôle primordial dans la réponse immune antivirale. Elles expriment majoritairement les TLR7 et TLR9 afin de percevoir l'ADN viral simple brin et les motifs CpG non méthylés. À l'inverse, les cellules dendritiques myéloïdes immatures présentent un profil d'expression complémentaire avec l'expression des TLR membranaires TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6 et les TLR endosomaux TLR3 et TLR7.

La stimulation de ces TLR par leurs ligands aboutira à la synthèse et la sécrétion d'interleukine-12 (IL-12) permettant, tout comme la synthèse d'IFN- α par les PDC, l'initiation d'une réponse de type I. Les conséquences dépendent évidemment de la cellule exprimant le TLR. Ainsi, les cellules douées de propriétés phagocytaires, comme les macrophages, les polynucléaires ou les cellules dendritiques immatures, voient leur capacité de phagocytose

stimulée par l'interaction TLR ligand. Les cellules dendritiques produisent de l'IL-12 ou de l'IFN- α pour mettre en place une immunité à médiation cellulaire efficace aboutissant à l'élimination de l'agent pathogène. Citons un dernier exemple, qui pourra avoir des conséquences pour l'immunothérapie antitumorale, la possibilité que les ligands des TLR (TLR8 ou TLR2, notamment) puissent s'opposer à la suppression de la réponse immunitaire causée par les lymphocytes T régulateurs. Ces fonctions sont délivrées par un nombre limité de voies de signalisation, conservées par les différents TLR. Il est généralement accepté que tous les TLR (en particulier TLR2, TLR5, TLR7, TLR8 et TLR9) à l'exception de TLR3 utilisent la molécule MyD88 (Myéloïde Différentiation primary response protein 88), comme protéine adaptatrice pour initier la voie de signalisation puis des kinases de la famille IRAK (IL-1 Receptor-Associated Kinase). TLR3 implique les protéines adaptatrices, Trif (TIR domain containing adaptator-inducing IFN) et IPN-related factor 3. TLR4 utilise à la fois des voies de signalisation dépendantes de MyD88 et indépendantes de MyD88 dont celle de Trif par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice TRAM (Trif-related adaptator molécule). [209]

Ces voies de signalisation aboutissent à l'activation et la translocation vers le noyau des facteurs de transcription NF κ B et AP-1 (activating-protein-1). Il en découle ensuite la transcription de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α , et l'IL-6. Les TLR peuvent aussi signaler via les caspases les protéases impliquées dans l'induction de l'apoptose. Par exemple, l'activation de TLR peut aboutir à la sécrétion d'IL-18 de manière indépendante de MyD88. Dans ce contexte, les TLR induisent la caspase 1 qui permet la conversion de la pro-IL-18 en IL-18.

Ce processus favorise la polarisation Th1 des réponses immunitaires [209].

Tableau IV: Les principales actions associées à la stimulation des cellules immunitaires humaines par des ligands des récepteurs TLR [209]

Principales cellules immunitaires	Fonctions	Principaux TLR impliqués dans la fonction
Cellules dendritiques conventionnelles*	<ul style="list-style-type: none"> - Production d'IL-2 (oriente vers réponse de type I) - Migration vers le ganglion de drainage - Accroît l'expression des molécules HLA classe II et de co-stimulation) - Accroît l'internalisation de l'antigène - Favorise la présentation croisée au LT CD8+ 	<ul style="list-style-type: none"> - TLR1/2/6, TLR5, TLR8, - TLR1/2/6, TLR5, TLR8, - TLR1/2/6, TLR5, TLR8, - TLR2, TLR7/8, - TLR3
Cellules dendritique plasmacytoïde (PDC)	<ul style="list-style-type: none"> - Production d'IFN-α (oriente vers une réponse de type I) - Favorise la présentation croisée au LT CD8+ - Résistance à l'apoptose - Migration vers le ganglion de drainage (CCR7) 	<ul style="list-style-type: none"> - TLR7, TLR9 - TLR9 - TLR9 - TLR7, TLR9
Monocytes/ Macrophages	<ul style="list-style-type: none"> - Phagocytose - Production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1b, IL-6, TNF-α) - Production de chémokines (CCL2, CCL3, CCL4, IL-8, CXCL8, CXCL2/3°) 	<ul style="list-style-type: none"> - TLR9 - TLR1/2/6, TLR5, TLR8 - TLR1/2/6, TLR5, TLR8
Cellules NK	<ul style="list-style-type: none"> - Production de défensines alpha - Augmentation de la cytotoxicité - Production d'IFN-γ - Production de TNF-α 	<ul style="list-style-type: none"> - TLR2, TLR5 - TLR3, TLR2 - TLR2, TLR3, TLR5, TLR9 - TLR3, TLR9
Lymphocytes B	<ul style="list-style-type: none"> - Stimulation des réponses B - Commutation isotypique - Augmentation de l'expression des molécules de costimulation - Résistance à l'apoptose - Migration vers le ganglion de drainage - Différentiation en plasmocyte (avec BCR pour LB naïf sans BCR pour LB mémoires) 	<ul style="list-style-type: none"> - TLR9, TLR2 - TLR9, TLR2 (avec BCR et coopération avec LT CD4) - TLR9 - TLR9 - TLR9 - TLR9, TLR2
Lymphocytes T CD4	<ul style="list-style-type: none"> - Polarisation TH1 (effet via CPA) - Polarisation TH2 (effet via CPA) - Stimulation production de cytokines (IL-2, IL-8, IL-10, TNF-α, IFN-γ) par les LT CD4 mémoires - Stimule prolifération des LTCD4 mémoires - Augmentation production d'IL-8 - Diminution production d'IL-8 - Augmentation de la survie 	<ul style="list-style-type: none"> - TLR4 - TLR2, TLR5 - TLR2, TLR5, TLR7/85 (avec TCR) - - TLR2, TLR5, TLR7/85 (avec TCR) - TLR2, TLR5 (avec TCR) - TLR7 (avec TCR) - TLR3 (avec TCR)
Lymphocytes T CD8	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de la production d'IFN-γ par les LT CD8 effecteurs 	<ul style="list-style-type: none"> - TLR3 (avec TCR)
Lymphocytes T régulateurs	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibition des fonctions suppressives (LT murins) 	<ul style="list-style-type: none"> - TLR8, TLR2 (avec TCR)

**Cellules dendritiques conventionnelles appelées autrefois cellules dendritiques myéloïdes TLR2 agit sous forme d'hétérodimère avec TLR1 ou TLR6. TLR1 est ubiquitaire.*

**LT: lymphocytes T*

III.3. Bases fondamentales de l'implication des TLR en cancérologie et modèles expérimentaux

Les premiers balbutiements de l'immunothérapie ont, sans le savoir utilisé des ligands des TLR. Ainsi l'adjuvant complet de Freund bien connu des immunologistes pour faciliter une réponse antitumorale cellulaire et humorale qui correspond à la mycobactérie *Mycobacterium bovis* inactivée par la chaleur mise en suspension dans de l'huile minérale, active la réponse immunitaire via les TLR et plus particulièrement TLR4. L'effet adjuvant obtenu dans les cancers superficiels de la vessie avec le BCG résulte aussi d'une activation des TLR2 et TLR4. L'utilisation de ligands agonistes peut se fonder sur deux mécanismes d'action différents, d'une part, les ligands de TLR peuvent interagir avec les cellules immunitaires pour favoriser l'activation du système immunitaire inné, augmenter les signaux de costimulation nécessaires aux lymphocytes T et amplifier ainsi l'efficacité des réponses immunes. D'autre part, ces ligands pourraient également directement agir sur les cellules tumorales qui expriment des TLR [210].

III.3.1. les ligands de TLR comme agents immunomodulateurs

Les différentes propriétés, mentionnées ci-dessus, confèrent aux TLR des fonctions adjuvantes particulièrement intéressantes pour améliorer l'efficacité des stratégies d'immunothérapies, plus particulièrement la capacité des ligands de TLR à promouvoir la maturation des DC et l'activation des cellules NK est favorable à l'obtention d'une réponse vaccinale Th1 de bonne qualité. De plus, certains travaux suggèrent que des ligands de TLR (TLR2 et TLR8) pourraient abolir les fonctions suppressives de lymphocytes T tolérogènes. Les ligands de TLR après administration exercent effectivement des activités antitumorales dans différents modèles de cancer murin. Les ligands de TLR administrés seuls peuvent favoriser un rejet tumoral, lorsque les tumeurs sont de petite taille. Cet effet implique la

réponse adaptative et les lymphocytes T. Les oligodesoxynucléotides synthétiques CpG (CpG ODN) activent en premier lieu les lymphocytes B et les PDC. Les PDC migrent de la zone marginale vers les zones T des ganglions lymphatiques, secrètent de l'IFN- γ ; expriment les molécules de costimulation et activent les lymphocytes T. La cytotoxicité des cellules NK est aussi augmentée par l'intermédiaire de la production d'interférons. Lorsque les tumeurs sont plus volumineuses, une approche combinant anticorps monoclonaux, radiothérapie, chirurgie et/ou chronothérapie anticancéreuse est nécessaire pour éradiquer la tumeur.

L'effet adjuvant des ligands synthétiques de TLR9 est capable d'augmenter l'immunogénicité d'approches d'immunothérapie utilisant aussi bien des peptides tumoraux, de l'ADN tumoral, des cellules tumorales ou des cellules dendritiques pulsées avec des antigènes tumoraux. Les résultats obtenus dans ces modèles expérimentaux permettent d'envisager de manière encourageante un transfert vers la clinique [211].

III.3.2. Les ligands de TLR utilisés comme agent thérapeutique ciblant directement les cellules tumorales

Les cellules tumorales elles-mêmes pourraient exprimer les TLR. Ceci est observé pour les cellules tumorales issues des leucocytes (leucémies ou lymphomes). Les carcinomes épidermoïdes peuvent également exprimer des TLR. A notre connaissance, une cartographie détaillée de l'expression de TLR par type de cancer n'est pas disponible du fait de la difficulté d'analyse de l'expression de ces récepteurs en immunohistochimie. En revanche, différentes études rapportent l'expression de TLR par des lignées cellulaires tumorales établies issues des tumeurs suivantes: pulmonaire, mammaire, colique, prostatique, uro-épithéliales, carcinomes gastriques, ovariens, choriocarcinomes, neuroblastomes, mélanomes. Les principaux TLR exprimés par ces tumeurs seraient TLR2, TLR4, TLR9, mais aussi le TLR1, TLR3, TLR5 et TLR6. Ceci confère aux cellules tumorales la capacité de répondre aux ligands de TLR utilisés en thérapeutique. La transformation néoplasique pourrait aussi conduire à la perte de l'expression de TLR, comme le suggère une étude sur l'expression de TLR3 par les hépatocytes et les hépatocarcinomes. La présence de TLR3 serait nécessaire pour l'activation de la cytolyse hépatique par les lymphocytes T cytotoxiques après infection virale [212].

Ainsi, la perte d'expression de TLR3 par les hépatocarcinomes pourrait expliquer leur échappement à la cytotoxicité cellulaire des cellules NK ou des lymphocytes T cytotoxiques. Cela nous amène à considérer les effets potentiels de la stimulation des TLR exprimés par les tumeurs. L'interaction ligand/TLR exprimés par les cellules tumorales peut aboutir à différentes conséquences. La stimulation de TLR3 par son ligand l'acide polyinosinique polycytidylique (Poly(I:C)) aboutit à l'apoptose de cellules du cancer du sein. Après engagement du TLR3 par le poly(I:C), les cellules de cancer du sein rentrent en apoptose. Cette apoptose implique l'activation de la caspase 3 et de la caspase 8. Dans ce cas, les TLR utilisent approximativement la même signalisation que les récepteurs de mort comme Fas et notamment le recrutement de la protéine adaptatrice FADD. Cette induction d'apoptose pourra être mise à profit pour lutter contre les tumeurs [213].

Néanmoins, il existe également des données indiquant que les TLR peuvent être impliqués dans des mécanismes favorables à l'échappement du système immunitaire et à la progression des cancers [214].

III.3.3.Utilisations thérapeutiques potentielles

La preuve du concept de l'efficacité antitumorale des ligands de TLR repose sur les résultats encourageants et spectaculaires obtenus lors de protocoles évaluant l'utilisation de crèmes à base d'imiquimod (AldaraTM), un ligand synthétique de TLR7, lors du traitement de carcinomes basocellulaires présentant une localisation superficielle. Des études contrôlées randomisées ont montré la régression histologique dans 78 à 87 % de ces carcinomes superficiels après application locale cinq jours par semaine pendant six semaines. L'effet bénéfique de l'imiquimod résulterait d'une stimulation des pDC, qui à leur tour libéreraient de l'IFN- γ puis activeraient les effecteurs du système immunitaire. D'autres tumeurs superficielles comme les cancers de la vessie peuvent aussi répondre à l'administration de BCG. En revanche, pour les tumeurs plus avancées, les réponses cliniques sont moins évidentes.

Tableau V: Principaux essais cliniques menés en cancérologie utilisant des ligands de TLR

[215]

Ligand TLR utilisé	TLR incriminé(s)	Cancer	Résultats	Mécanisme(s) Suspecté(s)
BCG	TLR2, TLR4	Carcinome colorectal avancé	Augmentation de la réponse IgM dirigée contre l'antigène de tumeur co-administré (TA90) et corrélation avec la survie	Effet adjuvant, administration avec un antigène tumoral
BCG	TLR2, TLR4	Cancer du colon	44% de réduction des rechutes après 5 ans de survie	Effet adjuvant, administration avec cellules tumorales irradiées
BCG	TLR2, TLR4	Cancer de la vessie	Réponses cliniques observées	Administration sans antigène
CpGODNs	TLR9	Mélanome	Augmentation de la réponse CTL	Effet adjuvant, administration avec peptide Melan A
CpGODNs	TLR9	Lymphomes non-hodgkiniens	Augmentation du nombre de NK et de leur cytotoxicité	Effet adjuvant, monothérapie sans antigène
CpGODNs	TLR9	Mélanome	Augmentation de la réponse spécifique antitumorale	Effet adjuvant, administration avec peptide MAGE-3
CpGODNs	TLR9	Lymphomes non-hodgkiniens	Marqueurs biologiques induits par CpGODN, pas de toxicité	Combinaison avec Rituximab
CpGODNs	TLR9	Mélanome	2 réponses partielles et 3 stabilisations sur 20 patients traités	Effet adjuvant
CpGODNs	TLR9	Tumeurs solides réfractaires		Combinaison avec taxane/platinum
Imiquimod	TLR7/TLR8	Mélanome	Augmentation de la réponse spécifique antitumorale (peptides NY-ESO-1), pas d'effets cliniques	Effet local, association avec peptide de mélanome et le ligand de FLT
Imiquimod	TLR7/TLR8	Carcinome basocellulaire	Réponses cliniques observées	Administration locale sans antigène
MPL	TLR4	Mélanome, glioblastome, carcinome colorectal, carcinome pancréatique	Augmentation de la réponse spécifique anti-tumorale, pas d'effet clinique	Effet adjuvant (selon revue Baldrige) , administration avec antigène tumoral
Poly (A : U)	- TLR3	Cancer du sein	- Augmentation de la survie par rapport au groupe placebo	Analyse à posteriori de patientes traitées*
Poly (A : U)	- TLR3	Cancer du sein	- Augmentation de la survie - Diminution de l'incidence des métastases par rapport au groupe sans Poly (A : U)	Avec radiothérapie locorégionale

Plusieurs études cliniques rapportent l'utilisation de ligands de TLR pour exercer un effet antitumoral. Il est possible de distinguer l'utilisation comme agent adjuvant avec co-administration d'un antigène au sens large (du peptide tumoral aux cellules tumorales inactivées) ou seul sans administration d'antigène [215].

III.3.4. Les ligands de TLR administrés en plus d'une autre approche d'immunothérapie

L'association de ligands de TLR et d'approches d'immunothérapie peut être toutefois un débouché intéressant pour ces molécules (comme CpG ODN). Nous avons choisi de l'illustrer par deux exemples. Le CpG ODN augmente la réponse T CD8 cytotoxique contre l'antigène de tumeur Melan A et pourrait augmenter la cytotoxicité NK, la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) lors de l'administration combinée avec un anticorps monoclonal à effet antitumoral. Le monitoring d'une telle étude a permis d'identifier des gènes induits par les IFN de type I chez les patients recevant des CpG ODN avec l'anticorps rituximab [216].

III.3.5. Les ligands de TLR administrés seuls

Des études cliniques ont aussi choisi d'administrer le ligand de TLR seul. Ainsi, Pashenkov et al. Rapportent une étude de phase II évaluant l'intérêt d'un CpG ODN dans le traitement des mélanomes, vingt patients porteurs de mélanome de stade IIIc ou IV ont été inclus et traités par des injections sous-cutanées hebdomadaires. Deux réponses partielles et trois stabilisations de la maladie ont été observées, ce qui confirme l'activité biologique de ces molécules [217].

Antoine Carpentier et al. ont réalisé une étude de phase I évaluant la faisabilité de l'administration de CpG ODN directement dans des glioblastomes, chez 24 patients réfractaires aux traitements conventionnels. L'administration de CpG ODN s'est avérée non toxique. Les auteurs rapportent une diminution de taille de 50 % pour deux patients et une survie globale médiane de 7,2 mois [216].

Les cibles des ligands de TLR peuvent être les cellules de l'immunité adaptative (cellules dendritiques, cellules NK), mais aussi les cellules tumorales elles-mêmes. Certains agents anticancéreux comme les taxols pourraient induire l'apoptose des cellules tumorales après interaction avec les TLR, TLR4 en l'occurrence pour les taxols.

Fabrice Andre et al. ont analysé l'expression de TLR3 dans une cohorte de 182 patientes incluses dans un essai thérapeutique évaluant l'intérêt de l'injection intraveineuse d'un ligand de TLR3 (polyAV) après chirurgie d'un cancer du sein localisé et présentant un envahissement ganglionnaire.

L'expression de TLR3 était observée sur 18 tumeurs mammaires (9,9 %). L'administration du ligand de TLR3 était associée à une amélioration de la survie globale chez les patientes dont les cancers expriment TLR3. Les auteurs ne rapportent pas de bénéfice clinique dans le groupe de patientes dont les tumeurs n'expriment pas TLR3 [217].

En conclusion, la stimulation via les TLR semble une voie d'avenir dans le traitement des cancers. Mis à part l'exception de l'imiquimod, de nouvelles recherches sont nécessaires pour accroître l'efficacité de tels traitements. En revanche, aucune toxicité significative (mis à part des syndromes grippaux) n'a été rapportée malgré le risque d'auto-immunité lié à la stimulation des TLR [216].

Des outils ont été mis en place pour suivre la réponse (profil de gènes induits, évaluation des réponses antitumorales). Ces progrès réalisés dans le domaine du monitoring des patients pourront servir, au même titre que la compréhension de l'expression des TLR et leur signalisation, à développer et rendre efficace l'utilisation des ligands de TLR.

L'activation des TLR est une stratégie ciblant les signaux de costimulation. La neutralisation de CTLA-4 à principalement pour objectif de bloquer un rétrocontrôle négatif des réponses immunitaires. De nombreux travaux confirment l'intérêt de cette approche [218].

III.4. Utilisation d'anticorps neutralisant CTLA-4 en oncologie

III.4.1. Biologie de CTLA-4

Les récepteurs de la famille des récepteurs de costimulation comprenant le CD28 comportent un domaine extracellulaire immunoglobulinique et une portion intracytoplasmique courte.

Les molécules CD28 et Icos (Inducible COStimulator) ont été caractérisées secondairement à des travaux concernant des anticorps ciblant ces protéines et induisant la prolifération des lymphocytes T. CD28 est exprimé constitutivement sur la plupart des lymphocytes T CD4 et sur 50 % des lymphocytes T CD8. Il est précocement induit lors de l'activation du lymphocyte, atteignant un pic d'expression à 24 heures. L'implication de CD28 dans la genèse des réponses immunitaires efficaces a été suggérée par la perte de l'expression de cette molécule lors des infections chroniques et du vieillissement. L'activation de lymphocytes T par des anticorps agonistes de CD28 engendre une augmentation de leurs fonctions métaboliques, une prolifération, une synthèse accrue d'IL-2, une résistance à l'apoptose et la production de nombreuses cytokines comme l'IFN- γ [220].

CTLA-4 ou CD152 est une glycoprotéine transmembranaire de type I appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Elle est exprimée à la surface des lymphocytes T CD4 et CD8 sous la forme d'un homodimère de 43 kDa. Chez l'homme, le gène est localisé sur le chromosome 2 et il comporte 4 exons, L'épissage alternatif du transcript primaire peut produire une protéine transmembranaire (exons 1-4, CTLA-4) ou une forme soluble (exons 1,2, 4, sCTLA-4) [221].

La protéine est principalement induite tardivement (48h-72h) au cours de l'activation du lymphocyte T (**Figure 41**). Son induction est proportionnelle à la force du signal du TCR. CTLA-4 et CD28 sont homologues à 30 % au niveau protéique. Cette similitude est associée à la reconnaissance de ligands identiques, comme les molécules CD80 (B7-I) et CD86 (B7-2). CTLA-4 peut se fixer à deux protéines de CD80/CD86 à la fois, cela lui confère une plus forte avidité, il a été longtemps admis que l'affinité de CTLA-4 pour CD80 et CD86 était plus forte que celle du CD28. Cependant, de récentes données décrivent une plus forte affinité entre

CTLA-4 et CD80 d'une part et CD28 et CD86 d'autre part. De plus, les profils d'expression de ces deux ligands miment en partie ceux de CTLA-4 et CD28, ce qui permet de mieux comprendre le déroulement séquentiel de la signalisation CD28/CTLA-4. En effet, CD86 est exprimé de manière constitutive sur les CPA et il est induit rapidement pour atteindre un pic d'expression à 24 h. CD80 à une expression plus tardive, atteignant un pic 48h à 72h après activation de la CPA.

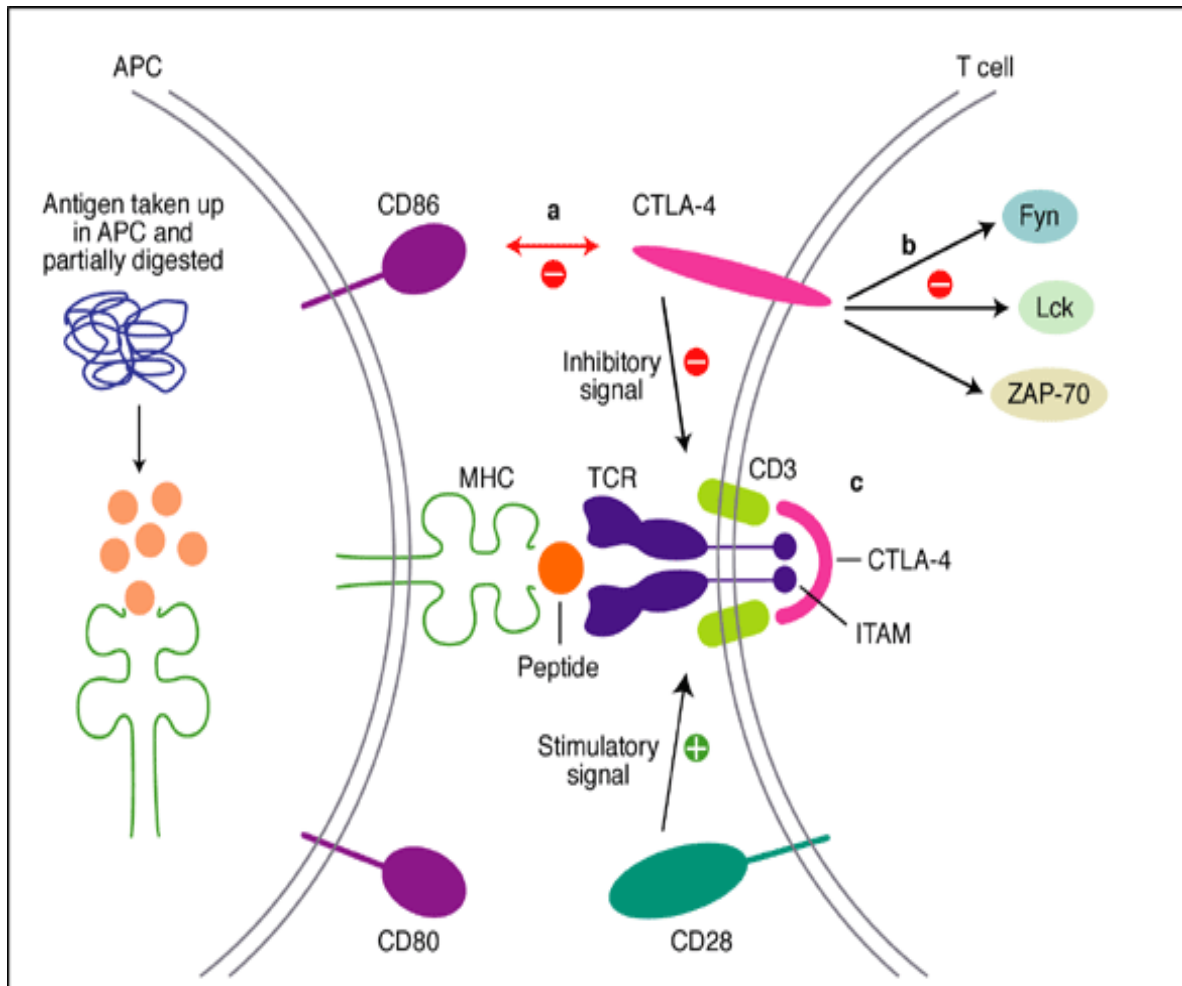


Figure 41: Mécanismes d'inhibition des lymphocytes T par les CTLA-4 [219]

CTLA-4 est aussi exprimé de manière constitutive sur certains lymphocytes T régulateurs. Les lymphocytes T mémoires possèdent une plus grande réserve de CTLA-4 intracellulaire, rapidement adressée à la membrane secondairement à différents signaux d'activation. [220]

En effet, CTLA-4 est liée au cytosquelette par des molécules adaptatrices dépendant des clathrines, AP-1 et AP-2. Lors de l'activation des lymphocytes T, CTLA-4 est recruté dans le site des interactions entre les CPA et les lymphocytes T et se co-localise avec le TCR [222].

L'inhibition des lymphocytes T par CTLA-4 semble reposer sur des mécanismes complémentaires. Premièrement, la forte avidité de CTLA-4 pour les récepteurs CD80 et CD86 suggère une compétition à la fixation du CD28 à ces mêmes ligands. CTLA-4 interagit avec CD86, ce qui séquestre les ligands potentiels du CD28. 48 à 72 heures après maturation des DC, CD80 est fortement induite, accentuant la séquestration et l'inhibition occasionnée.

Pourtant, ce mécanisme n'explique pas l'intégralité des fonctions de CTLA-4 observées *in vivo*. L'inhibition induite par CTLA-4 peut s'établir en l'absence de CD28, ce qui remet en question l'hypothèse de compétition à la fixation au ligand.

En effet, des expériences utilisant des lymphocytes exprimant un CTLA-4 mutant ayant une portion intracytoplasmique tronquée ont démontré que l'absence de signalisation compromettrait la fonction de CTLA-4 *in vivo*. De plus, les autres fonctions de CTLA-4 sont liées à sa portion cytoplasmique qui contient de nombreux domaines de fixation pour des protéines de signalisation (PI3K, SHP1, SHP2 et PP2A).

Les données sont encore peu détaillées et plusieurs modèles sont explorés. La fixation de CTLA-4 à son ligand pourrait induire le recrutement au niveau intracellulaire de phosphatases comme SHP1, SHP2 et PP2A. Son rôle serait de diminuer l'état de phosphorylation du TCR et des LAT (Linker for Activation of T cells) après interaction avec CTLA-4. [221]

Ainsi, des études rapportent une activité phosphatase de CTLA-4, mais à ce jour les protéines impliquées ne sont pas connues. D'autres travaux mettent en avant un rôle de CTLA-4 en aval du signal du TCR. Ils suggèrent une diminution des protéines ERK-1/2 conduisant à une réduction de la production d'IL2. PP2A (Protein Phosphatase 2A), une serine/thréonine phosphatase, est souvent évoquée dans les études de signalisation de CTLA-4. Cette protéine trimérique peut agir comme inhibiteur de la protéine kinase B et de Akt, deux composants majeurs de la signalisation du TCR. Elle peut interagir, grâce à sa sous-unité PP2AA, avec

CTLA-4. Sous cette conformation, les deux protéines sont inactives sur les lymphocytes T naif [222].

Après activation du signal du TCR, PP2A est phosphorylé et se détache de CTLA-4. Les deux protéines sont alors libres d'induire leurs signaux inhibiteurs. Enfin, CTLA-4 peut interagir directement avec la PI3K, une kinase importante dans l'activation des lymphocytes T qui est recrutée par le CD28 après engagement de CD80 ou CD86. Le recrutement de la PI3K par CTLA-4 peut se concevoir comme une compétition avec le recrutement de la PI3K par CD28 et signifier une séquestration de cette molécule pour compromettre la capacité de transmission du signal activateur [221].

Cependant, il n'est pas exclu que PI3K ait une signalisation propre dépendante de CTLA-4, mais celle-ci n'est pas connue à ce jour. Il existe ainsi une forte corrélation entre les activités CTLA-4 et CD28 permettant une fine régulation de l'activité du lymphocyte T. [220]

L'engagement de CTLA-4 a également un effet négatif sur l'organisation des synapses immunologiques. Les phosphatases recrutées par CTLA-4 pourraient prévenir l'activation des molécules adaptatrices favorisant la polymérisation du cytosquelette et la polarisation des radeaux lipidiques dans la zone d'interaction membranaire entre CPA et lymphocytes T CD4. Ainsi, CTLA-4 exercerait directement une fonction inhibitrice pour la constitution des synapses immunologiques [223].

CTLA-4 a d'autres fonctions décrites dans la littérature. Elle régule négativement la sécrétion de cytokines (par inhibition de l'accumulation des facteurs de transcription AP-1, NFAT et NF- κ B dans le noyau). CTLA-4 peut aussi réguler la prolifération cellulaire (la cycline D3, CDK4 et 6 peuvent être inhibées). Il est aussi important de noter que l'engagement de CTLA-4 par les récepteurs CD80 et CD86 n'induit pas un signal unidirectionnel. En effet, CTLA-4 active la voie de catabolisme du tryptophane au sein de la DC présentant CD80-CD86. Ainsi, l'engagement de CTLA-4 favorise la production autocrine ou paracrine de l'enzyme IDO (Indole amine 2,3-DiOxygenase) par les CPA. Le substrat de IDO est le tryptophane, un acide aminé essentiel [224].

IDO dégrade le tryptophane, ce qui inhibe la prolifération cellulaire et peut promouvoir l'apoptose. Cette propriété de CTLA-4 est particulièrement intéressante pour des thérapies visant à induire une tolérance.

CTLA-4 est aussi exprimé constitutivement par les lymphocytes T régulateurs à des taux très importants. CTLA-4 est ainsi présent dans le cytoplasme des lymphocytes T régulateurs non activés et peut être adressé à la membrane au cours d'une stimulation, ou lorsque ces lymphocytes régulateurs sont purifiés à partir des tumeurs.

Des hypothèses sur le rôle de la protéine au sein de cette population ont été avancées. Notamment, les T reg CTLA-4+ pourraient interagir directement avec les DC présents dans les OLS et stimuler la synthèse d'IDO de manière paracrine, inhibant la réponse immunitaire [225].

III.4.2. Fonctions de CTLA-4

Les différentes fonctions de CTLA-4 ont été étudiées dans un premier temps dans des modèles *in vitro*. Des expériences de stimulation par anticorps ciblant CTLA-4 ont montré une diminution de la prolifération et de la production d'IL-2 des lymphocytes T stimulés. Ces premières données suggéraient un rôle inhibiteur de CTLA-4. Par la suite, des modèles *in vivo* de souris déficientes en CTLA-4 ont permis de mieux comprendre le rôle de cette molécule dans le système immunitaire. Ces souris ont un phénotype normal à la naissance, leur thymus est de taille normale et aucune irrégularité n'est observée dans les populations lymphocytaires. Pourtant, 5-6 jours après leur naissance, une forte proportion de lymphocytes T actifs envahit les tissus non lymphoïdes, induisant la mort de l'animal en trois à quatre semaines (**Figure 42**). Les pathologies observées sont multiples. De nombreuses destructions tissulaires comprenant des myocardites, pancréatites, lymphadénopathies et splénomégalies sont observées. De plus, les organes lymphoïdes des souris déficientes en CTLA-4 contiennent dix fois plus de lymphocytes T, traduisant ainsi une prolifération lymphocytaire excessive et incontrôlée des lymphocytes [226].

Les lymphocytes T déficients en CTLA-4 ont un phénotype caractéristique d'un lymphocyte T actif, indépendamment de la sous-population observée, leur production de cytokines (IFN- γ , IL-4, GM-CSF) est accrue. L'injection de CTLA-4-Ig chez des souris déficientes en cette protéine permet de prévenir le développement de cette prolifération lymphocytaire fatale et l'infiltration des organes. L'inhibition de la voie CTLA-4 peut entraîner le développement du diabète insulino-dépendant (DID) qui se caractérise par la génération de lymphocytes T

spécifiques de protéines produites par les cellules I3 des îlots de Langerhans du pancréas [228].

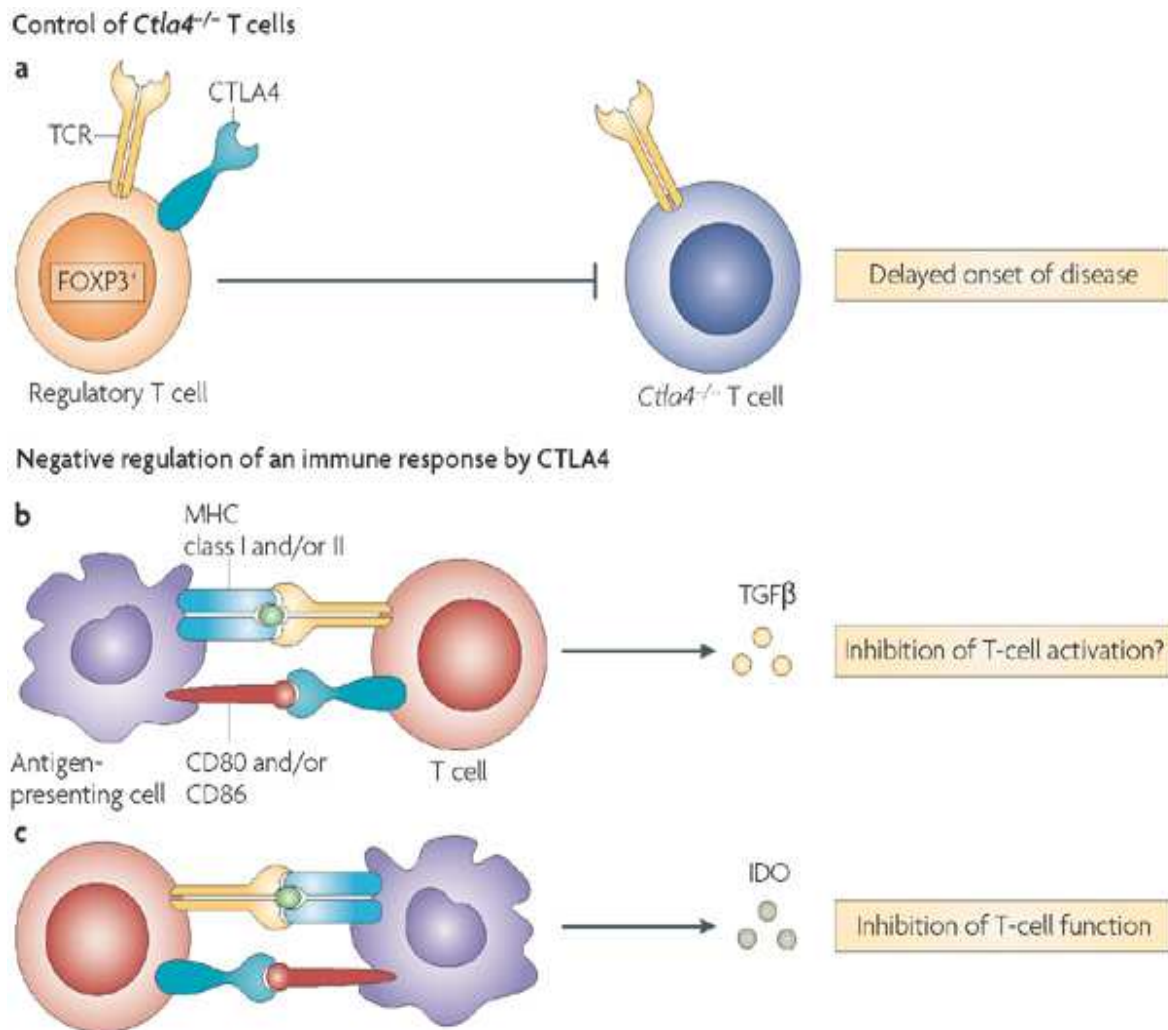


Figure 42: Mécanismes d'action des CTLA-4 [227]

Dans le cas d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), un modèle d'étude de sclérose en plaques par injection de CTLA-4-Ig chez des souris après induction d'EAE prévient le développement de la maladie auto-immune.

Ces résultats confèrent à CTLA-4 un rôle majeur dans la régulation négative de l'activation des lymphocytes T, mais aussi dans la maintenance de l'homéostasie lymphocytaire et le contrôle des lymphocytes T auto-réactifs et des maladies auto-immunes [227].

Le rôle de CTLA-4 chez l'homme est étayé par l'étude des polymorphismes génétiques de cette molécule, associés à la production de protéines d'une efficacité variable. Plus particulièrement, certains polymorphismes engendrent une diminution de la forme soluble de CTLA-4 et sont associés à une susceptibilité augmentée de développer des maladies auto-immunes, Ueda H et al. ont également rapporté la présence d'un épissage alternatif de CTLA-4 générant une variante de la protéine dont la capacité de liaison de CD80/CD86 est altérée, les souris NOD surexprimant particulièrement cet épissage alternatif de CTLA4 ont une susceptibilité augmentée à la survenue de diabète insulino-dépendant [225].

Le ciblage de CTLA-4 dans des thérapies immunomodulatrices fait actuellement l'objet de nombreuses études pour le traitement de certains cancers. Ainsi, une équipe californienne a pu démontrer, dans un modèle murin de cancer de la prostate (TRAMP-C2), le rôle potentiel de CTLA-4. Après induction d'une tumeur métastatique puis résection, deux groupes de souris ont été générés, un premier groupe a été traité par un anticorps contrôle et un second par un anticorps monoclonal neutralisant CTLA-4. Le nombre de récurrences métastatiques est alors réduit de 97 à 44 % avec l'anticorps anti-CTLA-4. Chez l'homme, des études cliniques sont en cours et les premiers résultats tendent à conforter les données des modèles murins.

La modulation de CTLA-4 peut aussi donner lieu à une induction de tolérance et la création d'un environnement favorable à la greffe de moelle osseuse et d'organe [230].

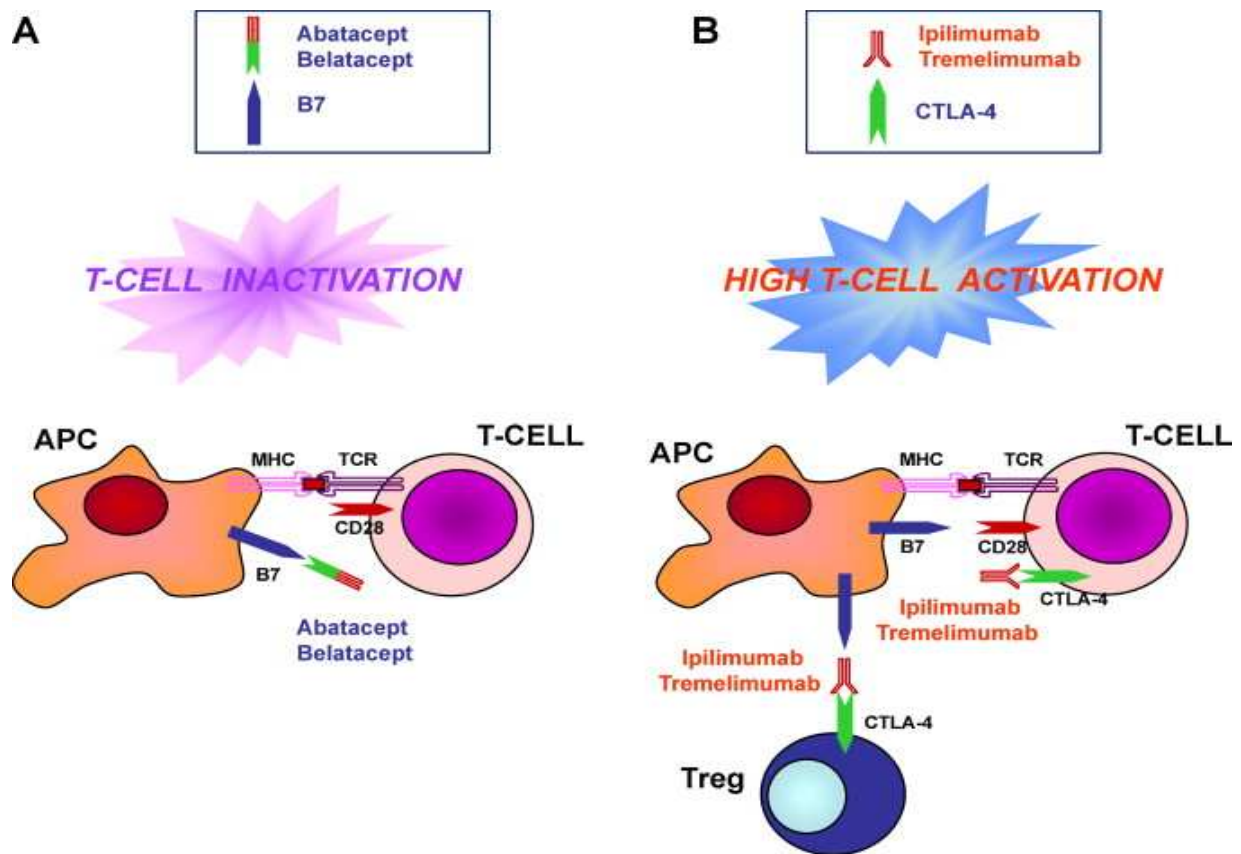


Figure 43: Activation et inactivation des lymphocytes T [229]

III.4.3. rationnel préclinique

L'utilisation d'anticorps neutralisant CTLA-4 dans des modèles murins permet l'obtention de régression de métastases établies ou la prévention de l'apparition de cancers dans des modèles de mélanomes, de fibrosarcomes, de cancers de la prostate. Des le début des années 2000, van Elsas et al. démontrèrent dans un modèle de mélanome murin l'intérêt de l'utilisation d'un anticorps neutralisant CTLA-4 avec un objectif thérapeutique. Ces auteurs ont établi une procédure vaccinale, associant un traitement par anticorps neutralisant CTLA-4 et l'administration d'une lignée de mélanome irradiée (B16) exprimant le GM-CSF. Ces auteurs démontrèrent que l'association de vaccination thérapeutique était efficace et permettait l'éradication de micro métastases du mélanome murin (B16), établies dans des souris CS7/BL6. La régression des tumeurs était corrélée à l'apparition d'une immunité mémoire prévenant l'implantation ultérieure de ce mélanome, Des symptômes auto-immuns

comprenant une dépigmentation furent observés. L'efficacité de la vaccination dans le modèle de souris portant des métastases de B16 dépendait des lymphocytes T CD8+. Au contraire, dans un modèle de vaccination préventive, l'efficacité du traitement par anti-CTLA-4 était indépendante des lymphocytes T CD8 et nécessitait la présence de lymphocytes T CD4. [231] Afin de distinguer l'implication de CTLA4 dans l'immunité dépendant des lymphocytes T CD8 et CD4, Gattinoni et al. ont élaboré un modèle murin déficitaire en CTLA4, dont les lymphocytes T CD8 sont transgéniques pour un TCR et reconnaissent un antigène nominal (pmel-l: antigène melanocytire). Ces souris développent rapidement un vitiligo sévère et une immunité anti-mélanome efficace. L'ablation des lymphocytes T CD4 (non transgéniques) altère l'immunité anti tumorale dépendant des lymphocytes T CD8 et diminue l'incidence des vitiligos. Ainsi, les mécanismes effecteurs des traitements neutralisant CTLA-4 sont complexes et impliquent également de manière non spécifique une augmentation des fonctions auxiliaires des lymphocytes T CD4. Ceci pourrait expliquer en partie le large spectre des maladies auto-immunes observées chez les patients traités par ces stratégies [232].

III.4.3.1. Données cliniques

Ces différentes données ont été transcrites dans la recherche clinique. La neutralisation de CTLA-4 permet d'obtenir 15 à 20 % de réponses objectives dans les protocoles dédiés aux mélanomes métastatiques. Deux anticorps monoclonaux neutralisant CTLA-4 ont été développés (ipilimumab [MDX-OI0] et ticilimumab). Les patients traités par anticorps neutralisant CTLA-4 ont présentés des toxicités de grade III-IV incluant des vitiligos, des dermatites, des néphrites, des hypophysites et des colites inflammatoires.

Plusieurs études rapportent une corrélation entre l'efficacité thérapeutique et la survenue de symptômes auto-immuns [233].

Phan GQ et al. ont publié en 2008 les résultats concernant 14 patients porteurs de mélanomes métastatiques traités par anticorps neutralisant CTLA-4 (ipilimumab) et vaccination sous-cutanée utilisant des peptides de gp100.

Quarante-trois pour cent des patients ont présenté une toxicité auto-immune de grade III ou IV associant essentiellement dermatite, entérocolite, hépatite et syndrome hypophysaire. Ces toxicités furent réversibles par traitement en corticothérapie [232].

Le taux de réponses objectives était de 23 % (2 réponses complètes et 1 réponse partielle). Ces résultats furent confirmés en 2009 par cette équipe dans une cohorte de 56 patients porteurs de mélanome de stade IV en situation d'échappement thérapeutique. Ces 56 patients furent également traités par vaccination sous-cutanée utilisant des peptides de gp100 et ipilimumab. Le taux de réponses objectives était de 13 % incluant deux réponses complètes et cinq réponses partielles. Trente-six pour cent des patients qui présentèrent des toxicités auto-immunes de grade III-IV ont bénéficié de réponses objectives, alors que les auteurs ne rapportent que 5 % de régressions tumorales objectives chez les 42 patients sans symptômes auto-immuns.

Tableau VI: Principaux essais cliniques fondés sur la neutralisation de CTLA-4 [233]

Auteurs	Tumeurs	Patients	Traitement	RO	RC
Phan GQ <i>et col.</i>	Mélanome	14	Vaccination avec peptide et anti CLA-4	21%	14%
Beck KE <i>et col.</i>	Mélanome et carcinome rénal	198	Anti CLA-4	14%	0%
Ribas A <i>et col.</i>	Mélanome	29	Anti CLA-4	14%	7%
Marker AV <i>et col.</i>	Mélanome	24	IL-2 et Anti CLA-4 à 3mg/kg	22%	12.4%

Cette équipe a ainsi établi l'efficacité des stratégies d'immunothérapie basée sur la neutralisation du CTLA-4. L'obtention de manifestations auto-immunes lors de l'utilisation de l'ipilimumab est un facteur prédictif de son efficacité. La régression spontanée de ces toxicités a justifié un plus ample développement clinique de cette molécule dans cette pathologie sans ressource thérapeutique [234].

Dans une autre étude, 19 patients opérés de manière radicale pour des mélanomes de stade III ou IV ont été traités par vaccination peptidique (gp100 et MARTI) et ipilimumab. L'anticorps anti-CTLA-4 fut administré selon une escalade de doses, toutes les quatre semaines pendant six mois puis toutes les douze semaines pendant six mois supplémentaires. Dans cette configuration, la dose maximale tolérée est de 1 mg/kg. Huit patients ont présenté des dermatites ou entérocolites de grade III-IV. Trois de ces patients récidivèrent. À l'inverse, 9 des 11 patients n'ayant pas subi de toxicité auto-immune récidivèrent [233].

Une récente revue de 198 patients traités par ipilimumab pour des mélanomes métastatiques ou des carcinomes rénaux a confirmé l'efficacité clinique de cette molécule avec un taux de réponse objective de 14 % sur cette large cohorte de patients. La toxicité principale fut une entérocolite survenant chez 21 % des patients et consistant en des épisodes de diarrhées de grade III et IV [235].

Les biopsies digestives ont révélé la présence d'un infiltrat lymphocytaire de la muqueuse digestive. Ces symptômes furent sensibles à la corticothérapie pour la majorité des patients. Néanmoins, cinq patients subirent une colectomie secondairement à une perforation digestive. Cinq autres patients ayant développé des entérocolites résistant à la corticothérapie furent traités avec succès par anticorps neutralisant TNF- α . Les auteurs n'ont pas observé d'interférence entre le traitement par corticoïdes et l'efficacité clinique [234].

Le taux de réponses objectives était de 36% et de 35% pour les patients porteurs de mélanomes ou de cancers du rein et ayant présenté des colites inflammatoires.

En l'absence de manifestations auto-immunes, les taux de réponses objectives furent respectivement de 11% et 2% chez ces patients [236].

Un second anticorps neutralisant CTLA-4 fut développé il s'agit du ticilimumab, 34 patients porteurs de mélanomes métastatiques, 4 patients porteurs de cancers du rein et 1 patient porteur d'un adénocarcinome colique furent inclus dans une première étude de phase I évaluant l'intérêt d'un traitement par ticilimumab seul. Une dose maximale de 15 mg/kg fut administrée. Ce traitement fut également associé à des manifestations auto-immunes de type colites inflammatoires, vitiligos, dermatites, panhypopituitarisme, hypothyroïdie.

Deux réponses complètes et deux réponses partielles durables ont été rapportées (25 et 26 mois). Ces réponses furent observées majoritairement pour le palier de dose supérieure, suggérant un effet dose pour cette molécule [237].

Une autre approche thérapeutique a également consisté en l'association de la neutralisation du CTLA-4 et d'un traitement par IL-2. Trente-six patients porteurs de mélanomes métastatiques furent ainsi traités par IL-2 (720000 UI/S h, IV pour un maximum de 15 injections) et par ipilimumab [238].

Trois patients bénéficièrent de réponses complètes et les auteurs notèrent cinq réponses partielles, soit un taux de réponse objective de 22 %. Quatorze pour cent des patients ont développé des symptômes auto-immuns, principalement à type de colite inflammatoire. Cette étude montre que l'association de l'interleukine 2 et de la neutralisation du CTLA-4 est faisable. Néanmoins, les résultats cliniques n'indiquent pas une synergie entre ces deux molécules et n'incitent pas à la poursuite de ce développement [239].

Les différents protocoles évaluant l'intérêt de l'ipilimumab ou du ticilimumab pour la neutralisation du CTLA-4 furent associés à un suivi biologique des réponses immunitaires. Le CTLA-4 étant exprimé sur les lymphocytes T actifs et de manière constitutive sur les lymphocytes T régulateurs, deux effets biologiques principaux pouvaient être attendus. Les données précliniques suggèrent que l'inhibition de CTLA-4 abaisse le seuil d'activation des lymphocytes T CD4 et T CD8. Un deuxième effet potentiellement envisageable est la déplétion des lymphocytes T régulateurs, ce qui est suggéré par la survenue de colites inflammatoires habituellement observées lorsque ces lymphocytes régulateurs sont déficients [240].

Maker et al. ont évalués les réponses immunes d'une cohorte de patients traités par ipilimumab. L'inhibition de CTLA-4 chez ces patients n'a pas affecté le nombre ou les fonctions des lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+POXP3+ [239].

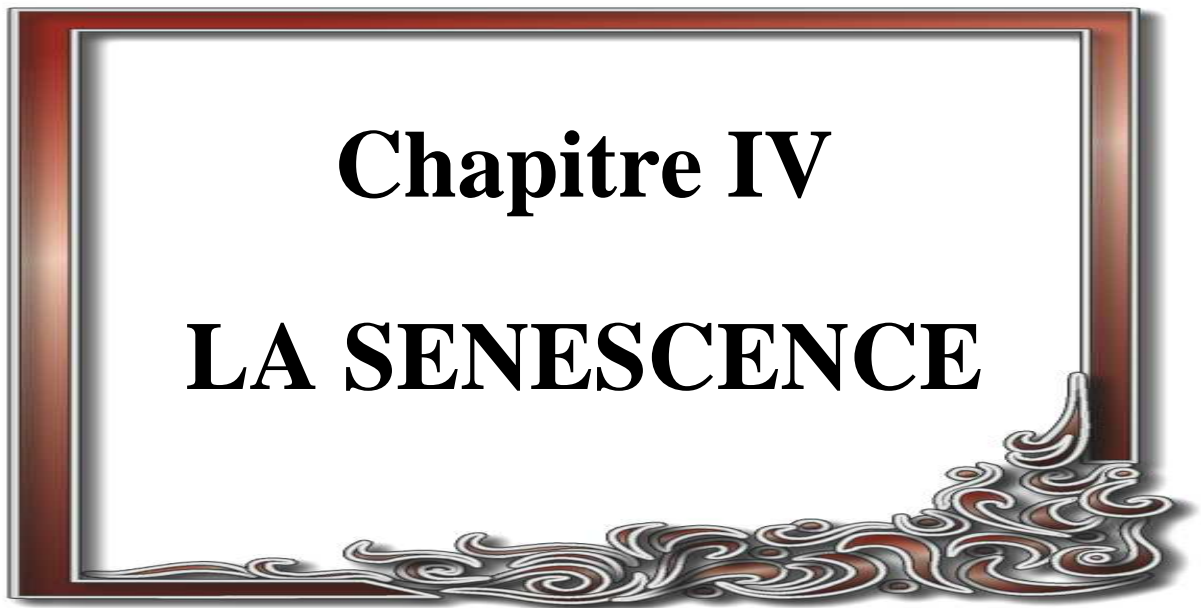
A l'inverse, l'expression de marqueurs d'activation comme HLA-DR était augmentée, suggérant que l'effet principal de cette molécule est de potentialiser l'activation des lymphocytes T effecteurs. Reuben et al. ont effectué une analyse similaire dans une cohorte de patients traités par ticilimumab. Ces auteurs suggèrent que les patients bénéficiant d'une

activité thérapeutique du ticilimumab ont un taux de lymphocytes T régulateurs et un taux d'IL-10 qui diminuent sous traitement [241].

Les lymphocytes T conventionnels de ces patients ont une capacité de production d'IL-2 augmentée. Ces résultats restent préliminaires et la recherche de biomarqueurs associés à l'efficacité de ces traitements doit constituer un enjeu majeur des protocoles en cours de réalisation. Une autre perspective intéressante provient de l'amélioration des modèles précliniques utilisables pour la sélection des anticorps thérapeutiques neutralisant le CTLA-4. Cette approche pourrait permettre d'amener au stade de la recherche clinique des anticorps inhibant CTLA-4 et pourvus d'un meilleur index thérapeutique. En effet, Lute et al. ont produit des souris dont la molécule CTLA-4 fut partiellement humanisée. Dans ce contexte, CTLA-4 reste fonctionnel chez ces souris, mais peut être reconnu et neutralisé par des anticorps ciblant CTLA-4 humain. Plusieurs anticorps neutralisants CTLA-4 furent ainsi développés et analysés pour leur toxicité et efficacité clinique dans ce modèle. Ces auteurs ont démontré que certains de ces anticorps peuvent prévenir la croissance de mélanomes sans engendrer de réponses auto-immunes cliniquement significatives [242].

Les stratégies d'immunomodulation du système immunitaire font maintenant partie de l'arsenal thérapeutique de l'oncologie médicale. Une stimulation excessive du système immunitaire n'est pas sans risque pour le patient (voir les réactions auto-immunes associées au traitement par anticorps anti-CTLA-4).

Ces complications peuvent être réduites en développant des modèles précliniques adéquats, mais aussi en assurant un suivi biologique approprié des patients traités par biothérapie. Les réactions auto-immunes semblent moins problématiques avec l'utilisation des ligands de TLR sur la base des études réalisées et aussi peut-être de l'utilisation locale de certains ligands (imiquimod). L'autre intérêt des ligands de TLR est leur effet direct sur les cellules tumorales. L'efficacité clinique corrélée à l'utilisation d'anticorps neutralisant CTLA-4 suggère également que les traitements interférant avec la tolérance immunologique (à l'échelle cellulaire ou moléculaire) sont un préalable important au développement des stratégies d'immunothérapie antitumorale [243].



Chapitre IV

LA SENESCENCE

Les recherches concernant le cancer et plus précisément les stratégies thérapeutiques ont évolué ces dernières années. En effet, la chimiothérapie a été utilisée pendant plusieurs années comme une modalité majeure de traitement du cancer. Mais le manque de spécificité de certains agents thérapeutiques de cette approche conduit à l'apparition d'effets secondaires important chez les patients atteints de cancer, pouvant aller jusqu'à la destruction de leurs cellules normales et au détournement des mécanismes gouvernant l'homéostasie. Par conséquent, l'objectif majeur est de trouver des cibles moléculaires plus spécifiques des tumeurs, peu exprimées dans les cellules normales [244].

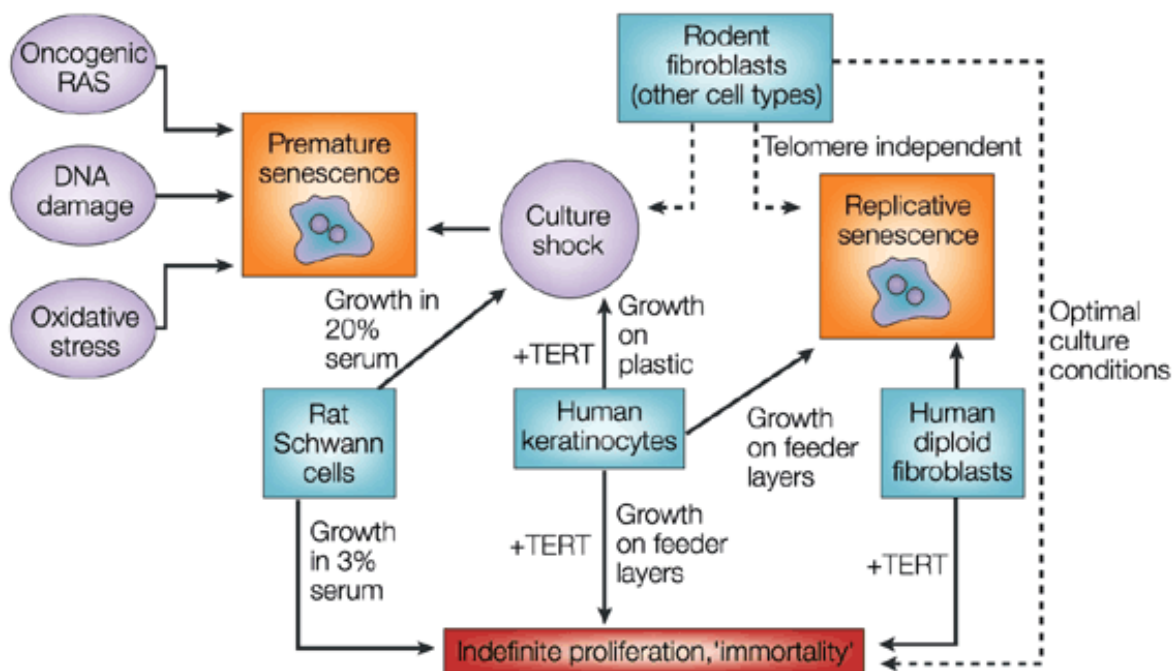


Figure 44: Rôles de la sénescence dans la prolifération cellulaire [245]

Plusieurs cibles moléculaires se sont révélées être indispensables à l'acquisition d'un potentiel prolifératif illimité. Ce dernier constitue une étape clé de l'expansion tumorale et implique une activation du mécanisme de maintien d'un complexe formé par la télomérase, les télomères et les protéines qui leur sont associées. L'ensemble (télomères, télomérase et protéines) a été proposé comme une cible potentielle pour le développement de médicaments anticancéreux [246].

La télomérase est exprimée dans la plupart des cancers humains, mais elle est inactive dans la majorité des cellules normales, à l'exception de celles de la lignée germinale, les cellules souches embryonnaires, les lymphocytes activés, le tissu de l'endomètre durant le cycle menstruel et les cellules de la couche basale épidermique. Cette distinction met en évidence une cible attrayante pour la conception des inhibiteurs en vue du traitement de cancers, tout en minimisant les effets secondaires toxiques dans les cellules normales qui n'expriment pas la télomérase [247].

IV.1. Télomères

Les télomères (**Figure 45**) constituent un édifice nucléoprotéique situé à l'extrémité de chaque chromosome, permettant sa protection des phénomènes de fusion et de dégradation. Chez l'homme et chez la plupart des organismes, les télomères consistent en une région double brin de 10 à 15 kb, contenant de nombreuses répétitions en tandem de séquences hexanucléotidiques de type TTAGGG. L'extrémité terminale du télomère est composée d'une extension 3' simple brin d'environ 200 à 300 nucléotides.

À chaque cycle cellulaire, les télomères se raccourcissent d'environ 50 à 150 pb, phénomène résultant essentiellement du problème de fin de réplication et autres événements qui lui sont associés, et qui peuvent être surmontés par l'expression de la télomérase. Celle-ci est un complexe ribonucléoprotéique dont l'holoenzyme comporte deux sous-unités, la télomérase reverse transcriptase (TERT) et la télomérase RNA template (TR ou TERC).

Dans les cellules normales, télomérase négative, un raccourcissement progressif des télomères a lieu à chaque division cellulaire conduisant à la sénescence [249].

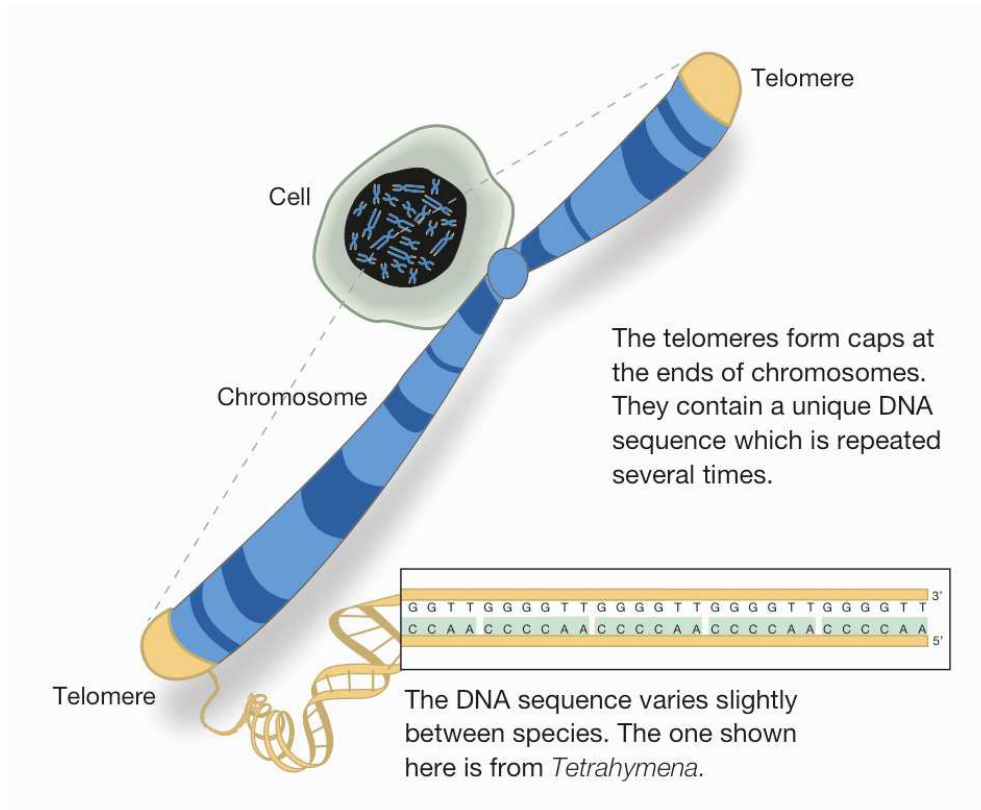


Figure 45: Structure des télomères [250]

À l'opposé, dans 85 à 90 % des cellules cancéreuses, cette érosion télomérique est contrecarrée grâce à l'expression d'une télomérase active qui, en plus du maintien de la longueur des télomères, offre à ces cellules une capacité proliférative illimitée par échappement à la mortalité précoce induite par la sénescence ou l'apoptose. Dans les 10 à 15 % des tumeurs restantes, le maintien de la région télomérique est assuré par un mécanisme alternatif lengthening of télomères (ALT) impliquant une recombinaison homologue [250].

Certaines protéines associées au télomère, et composant ce que l'on appelle la coiffe télomérique, possèdent un rôle actif dans la régulation de sa longueur et de sa protection. En fait l'ADN double brin télomérique possède des partenaires protéiques spécifiques, représentés par deux facteurs de fixation spécifiques des répétitions télomériques (Telomere Repeat Binding Factor) TRF1 et TRF2. Ces protéines fonctionnent comme des homodimères

grâce à un domaine TRFH (TRF homology) de dimérisation, régulent l'élongation des télomères et permettent leur protection [251].

La protéine TRF2 se fixe sur la partie double brin de l'ADN télomérique et favorise la formation de la T-loop (grande structure créée par l'invasion du duplex télomérique par le brin G télomérique). En effet, elle stimule la voie de raccourcissement des télomères dans les cellules primaires sans accélérer la sénescence. Ainsi elle protège les télomères ayant atteint une taille critique du phénomène de fusion [250].

Chez l'homme la régulation de l'état homéostatique de la longueur des télomères est contrôlée par un système de commutateur binaire faisant intervenir principalement la protéine TRF1 [252].

Lorsque le télomère est long et recrute de nombreuses molécules du complexe TRF1, il commute vers un état fermé sur lequel la télomérase n'est pas active. À l'inverse, la perte des répétitions télomériques diminue la fixation du complexe TRF1 et le télomère adopte davantage un état ouvert accessible à la télomérase [253].

La protéine hPOT1 (human protection of telomeres) fixe la partie simple brin du télomère en se liant spécifiquement aux bases TTAGGG. Elle intervient dans la régulation de la longueur du télomère. En effet, la surexpression de la protéine hPOT1 induit une augmentation de la taille du télomère dans les cellules ALT, alors que dans les cellules télomérase-positives, elle rend l'extrémité 3' du télomère inaccessible à la télomérase et inhibe donc l'élongation du télomère. La protéine hPOT1 établit des interactions avec d'autres protéines télomériques telles que PTOP (PIP1 ou TINT1), TIN2 (TRF1 interacting protein 2), TRF1 et TRF2. hPOT1 s'associe directement avec la protéine PTOP qui à son tour interagit avec TIN2, un facteur protéique qui permet la fixation de ce complexe sur le télomère par son interaction avec TRF1. Aussi, TIN2 peut s'associer à la protéine TRF2, ce qui permet d'établir un lien entre la structure télomérique induite par TRF2 (T-loop) et la régulation de l'activité télomérasique par la protéine TRF1. Cette connexion des deux complexes (TRF1 et TRF2) permet donc la stabilisation de leurs niveaux d'expression et de leur localisation au niveau des télomères et module leur fonction de coiffe [254].

En plus de leurs interactions avec des protéines télomériques, TRF1 et TRF2 établissent aussi des liens avec d'autres facteurs permettant de moduler leurs activités. En fait, l'interaction et la modification de TRF1 par l'activité poly (ADP-ribose) polymérase des tankyrases 1 et 2 entraînent la diminution de sa capacité de se lier à l'ADN télomérique d'où son accessibilité à la télomérase. L'interaction de TRF2 avec la protéine hRAP1 entraîne la formation d'un complexe TRF2-hRAP1. Ce dernier interagit avec un autre complexe de réparation d'ADN MRE11/RAD50/NBS1, les endonucléases de réparation d'excision de nucléotides ERCC1/XPF, les hélicases WRN et BLM, les hétérodimères Ku et les ATM kinases [255].

IV.2. Télomérase et cancer

La télomérase est une transcriptase réverse spécialisée qui assure la réplication des extrémités télomériques des chromosomes. Elle est formée d'une sous-unité catalytique hTERT, dont le rôle majeur est la polymérisation des nucléotides, et d'un composant ARN hTR servant de matrice pour l'addition de séquences répétitives aux extrémités 3' des chromosomes. Ces sous-unités s'associent pour former un complexe tétramérique catalytiquement actif auquel se lient plusieurs protéines incluant TP1, HSP23 et HSP90, hSTAU, L22 et dyskérine [256].

Comparé au composant hTR qui est ubiquitairement exprimé, le composant catalytique de la télomérase est typiquement exprimé dans les tissus tumoraux télomérase positifs. Cette observation a suggéré que hTERT était un facteur limitant pour la restauration de l'activité télomérasique, et son expression est strictement régulée à plusieurs niveaux. En effet, le gène de hTERT s'étend sur environ 35 kb, comportant 16 exons et 15 introns, et son expression est étroitement contrôlée par des mécanismes régulateurs multiples incluant l'amplification génique, la régulation transcriptionnelle, les modifications épigénétiques et l'épissage alternatif [258].

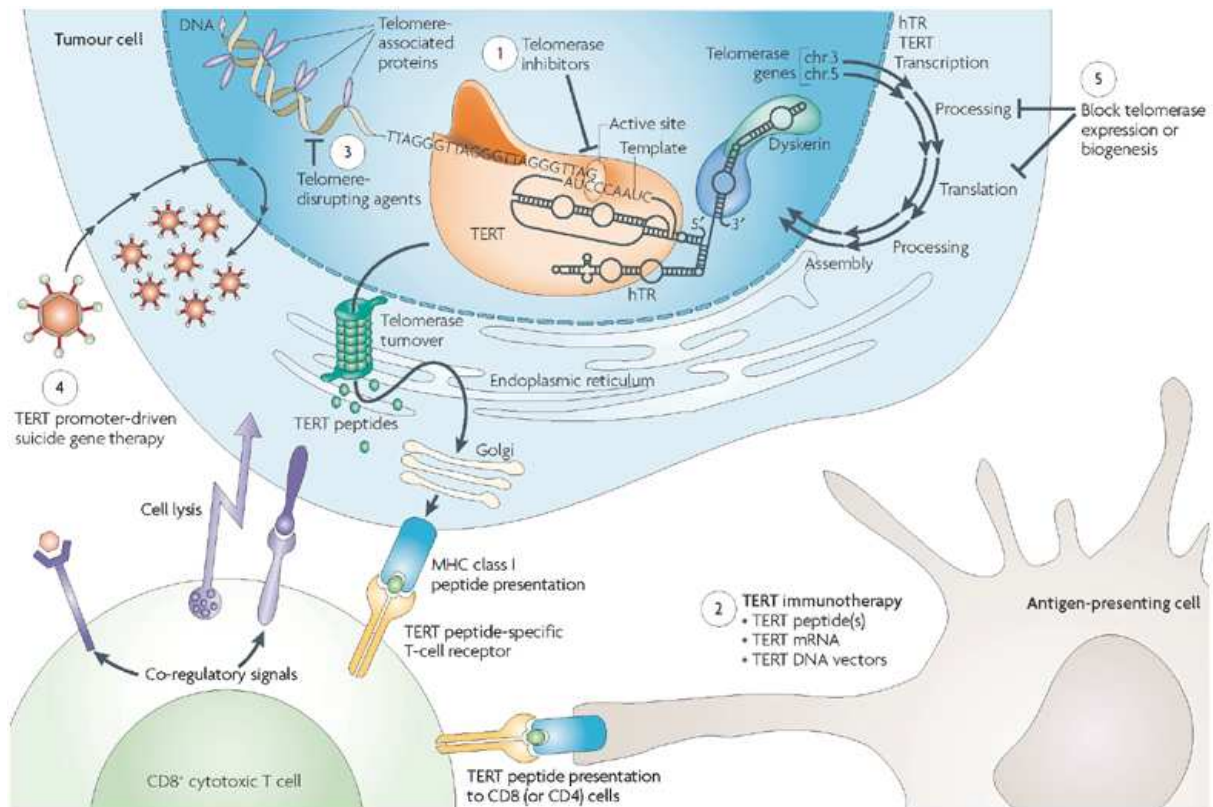


Figure 46: Rôles des télomérase dans le cancer [257]

L'ARN pré messager de hTERT est modifié post-transcriptionnellement par épissage alternatif, un processus qui génère différents transcrits de hTERT ayant des fonctions distinctes et peut agir comme un commutateur permettant ou non l'expression du gène. De nombreux gènes associés au cancer peuvent subir un épissage alternatif, parmi lesquels BCL-2, BCL-X, BAX, BIM, FAS, caspase 2, CD44, p73, BRCA2, Wilm's tumor suppressor gene, cathepsin B et hTERT. Actuellement, sept variants d'épissage alternatif de hTERT (quatre variants de délétion [α^- , β^- , $\alpha\beta^-$, γ^-] et trois variants d'insertion [1, 2 et 3]) ont été identifiés par RT-PCR [259].

Le transcrit α^- a perdu 36 nucléotides à l'extrémité 5' de l'exon 6 qui code pour le domaine A appartenant aux motifs de transcription inverse de l'enzyme; le transcrit β^- est caractérisé par la délétion entière des exons 7 et 8, qui a pour résultat la formation d'un codon-stop causant une terminaison prématurée de la traduction; le transcrit $\alpha\beta^-$ combine les deux délétions; le

variant γ^- génère un transcrit dépourvu de l'exon 11 se trouvant au sein des motifs de transcription réverse D et E. Vu que l'épissage alternatif élimine les motifs de transcription, les transcrits issus de la délétion ne peuvent pas coder pour une protéine fonctionnelle.

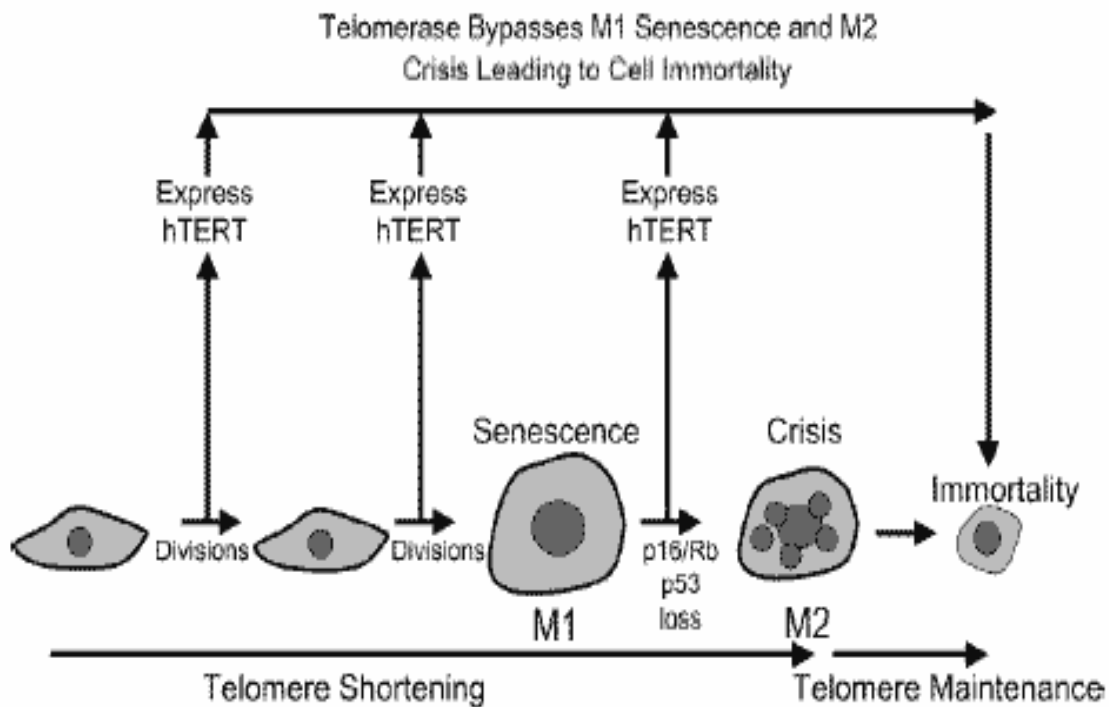


Figure 47: Télomères et immortalité cellulaire [260]

En fait, il a été récemment suggéré que le variant d'épissage α^- agissait comme un inhibiteur négatif dominant de l'activité télomérasique. En outre, l'épissage alternatif de hTERT joue un rôle important dans la régulation de l'activité télomérasique durant le développement embryonnaire, et un tel mécanisme de régulation est aussi actif dans les tumeurs humaines [261].

IV.3. Inhibiteurs des télomères et de la télomérase

La modulation de l'activité télomérasique dans les cellules cancéreuses peut être assurée par différents types d'inhibiteurs. En fait, un inhibiteur typique doit avoir un nombre de propriétés essentielles qui incluent:

- *les agents thérapeutiques doivent inhiber l'enzyme à des concentrations nanomolaires.
- *l'exposition continue à l'inhibiteur doit causer le raccourcissement graduel des télomères.
- * l'exposition chronique à l'inhibiteur doit conduire à la sénescence.
- * l'inhibiteur doit montrer une faible toxicité et ne pas influencer les voies de croissance jusqu'au raccourcissement des télomères.
- *l'inhibiteur doit être une petite molécule qui peut pénétrer une tumeur assez profondément pour atteindre toutes les cellules cancéreuses. Il existe différentes molécules qui montrent plusieurs de ces propriétés et agissent par différents mécanismes [262].

IV.3.1. Approche anti sens

Parmi les approches anticancéreuses, les stratégies anti sens, développées d'abord comme des outils de validation du ciblage, représentent une approche utilisable en thérapeutique pour inhiber l'expression de gènes spécifiques. Plusieurs oligonucléotides anti sens ont été testés dans des études cliniques sur des patients atteints de cancer et ont été capables d'induire une inhibition de l'activité télomérasique et un arrêt de croissance des cellules cancéreuses. Les oligomères anti sens sont des molécules qui se lient aux acides nucléiques. Ils ciblent un ARN donné au sein des cellules d'une manière séquence-spécifique en respectant les règles de complémentarité de Watson et Crick. La modalité d'action des oligonucléotides anti sens peut être assurée par deux mécanismes principaux entraînant la dégradation de l'ARN cible. Cette dégradation peut être réalisée soit par le recrutement de la RNase H (famille d'enzymes ubiquitairement exprimées qui coupent le brin d'ARN d'un hétéroduplex (ARN-ADN) ou de la RNase L, soit par des acides nucléiques catalytiques tels que les ribozymes à tête de

marteau (hammerhead ribozymes) et les DNazymes, ou encore par l'activation de l'interférence ARN [263].

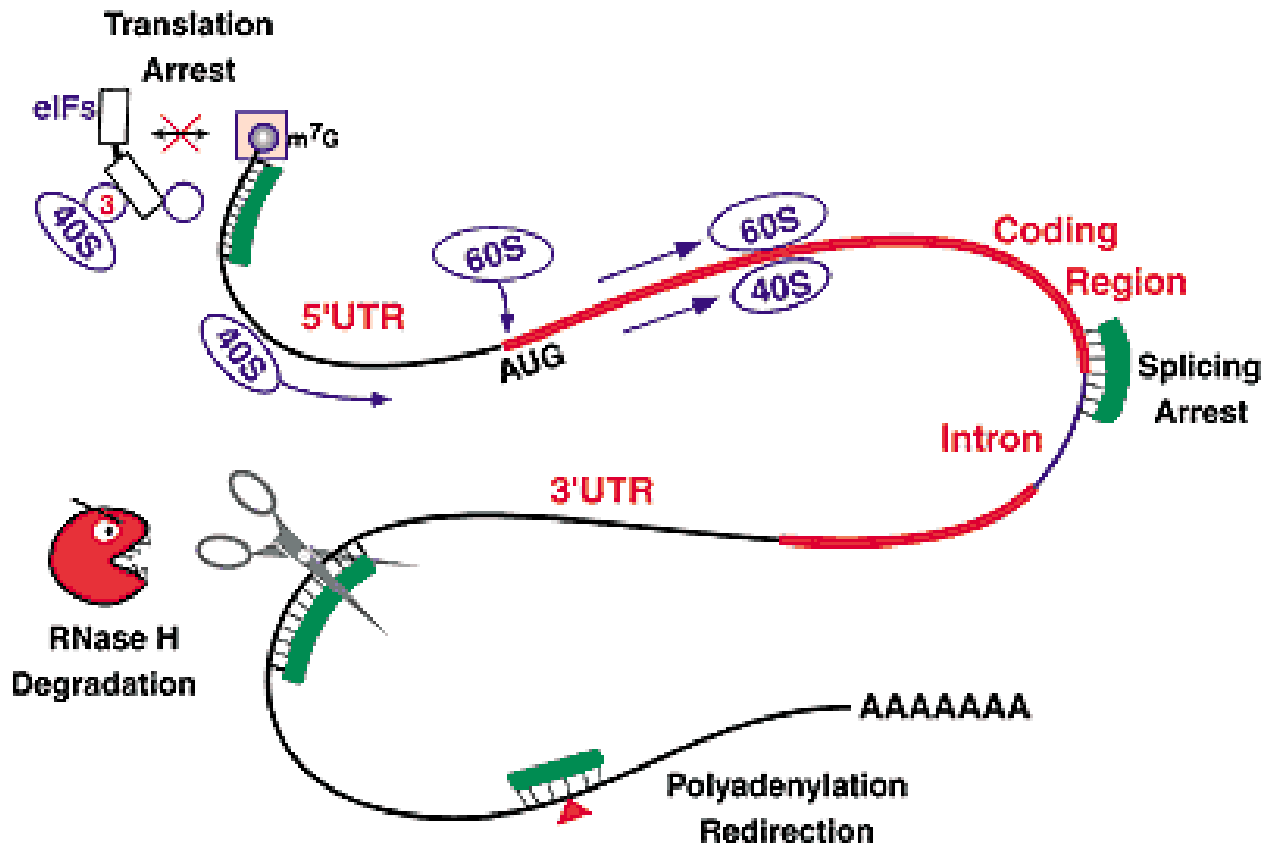


Figure 48: Approche anti sens par dégradation de la RNase [264]

IV.3.1.1. Oligonucléotides antisens ciblant hTR

Le ciblage de l'ARN de hTR est une stratégie qui vise à bloquer l'accès de la télomérase à son ARN matrice, résultant en une inhibition de son activité [265].

Les études utilisant des N3' → P5' oligonucléotides à liaison phosphorothioate (NPS) ont montré un effet thérapeutique potentiel dans des lignées de cellules du cancer du sein humain. Le traitement à long terme résulte en un raccourcissement graduel des télomères, une sénescence cellulaire et une apoptose. Après optimisation de la séquence et de la longueur de ces oligonucléotides, la disponibilité biologique a été améliorée et a conduit au développement d'un antagoniste potentiel de hTR nommé GRN163L. Ce dernier est capable

d'inhiber l'activité télomérasique et de provoquer la sénescence et l'apoptose après raccourcissement progressif des télomères dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses [266].

Cet agent antagoniste de la matrice de la télomérase est en train d'entrer dans les essais cliniques. La séquence 5'-Palm-TAGGGTTAGACAA-3' est complémentaire à une région de 13 nucléotides partiellement étendue de quatre nucléotides à l'extrémité 5' de la région matrice de la hTR (**Figure 49**). Ce 13 merthiophosphoramidate cible le composant hTR de la télomérase. Les oligonucléotides GRN163L, formant des duplex stables avec l'ARN simple brin, sont chargés négativement à pH neutre, résistent à la dégradation par des nucléases et montrent une haute spécificité pour les cibles d'ARN et d'ADN. Les duplex formés par les oligonucléotides phosphoramidés ne sont pas les substrats de l'hydrolyse par les RNases H, et n'ont pas montré de toxicité à des doses biologiques efficaces [267].

D'autres chercheurs ont utilisé des types alternatifs d'oligonucléotides d'ARN ciblant la région matrice de hTR, tels que le 2'-O-méthyl (2'-O-Me), les oligonucléotides phosphorothioates (S-ODNs) ou les 2'-O-(2-méthoxyéthyl) ARNs (2'-MOEs). L'introduction des 2'-MOEs dans la lignée de cancers de la prostate DU145 entraîne l'inhibition de la télomérase au bout de sept jours, et le raccourcissement progressif des télomères avec une apoptose terminale des cellules traitées possédant des télomères suffisamment courts [266].

Un autre candidat prometteur est l'antisens anti-hTR de type 2'-5' oligoadénylate (2-5A). Les injections répétées de liposomes contenant le 2-5A à la souris ont montré un effet antitumoral significatif. L'expression de tels oligonucléotides oligoadénylates entraîne normalement l'activation de RNase L, qui est responsable de la dégradation de l'ARN simple brin, un processus faisant partie du système antiviral autonome menant à l'apoptose dans les cellules humaines. Plusieurs modèles de xénotransplante de gliome et de cancer de la vessie traités par le 2-5A ont montré une diminution du volume de la tumeur due spécifiquement à l'induction de l'apoptose. De plus, une synergie entre cette approche et les cytotoxiques conventionnels tels que le cisplatine a été aussi rapportée, ce qui conduit à considérer le 2-5A comme un bon candidat en vue de développements ultérieurs [269].

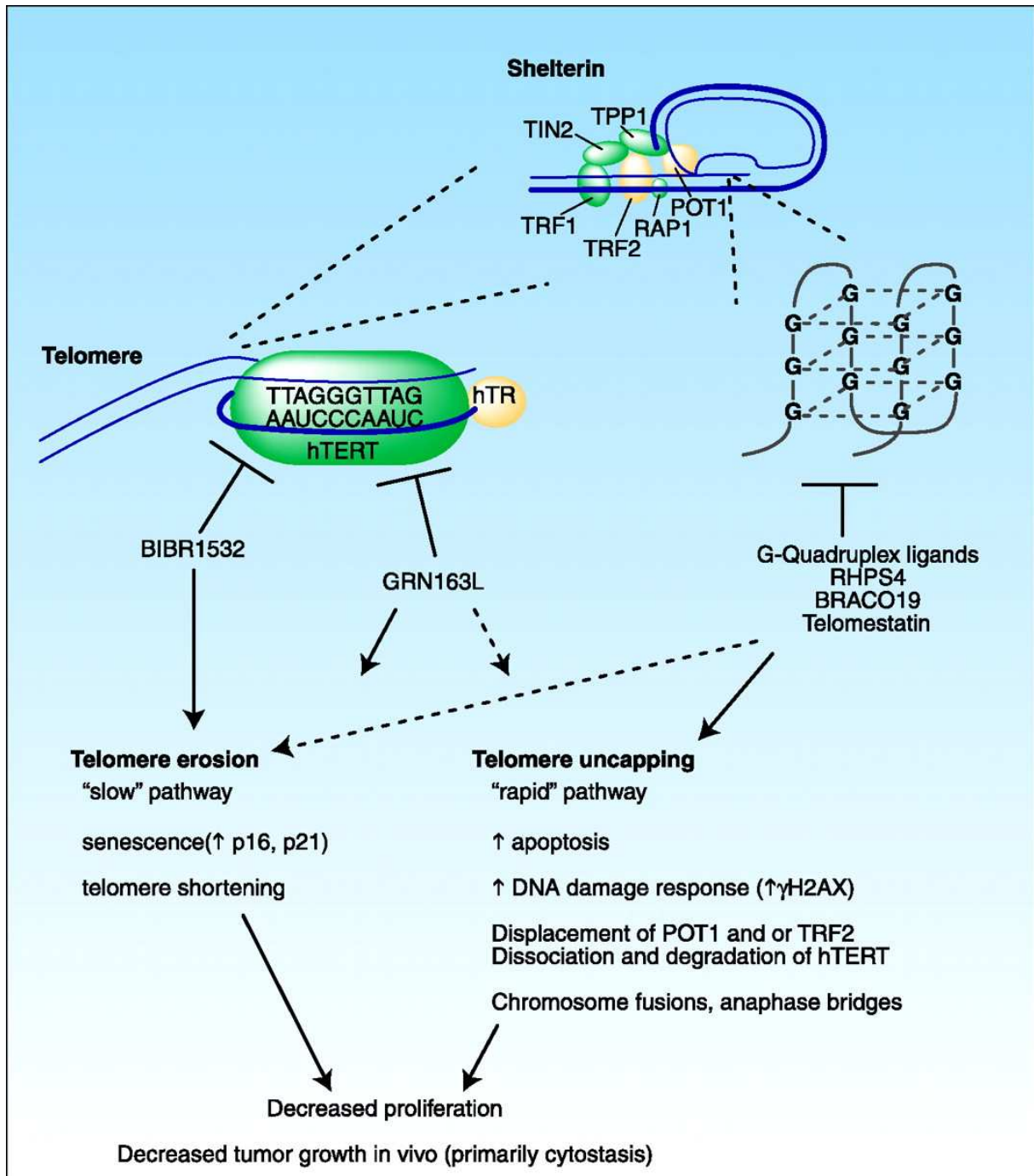


Figure 49: Oligonucléotides antisens ciblant hTR [268]

IV.3.1.2. Oligonucléotides antisens ciblant hTERT

Du fait que l'expression de hTERT est une étape limitante de la voie d'activation de la télomérase, la diminution de l'expression de l'ARNm de hTERT réalisée par l'approche antisens peut représenter un excellent moyen de régulation de l'activité enzymatique dans les cellules cancéreuses (**Figure 50**) [270].

Cependant, la hTERT est une cible moins accessible que hTR pour les stratégies antisens. En effet, son ARNm présente une structure secondaire complexe qui rend difficile de prédire quel site cible sera plus accessible à l'hybridation. En conséquence, seules quelques approches basées sur des oligonucléotides anti-hTERT ont été développées pour l'inhibition de la télomérase [272].

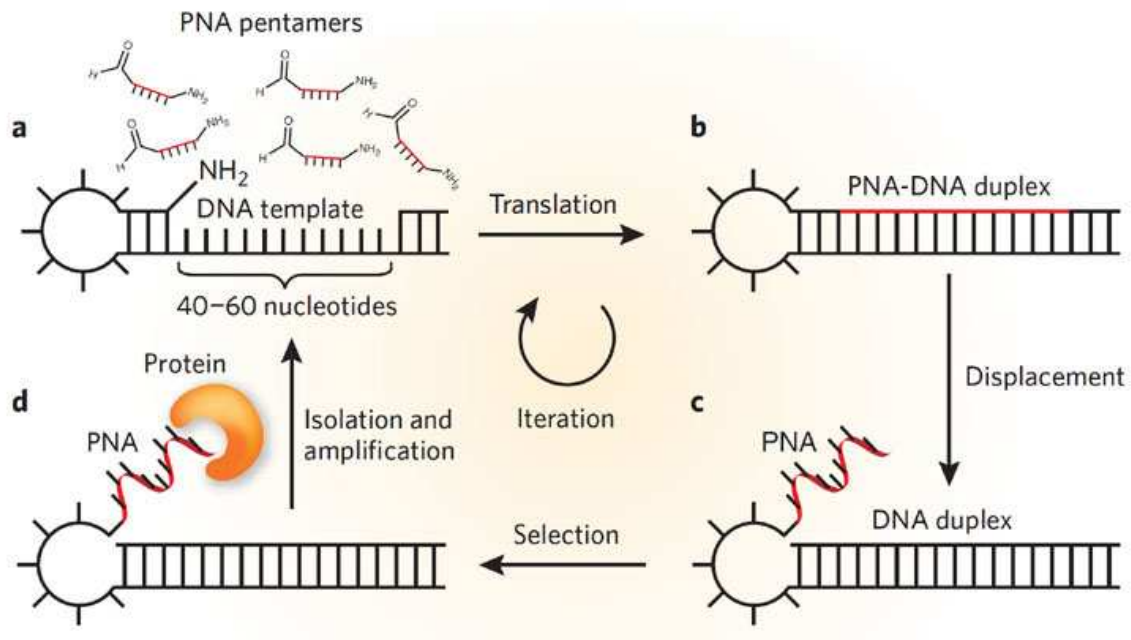


Figure 50: Oligonucléotides antisens ciblant hTERT [271]

Les acides nucléiques peptidiques (peptide nucleic acids [PNAs]) sont des analogues d'ADN et d'ARN dans lesquels le phosphate du pentose est remplacé par un oligomère de N-(2-aminoéthyl) glycine, les rendant résistants à la dégradation par les nucléases. Ces PNAs sont

capables d'agir par une inhibition spécifique de la télomérase. Malheureusement, la faible perméabilité de la membrane aux PNAs est un obstacle majeur à la disponibilité optimale vis-à-vis des cellules [273].

Les PNAs anti-hTERT ont été testés sur des lignées de cancer de la prostate par une méthode d'internalisation photochimique. Après exposition à la lumière, les cellules ont montré une inhibition de l'activité télomérasique et une réduction importante de la survie cellulaire. Le potentiel thérapeutique des stratégies antisens utilisant des PNAs est très prometteur, et la preuve de l'efficacité de l'inhibition antisens de l'ARNm de hTERT avec une régression finale de la tumeur a pu être clairement apportée sur des modèles animaux [272].

IV.3.2. Ribozymes

Les ribozymes (**Figure 51**) sont de petites molécules d'ARN qui possèdent une activité endoribonucléase spécifique catalysant l'hydrolyse des liaisons phosphodiester et entraînant le clivage des séquences des ARNs cibles. Théoriquement, ils offrent de grandes possibilités pharmacologiques telles qu'une grande stabilité, une disponibilité biologique importante et une bonne spécificité [274].

Plusieurs domaines catalytiques dérivés des ribozymes naturels ont été identifiés; les plus communs parmi eux sont les structures à tête de marteau et celles en épingle à cheveux. Du fait de leur simplicité et de leur petite taille, les ribozymes en tête de marteau ont suscité beaucoup d'attention en raison de leur utilité thérapeutique potentielle et la possibilité d'être incorporés dans une variété de séquences manquantes sans changement des capacités de clivage spécifiques d'un site donné.

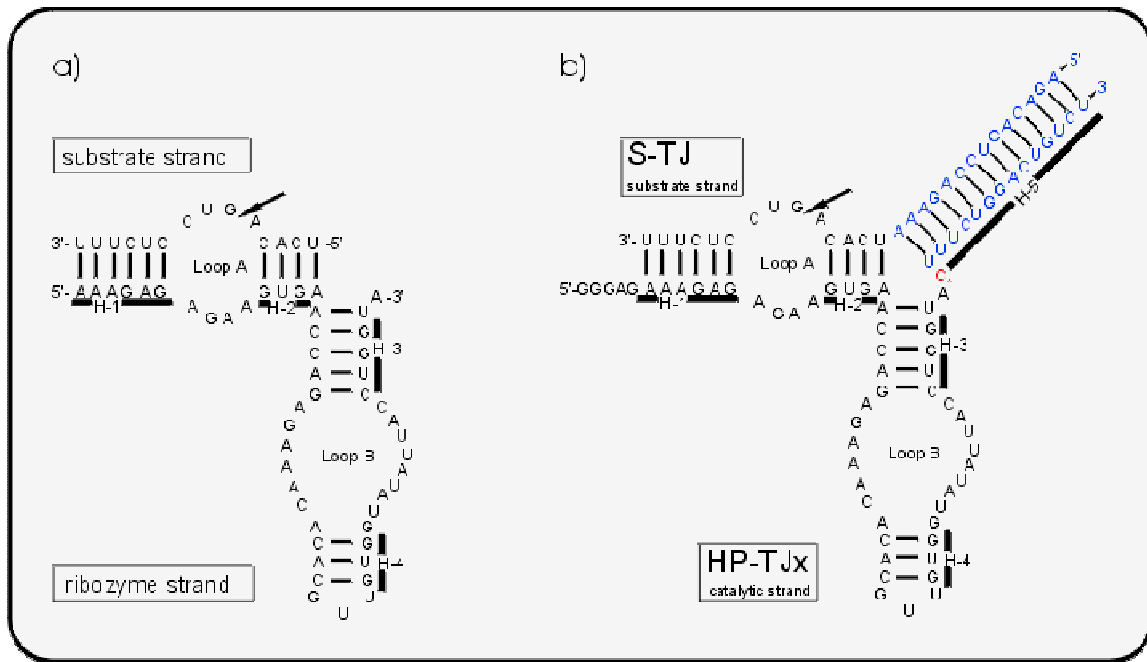


Figure 51: Action des ribozymes [275]

En fait, le ribozyme à tête de marteau est constitué de 40 nucléotides, d'un noyau catalytique très conservé qui clive l'ARN substrat au niveau du deuxième H de la séquence consensus NHH, où N représente n'importe quel nucléotide et H est n'importe quel nucléotide sauf l'acide guanidylique [276].

Le potentiel catalytique de tels ribozymes peut être exploité pour cliver n'importe quelle séquence consensus NHH au niveau d'un ARN substrat donné. Cela est régi par l'addition de séquences nucléotidiques qui sont spécifiquement complémentaires de celles de l'ARN cible. En outre, après la réaction de clivage, le substrat devient plus accessible aux ribonucléases, ce qui entraîne sa dégradation. En plus de leur activité catalytique, les ribozymes possèdent une capacité de se lier à l'ARN cible et peuvent induire une dégradation de la cible grâce à des RNases comme conséquence de la formation d'un ARN double brin. Une des limitations majeures de l'utilisation thérapeutique des ribozymes à tête de marteau est leur pénétration intracellulaire. Il existe deux principales voies pour délivrer le ribozyme à son ARN cible cellulaire:

- une délivrance exogène, au cours de laquelle les ribozymes présynthétisés sont introduits directement dans les cellules à l'aide du transfert cationique assuré par un liposome;
- une délivrance endogène au cours de laquelle la transcription intracellulaire d'une séquence codante pour un ribozyme est réalisée par transfection des vecteurs exprimant le ribozyme dans les cellules [278].

En utilisant les deux approches, un grand nombre d'études sur des modèles de tumeurs humaines ont montré la possibilité d'obtenir ainsi une régulation négative efficace de plusieurs gènes associés au cancer comme hTR et hTERT. En fait, l'introduction des ribozymes ciblant l'ARNm de la hTERT ou le hTR dans des cellules cancéreuses variées entraîne l'inhibition de l'activité télomérasique, le raccourcissement des télomères et l'apoptose [279].

IV.3.2.1. Ribozymes ciblant hTR

Comme déjà mentionné, la stratégie antisens a montré des progrès significatifs et a été enrichie d'une manière élégante par la technologie des ribozymes. Kanazawa et al ont été les premiers à développer un ribozyme à tête de marteau ciblant l'extrémité 3' du GUC₄₆ localisé à la terminaison de la matrice de la télomérase (**Figure 52**). Ce ribozyme contient un domaine catalytique avec une séquence flanquante de 10 pb de nucléotides complémentaires aux séquences 5' et 3' du site cible. Lorsqu'il est ajouté aux extraits de deux lignées de cellules de carcinomes hépatocellulaires (Hep-2 et Huh-7), le ribozyme induit une inhibition dose-dépendante de l'activité télomérasique [280].

Des ribozymes anti-hTRs utilisés dans plusieurs autres études ont entraîné une inhibition spécifique de la télomérase et un retard de la croissance des lignées cellulaires. Cependant, une apoptose efficace et une réduction de la longueur des télomères n'ont pas toujours été observées. Néanmoins, une étude récente a démontré une atténuation nette de l'activité télomérasique par des ribozymes à tête de marteau ciblant le hTR, induisant efficacement l'apoptose dans les cellules de tumeurs du sein [281].

dirigée vers des cibles naturelles. En outre, L'ARNi peut jouer un rôle important dans la protection du génome contre l'instabilité causée par les transposons et les séquences répétitives [284].

Kosciolek et al sont les premiers à décrire l'utilisation de l'ARNi pour inhiber la télomérase. Deux types de molécules d'ARN ciblant les composants hTR et hTERT de la télomérase humaine ont été développés: les ARNi obtenus par synthèse chimique et de longs ARN double brin exprimés dans les cellules cibles sous forme de structures en épingle à cheveux [285].

La capacité des ARNi obtenus par synthèse chimique à inhiber l'activité télomérasique a été évaluée dans un panel de cellules de cancers humains (côlon, cerveau, poumon et peau). Les résultats montrent que l'ARNi ciblant le composant hTR est plus efficace dans l'induction de l'inhibition de l'activité catalytique de l'enzyme que celui ciblant le composant catalytique hTERT. L'effet antitélomérase a été dépendant de la concentration d'ARNi. De plus, les clones transfectés exprimant l'ARNi dirigé contre la sous-unité hTR ont montré une inhibition importante de l'activité catalytique de l'enzyme, une diminution des taux d'expression de l'ARN de hTR et une réduction du contenu en ADN télomérique [287].

Récemment, Lu et al ont obtenu une inhibition de l'activité télomérasique dans une lignée de cellules de carcinome hépatocyttaire par utilisation d'ARNi. Cette inhibition résulte d'une diminution importante de hTERT, et d'un taux d'apoptose significativement plus élevé que celui des cellules témoins [288].

L'approche antisens semble prometteuse, cependant l'approche anti-hTERT nécessite une meilleure identification des séquences d'ARNm à cibler, du fait de l'hétérogénéité des ARNm issus de l'épissage alternatif [287].

IV.4. Dominants négatifs de hTERT (DN-hTERT)

L'induction de changements spécifiques d'acides aminés entraîne l'émergence de certaines protéines mutantes de hTERT dites DN-hTERT. Ces dernières sont catalytiquement inactives, mais capables de séquestrer le composant ARN de hTR. Des études développées in vitro et in vivo ont permis de mettre en évidence plusieurs potentialités de ces DN-hTERT. En effet,

elles sont capables d'inhiber efficacement la télomérase en causant un raccourcissement télomérique progressif, entraînant l'apoptose [289].

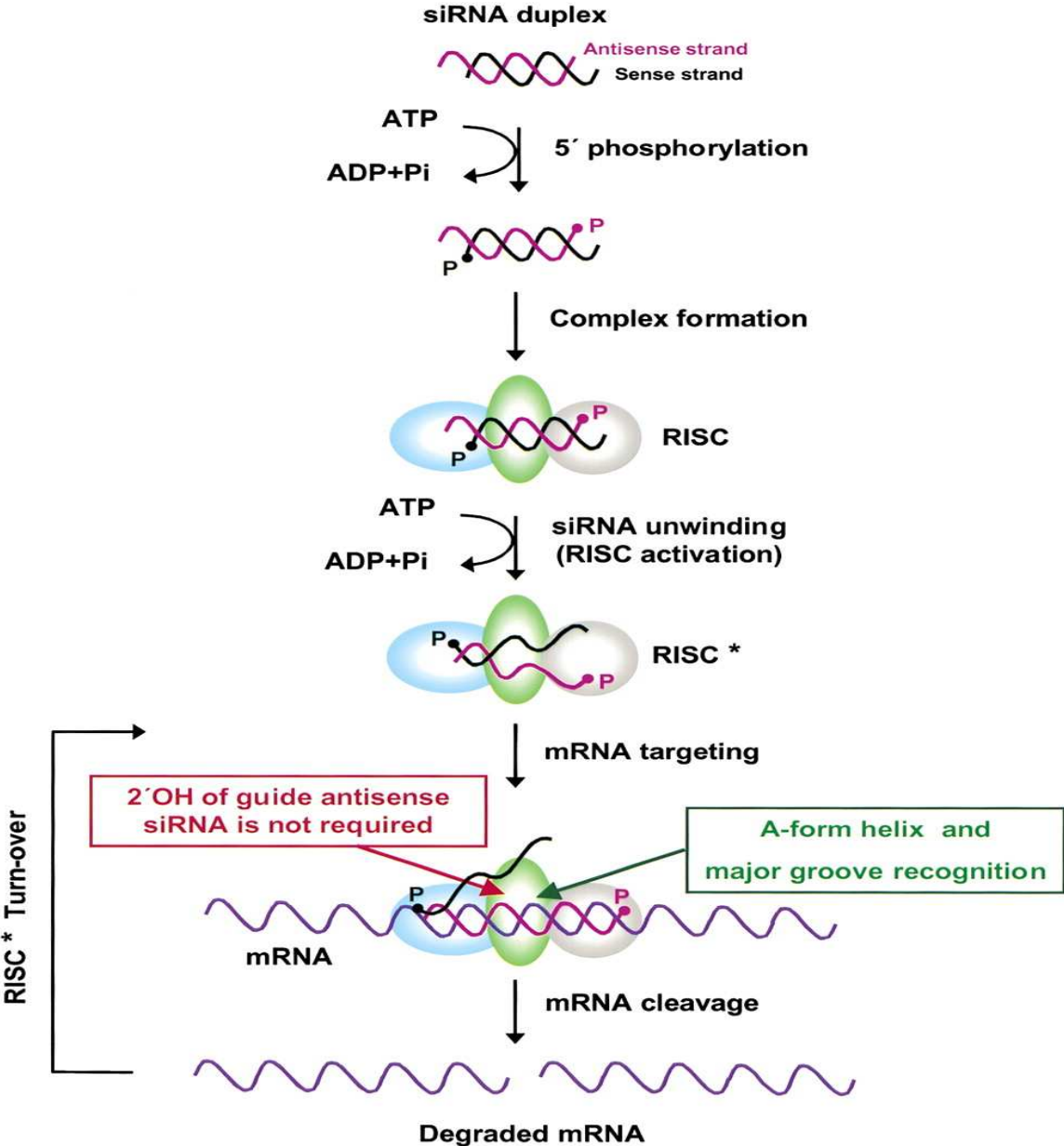


Figure 53: Mécanisme de modulation de l'interférence ARN (ARNi) [286]

Hahn et al ont montré les possibilités de cette approche in vivo en injectant des cellules de cancer ovarien chez des souris immunodéficientes. Les cellules contenant la hTERT sauvage et les vecteurs témoins ont continué à produire des tumeurs tandis que les cellules renfermant le DN-hTERT n'ont pas formé de tumeurs. Il a été montré aussi que les DN-hTERT sensibilisent les cellules tumorales à d'autres thérapies antinéoplasiques, telles que le cisplatine, le docétaxel, l'étoposide, l'ecteinascidine-743, le témozolomide et l'imatinib. Cependant, des problèmes potentiels doivent être résolus avant de traiter des patients par une approche dominant négatif. Ces problèmes concernent la façon de délivrer les produits aux cellules (par des vecteurs) et de surmonter les facteurs de risque liés à la thérapie génique. Ainsi, malgré les nombreuses études développées in vitro, cette approche est toujours loin d'entrer en clinique [287].

IV.5. Ciblage des mécanismes régulateurs de la télomérase aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel

La régulation de l'expression de la télomérase est contrôlée aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel. Le ciblage des facteurs régulateurs de la télomérase a été évalué dans plusieurs études [290].

IV.5.1. Niveau transcriptionnel

Le contrôle transcriptionnel de hTERT est apparu comme un moyen important de régulation de l'activité télomérasique. En effet, différents facteurs de transcription régulent l'activité télomérasique en se liant à de nombreux sites au niveau du promoteur du gène de hTERT. Ces facteurs de transcription incluent p53, MZF-2, MEN1, MAD1, WT-1, le récepteur des estrogènes, E2F-1 et c-MYC. Ce dernier est étroitement associé au comportement prolifératif des cellules et constitue un candidat intéressant d'inhibition de la télomérase. En fait, la porphyrine cationique, TMPyP4, qui inhibe c-MYC et donc l'expression de hTERT, a été décrite comme un inhibiteur de la croissance des tumeurs in vivo [196]. D'autres inhibiteurs de la régulation transcriptionnelle de l'expression de hTERT par l'intermédiaire d'un complexant de c-MYC ont été aussi évalués. En fait, la formation d'un complexe entre c-MYC et l'une des protéines BRCA1 et N-MYC-interacting protein (NMI) inhibe l'induction

de l'activité du promoteur de hTERT par c-MYC dans le cancer du sein. De plus, les oncoprotéines HER2/Neu, RAS et RAF stimulent l'activité du promoteur de hTERT par l'intermédiaire des facteurs de transcription ETS (ER81) activés par ERK dans la voie des MAP-kinases. L'inhibition de la phosphorylation de ER81, ou la mutation de ses sites de liaison au niveau du promoteur de hTERT, est capable de rendre ce dernier insensible à l'activation de HER2/Neu. En exploitant ces connaissances, il a été montré que l'introduction d'un dominant négatif d'ER81 par un plasmide ou l'inhibition du récepteur de HER2/Neu dans les cellules du cancer du sein diminue significativement l'activité télomérasique [291].

Il existe une corrélation négative entre l'expression de certains gènes et l'hyperméthylation de leur promoteur. En fait, il a été constaté que cette méthylation est associée à une diminution de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs. Au contraire, une corrélation positive entre la méthylation d'îlots CpG au niveau du promoteur de hTERT, l'expression de l'ARNm de hTERT, et l'activité télomérasique a été observée dans de multiples lignées de cellules cancéreuses, puis confirmée au niveau des tissus. Un effet de l'agent déméthylant, la 5-azacytidine, sur l'activité télomérasique et l'expression de hTERT a été montré dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses incluant les cellules HeLa, des cellules de cancer colorectal, des cellules de neuroblastome et de cancer de la prostate. Cet agent induit une réduction de la croissance cellulaire. Cependant, la corrélation entre la déméthylation de hTERT et la répression de gène est opposée au dogme courant de la régulation de l'ADN par méthylation. En effet, d'autres études de l'effet de la 5-azacytidine sur des lignées de cellules de la prostate ont révélé que cet agent déméthylant réactive l'expression de p16 et réprime l'expression de c-MYC dans l'une des lignées. Donc, la 5-azacytidine a pu en fait inhiber l'activité télomérasique par une répression transcriptionnelle de hTERT, au cours de laquelle p16 et c-MYC ont pu jouer un rôle central [290].

Outre les agents déméthylants, la tricostatine A, un inhibiteur de l'histone désacétylase, est aussi capable d'inhiber l'expression de l'ARNm de hTERT dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses telles que la lignée leucémique humaine U937. Cependant, le manque de spécificité de ces modulateurs épigénétiques de l'activité télomérasique, rend cette observation controversée [292].

Plusieurs hormones jouent aussi un rôle dans la signalisation en amont de l'activation transcriptionnelle de hTERT, comme les œstrogènes et la progestérone. L'expression de ces hormones en fonction du type de tissu a permis une régulation correspondante de l'activité télomérasique. En fait, il a été suggéré que le tamoxifène, un agent anti-œstrogène, est capable de bloquer la transcription de hTERT et la croissance des cellules de cancer du sein exprimant le récepteur des œstrogènes, mais il stimule la transcription de hTERT dans les cellules du cancer de l'endomètre [290].

IV.5.2. Niveau post-transcriptionnel

L'épissage de l'ARNm de hTERT est un mécanisme de régulation de la télomérase. En fait, un produit particulier d'épissage, α , s'est révélé être un inhibiteur négatif dominant de l'activité télomérasique. En outre, la régulation de la croissance et de l'activité télomérasique dans les cellules de la peau implique une action double: une inhibition dépendante de c-MYC et un épissage alternatif de hTERT [293].

La télomérase est aussi associée à plusieurs protéines accessoires telles que TEP-1, p23, HSP90 et interagit avec des enzymes de modification comme la phosphatase A, la protéine kinase C, la kinase AKT et d'autres qui jouent des rôles importants dans l'assemblage et la fonction de l'holoenzyme ou la régulation des modifications post-traductionnelles. En particulier, le blocage de la protéine chaperonne HSP90 entraîne l'inhibition de l'assemblage des sous-unités de la télomérase [295].

Récemment, il a été montré que le 17- β -œstradiol induit une activité télomérasique dans les cellules de cancer ovarien humain par régulation post-transcriptionnelles. Celle-ci est régie par l'intermédiaire d'une phosphorylation de hTERT dépendante de AKT. En outre, en utilisant des inhibiteurs de PKC tels que le bis-indolylmaléimide I, une inhibition significative de l'activité télomérasique a été observée dans les cellules de cancer du nasopharynx [296].

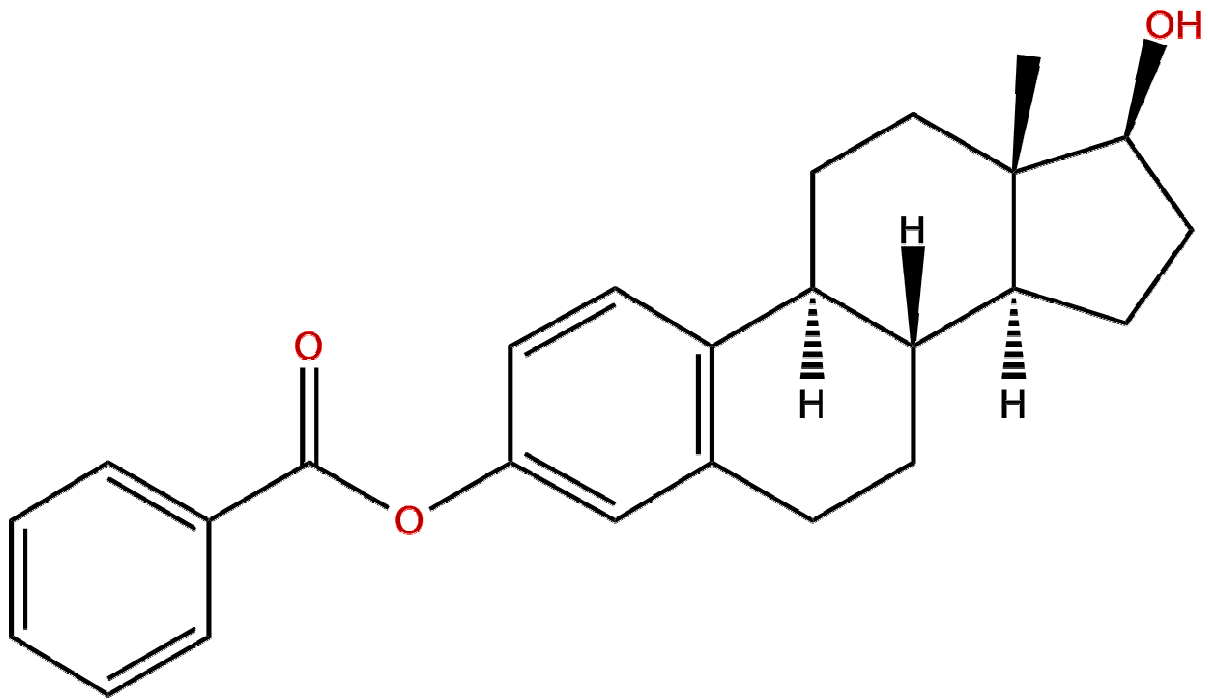


Figure 54: Structure du 17- β -œstradiol [294]

IV.6. Ciblage des télomères et des protéines associées

Le ciblage direct du phénomène qui, apparemment, conduit les cellules vers la sénescence, la longueur des télomères, a beaucoup enrichi le développement d'approches anticancéreuses. Il est admis que ce sont les télomères les plus courts qui causent la fusion des extrémités des chromosomes et l'apoptose dans les cellules télomérase-négatives. Cependant, les mécanismes et les acteurs moléculaires impliqués dans le dysfonctionnement des télomères lié à la 'crise cellulaire' que provoque leur raccourcissement restent encore indéterminés [297].

IV.6.1. Stabilisateurs des G-quadruplex

L'extrémité 3' simple brin du télomère contient plusieurs Guanines consécutives qui peuvent s'assembler pour former un repliement intramoléculaire comportant trois plateaux de guanines (G-quartets) stabilisés par des liaisons hydrogènes entre les N⁷ des guanines et un cation central, K⁺ ou Na⁺. Selon la nature de ce cation, le G-quadruplex adopte deux structures différentes : antiparallèle en présence de Na⁺, avec trois boucles terminales et parallèles en présence de K⁺, formant ainsi trois boucles diagonales externes [298].

Le principe d'action des ligands de G-quadruplex est probablement régi par leur intercalation au sein de ces structures, entraînant leur stabilisation et donc le blocage de la télomérase au cours de l'étape d'élongation. Plusieurs agents stabilisant le G-quartet sont actuellement en investigation. Ils appartiennent à différentes familles telles que celles d'éthidium, de dibenzophénanthrolines, de triazines, d'acridines, des dérivés de porphyrines, de pentaoxazoles, de pérylènes et des dérivés basés sur la fluorénone. Les composants basés sur la porphyrine, l'acridine et les anthraquinones sont jusqu'à présent les plus prometteurs [299].

Le criblage systématique des petites molécules de médicaments a permis d'identifier plusieurs composés avec une activité inhibitrice antitélomérase. Certains inhibent l'enzyme à des concentrations de l'ordre du nanomolaire. Parmi eux, BRACO-19 représente un des inhibiteurs de la télomérase les plus puissants (concentration inhibitrice à 50 % (IC₅₀) égale à 115 nM). Un avantage majeur de BRACO-19 est d'éviter la cytotoxicité non spécifique aiguë aux concentrations nécessaires pour empêcher complètement l'activité télomérasique dans les cellules humaines du cancer du sein, s'ajoutant à une réduction importante de la croissance cellulaire [298].

Des triazines tels que le 115405 et le 12459 sont deux autres composés stabilisant les G-quadruplex à une concentration de 41 et de 130 nM respectivement.

Récemment, de nouveaux ligands des G-quartets tels que les dérivés du 2,6-pyrimidine dicarboxamide ont montré des effets apoptiques massifs en utilisant de faibles concentrations dans les cellules de gliome. Cela est dû aux altérations du cycle cellulaire et à l'instabilité des télomères plutôt qu'à leur raccourcissement. L'instabilité des télomères englobe la fusion des terminaisons télomériques et les ponts d'anaphase (anaphase bridges). Ces molécules ont aussi des effets antiprolifératifs dans les lignées de cellules présentant un mécanisme ALT [299].

Un autre candidat inhibiteur est la télomestatine (SOT-095), qui est un produit naturel de *Streptomyces anulatus* 3533-SV4. Ce composé permet d'aboutir à une valeur d'EC₅₀ de 5 nM. Récemment, il a été montré que la télomestatine a un effet important sur la conformation des extensions riches en G. Il a été montré également que la télomestatine se lie fortement aux extensions télomériques in vitro et in vivo en causant une perte retardée de la viabilité des cellules. La télomestatine a été récemment testée sur un grand nombre de modèles in vitro

comme les cancers du poumon, où il est capable d'induire une inhibition de l'activité télomérasique, une réduction de la longueur des télomères et une mort cellulaire par apoptose. Il n'a pas été observé de changements importants dans l'expression des gènes impliqués dans le cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation de l'ADN, ou la recombinaison. Cela suggère que la télomestatine exerce des effets antiprolifératifs et proapoptiques spécifiquement par l'intermédiaire de la voie télomérique [298].

Malgré le fait que plusieurs de ces composés inhibent de 50 % l'activité télomérasique par des quantités de l'ordre du nanomolaire, leur spécificité et leur efficacité dans le ciblage des cellules cancéreuses ne sont pas encore décrites. Comme pour les autres agents inhibant la télomérase, un problème potentiel est associé à l'utilisation de ces ligands des G-quadruplex. Ces derniers peuvent interférer avec le fonctionnement des télomères dans les cellules télomérase-négatives. En effet, de nombreuses séquences d'acides nucléiques réparties au sein du génome des mammifères sont potentiellement capables d'adopter une structure en G-quadruplex, et différentes structures protéiques ont été décrites pour fixer les G-quadruplex in vitro [299].

Ces données font des G-quadruplex une famille structurale beaucoup plus large que celle initialement découverte au niveau du télomère et posent le problème de la sélectivité d'action des ligands de G-quadruplex et leur index thérapeutique dans le cadre d'une stratégie antitumorale [298].

IV.7. Ciblage des protéines associées aux télomères

Le ciblage des protéines liées aux télomères mène à la dérégulation de la maintenance des télomères. Il a été proposé que la perte de la cape d'un ou de quelques télomères puisse entraîner l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose dans les cellules de cancers humains. Karlseder et al ont déjà montré que l'introduction d'un dominant négatif de TRF2 dans des lignées de cellules cancéreuses résulte en un raccourcissement et en une apoptose rapide, dépendante de p53 et non de la longueur du télomère. Aussi, il a été proposé que TRF1 agisse comme un inhibiteur en cis de l'activité télomérasique. Selon ce modèle, TRF1 a pu être une cible potentielle pour le développement de traitements anticancéreux [300].

De plus, des études intéressantes de Seimiya ont récemment montré que la combinaison des inhibiteurs de la télomérase et de la tankyrase à des doses non toxiques peut être aussi une approche thérapeutique anticancéreuse efficace. Les progrès dans les stratégies ciblant les protéines associées aux télomères sont en cours et pourraient apporter des candidats anticancéreux intéressants [301].

IV.8. Inhibiteurs de la reverse transcriptase

Un autre groupe d'inhibiteurs est représenté par les inhibiteurs de la transcriptase réverse. Ces derniers peuvent être divisés en deux classes, les composés nucléosidiques et non nucléosidiques [302].

Le composé prototypique le plus étudié dans la classe nucléosidique est le 3'-azido-3'-désoxythymidine (AZT). Cet analogue bloque l'incorporation des dNTPs au niveau de l'ADN néosynthétisé par l'activité de transcription réverse. Un problème majeur associé à l'utilisation de l'AZT et ses dérivés est la valeur élevée de l' EC_{50} nécessaire à l'inhibition de la télomérase (0,10-1,75 mM). Un second problème est que la plupart des études ont échoué, soit à documenter le raccourcissement des télomères, soit à observer une sénescence [303].

La classe des inhibiteurs non nucléosidiques renferme des composés qui inhibent la télomérase en se liant au site actif de l'enzyme transcriptase réverse. Lors d'un criblage pharmacologique, ces petites molécules ont montré le potentiel d'inhiber l'activité télomérasique et causent le raccourcissement progressif des télomères comme le dérivé d'isothiazolone TMPI, le rhodacyanine FJ5002 et le BIBR1532 [304].

Une des molécules les plus prometteuses est le BIBR1532, qui est un inhibiteur non nucléosidique qui n'affecte pas des ADN ou des ARN polymérases autres que la télomérase. Le BIBR1532 constitue donc un agent très spécifique et un inhibiteur non compétitif de la télomérase. Cela pourrait être dû au fait que son site de liaison est différent de ceux des amorces et des nucléotides. Ainsi, il interfère avec la mise en place de la télomérase. De nouveaux résultats suggèrent que des doses élevées de BIBR1532 conduisent à une cytotoxicité sélective dans les cellules leucémiques, avec une érosion télomérique indépendante de la télomérase, une perte de TRF2 et une augmentation de la phosphorylation de p53. Cet effet n'a pas été observé au niveau de cellules souches CD34+ et de fibroblastes

normaux avec de longs télomères qui ont été résistants au traitement. Cette cytotoxicité télomérique sélective et rapide pourrait être une approche utilisable dans le développement de médicaments anticancéreux [303].

IV.9. Immunothérapie: vaccins ciblant la télomérase

Les épitopes spécifiques de la hTERT sont exprimés dans les cellules cancéreuses, mais non dans les cellules normales. La télomérase (hTERT) est donc considérée comme un antigène tumoral universel du fait de son expression dans la plupart des cancers ; elle peut être traitée au niveau du protéasome puis présentée à la surface des cellules cancéreuses pour être reconnue comme antigène par les lymphocytes T cytotoxiques. Des essais cliniques de phase I ont montré que plusieurs patients présentant des carcinomes avancés du sein et de la prostate ont induit des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de la hTERT à la suite de vaccination pour mobiliser les cellules dendritiques stimulées par le peptide de la hTERT ou l'ARN de la télomérase. Cette approche n'a pas montré d'effets toxiques significatifs [305].

Ces données offrent une base rationnelle scientifique pour continuer les investigations cliniques des stratégies d'immunothérapie ciblant la télomérase. Il paraît clair que l'immunothérapie antitélomérase peut induire des réponses cliniques mineures sans effets secondaires majeurs. Actuellement, plusieurs groupes américains ont commencé des essais cliniques de phase I, comme le NCI (National Cancer Institute) qui a commencé deux essais étudiant l'efficacité de la vaccination par hTERT de patients présentant des cancers avancés du sein, des sarcomes ou des gliomes. La preuve de la présence de bénéfices cliniques de l'immunothérapie anti-hTERT pourrait donc être établie dans un futur proche [305].

IV.10. Thérapie génique

Tous les gènes ont des promoteurs dont le rôle est de contrôler le taux d'expression. Différents promoteurs spécifiques de la tumeur ou du tissu, tels que le promoteur de l'alphafœtoprotéine dans les cellules du cancer du foie, le promoteur de l'antigène spécifique de la prostate dans le cancer de la prostate et le promoteur de hTERT, ont été étudiés avec succès. Cependant, l'approche est limitée à des types spécifiques de tumeurs qui expriment des antigènes

spécifiques. hTERT pourrait être une excellente candidate vu que son expression est présente dans environ 85 % des cancers humains [306].

Trois stratégies différentes de thérapie génique antitumorale ont été développées, sous le contrôle des promoteurs spécifiques des tumeurs-tissus:

- induire l'expression des gènes proapoptiques.
- contrôler l'assemblage des virus oncogéniques.
- activer les prosubstances dans les cellules tumorales.

Plusieurs études ont utilisé le promoteur de hTERT pour contrôler l'expression et le fonctionnement des gènes proapoptiques in vitro. Les plus significatifs sont BAX, les caspases 6-8, FADD (FAS-associated protein with death domain), et TRAIL. En fait, le contrôle de l'expression de ces gènes par le promoteur de hTERT induit sélectivement l'apoptose des cellules tumorales télomérase-positives [307].

L'utilisation du promoteur de hTERT ou l'ARN de la télomérase permettant l'expression des oncogènes des adénovirus et/ou des gènes de suicide, est une autre approche qui limite l'expression à la tumeur. En effet, un vecteur adénoviral dans lequel le promoteur de hTERT permet l'expression des gènes adénoviraux E1A et E1B cause la mort des cellules cancéreuses et entraîne l'inhibition significative de la croissance des cellules tumorales humaines de poumon, du foie et de la prostate. Cependant, la difficulté majeure est de permettre la réplication exclusivement dans les cellules tumorales. Des approches différentes décrivant une réplication virale spécifique de la tumeur ont été décrites:

- introduction de délétions dans les régions fonctionnelles des gènes qui sont essentielles pour la réplication efficace dans les cellules normales, mais utilisables par les cellules tumorales.
- introduction des promoteurs spécifiques de tumeur-tissu dans les virus pour limiter l'expression des gènes de réplication dans les cellules tumorales.

- changement d'aspect de l'enveloppe virale pour amplifier l'insert exclusivement dans les cellules tumorales [308].

Il a été montré que le promoteur de hTERT pourrait être utilisé pour réguler l'expression des gènes nécessaires à la réplication virale. Par conséquent, cette réplication a lieu seulement dans les cellules cancéreuses télomérase-positives [307].

D'autres études ont développé des gènes-suicides capables d'activer des prosubstances en substances cytotoxiques dans les cellules malignes. La prosubstance induit une mort sélective des cellules cancéreuses en présence des gènes-suicides tels que:

- la cytosine désaminase bactérienne avec la prosubstance 5-fluorocytosine.
- la thymidine kinase et le traitement par gancyclovir.
- la nitroréductase bactérienne associée avec l'agent de proalkylation CB1954.

L'approche utilisant le promoteur de hTERT responsable de l'expression des gènes de suicide ou des adénovirus oncogènes montre des capacités promettantes. En fait, elle permet de tuer efficacement et sélectivement une large variété de cellules cancéreuses, mais épargne les cellules normales télomérase-négatives [310].

IV.11. Autres approches d'inhibition de la télomérase

L'abrogation de Cdc42/RAC1 entraîne la diminution de l'activité télomérasique, ce qui montre que les composants de signalisation peuvent servir comme cibles de la thérapie antitélomérase. La perturbation de l'assemblage de l'holoenzyme de la télomérase avec des oligonucléotides qui perturbent la région P3/P1 ou le domaine CR4-CR5 de la hTR empêche l'assemblage adéquat de la télomérase conduisant à l'inhibition de l'activité télomérasique, mais leurs effets sur la croissance ou l'apoptose de cellules n'ont pas été rapportés [74]. Plus récemment, les flavonoïdes catécholiques et les produits naturels, tels que les rubromycines, l'alterpérylnol, l'acide diazaphénolique, et l'apigénine ont été testés sur la télomérase. Ces stratégies émergentes pourraient s'avérer utiles si l'inhibition de la télomérase par

l'intermédiaire de ces approches peut induire le raccourcissement progressif des télomères et la mort des cellules télomérase-positives [311].

Un grand nombre de composés d'origines variées présente des effets inhibiteurs de la télomérase et d'autres processus cellulaires. Ils incluent des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que l'aspirine et les antioxydants comme la vitamine E. D'autres molécules ont montré une capacité d'inhiber la hTERT. Parmi elles, la 1,25-dihydroxyvitamine D3 a été testée. En fait, cette dernière est capable d'induire une apoptose dans les cellules cancéreuses ovariennes sans raccourcissement des télomères. Cette apoptose serait due à une diminution significative de la stabilité de l'ARNm de hTERT plus qu'à une répression transcriptionnelle due à l'élément de réponse de la vitamine D3 présent au niveau de la région 5' du gène de hTERT [312].

Les stratégies courantes de thérapie anticancéreuse chez les patients présentant un cancer à un stade avancé incluent généralement une résection de la tumeur, suivie d'une chimiothérapie et/ou une radiothérapie. Étant donné que l'activité télomérasique est détectée dans la plupart des tumeurs aux stades avancés, l'utilisation des inhibiteurs de la télomérase peut offrir un adjuvant efficace à la thérapie du cancer [311].

Les cellules somatiques normales qui n'expriment pas la télomérase ne doivent pas être affectées par la thérapie antitélomérase. Les thérapies antitélomérase sont utilisées en conjonction avec la réduction chirurgicale de la tumeur et peuvent être suivies par des chimiothérapies conventionnelles et/ou par une irradiation. L'efficacité de cette combinaison a été déjà montrée. En effet, les inhibiteurs de la télomérase présentent une fonction de sensibilisation, rendant les cellules cancéreuses moins résistantes à d'autres agents chimiothérapeutiques standards. Ainsi, dans la mesure où d'autres mécanismes comme l'ALT peuvent être révélés, les associations thérapeutiques apparaissent justifiées. Les inhibiteurs de la télomérase peuvent être plus efficaces dans la réduction du risque d'autorenouvellement de nombreuses cellules cancéreuses télomérase-positives. Donc, par ce ciblage spécifique de la télomérase, il peut être possible de restaurer le raccourcissement systématique des télomères jusqu'à la longueur critique qui peut engendrer la sénescence cellulaire et l'apoptose. Étant donné que la plupart des cellules somatiques normales n'expriment pas la télomérase, ce type

d'agents peut aussi posséder une grande spécificité, faible toxicité et réduction des autres effets indésirables [313].

Il a été suggéré que les thérapies antitélomérase peuvent avoir des effets destructeurs dans les cellules normales qui expriment la télomérase, y compris les cellules souches, les cellules germinales et les lymphocytes activés, mais l'activité d'autorenouvellement indéfini des cellules souches et l'expression transitoire de la télomérase dans les lymphocytes suggèrent que de telles thérapies devraient avoir des effets limités dans ces cellules. Ainsi, du fait que les cellules du système immunitaire ne sont pas facilement infectées par l'adénovirus, le recours à l'utilisation du promoteur de la hTERT peut être une solution, car il permet l'expression de l'adénovirus avec des effets secondaires destructeurs minimes sur le système immunitaire [312].

Les cellules cancéreuses montrent des télomères typiquement plus courts que ceux des cellules souches des lymphocytes naïfs, les rendant plus susceptibles aux effets de leur raccourcissement. À la suite de ce raccourcissement et de l'arrêt de prolifération et/ou de la mort des cellules cancéreuses, la thérapie antitélomérase doit être interrompue, et l'activité télomérasique dans les cellules reproductives et les cellules souches sera rétablie. Donc, la thérapie antitélomérase semble pouvoir éliminer le potentiel prolifératif des cellules cancéreuses avant le raccourcissement critique de la longueur des télomères dans les cellules normales reproductives et souches, raccourcissement qui inhiberait leurs fonctions [314].

Comme la télomérase est impliquée dans la stabilité du génome par des liaisons physiques permettant la protection des télomères, son ciblage pourrait être utilisé dans un large spectre de cancers humains pour la prévention et la guérison du cancer à un stade précoce.

L'objectif est de rendre les cellules cancéreuses mortelles et de préserver les cellules normales le plus longtemps possible. L'inhibition de la télomérase dans les cellules cancéreuses peut être une cible importante des agents thérapeutiques anticancéreux, alors que l'expression de la télomérase dans les cellules normales peut avoir une utilité dans la reconstitution de cellules ou tissus [315].

Malgré le fait que plusieurs travaux de recherche développés dans le domaine des thérapies anticancéreuses ont montré l'importance des deux cibles télomères et télomérase, il est encore

incertain de savoir laquelle est la meilleure. En fait, en dépit d'une bibliographie abondante sur les inhibiteurs de la télomérase et les ligands des G-quadruplex, les effets des deux types de molécules n'ont pas été comparés dans le même système (culture cellulaire ou in vivo).

Boukamp et Mirancea ont conclu que les télomères pourraient être les meilleures cibles pour la thérapie du cancer. Burger a défini trois stratégies innovantes prometteuses pour la prévention de la tumorigenèse dont l'une vise à cibler le complexe télomères-télomérase. D'autres auteurs ont montré que le recours à une polythérapie anticancéreuse était plus efficace lors de l'utilisation des inhibiteurs de la télomérase en position d'adjuvant. Les relations entre les télomères et la tumorigenèse sont multiples et complexes. Les résultats récents montrent que les approches basées sur l'induction d'une sénescence dépendante des télomères exercent des effets anticancéreux puissants [316].

Actuellement, aucun ligand du télomère ou inhibiteur de la télomérase n'est disponible en routine. Indépendamment des résultats des essais en cours, les extrémités des chromosomes représentent un champ fascinant de recherche pour les biologistes et les oncologues [315].

Conclusion

Parmi toutes les hypothèses nouvelles et rationnelles qui paraissaient innovantes et susceptibles d'offrir des traitements applicables à court terme, seule une poignée a conduit au développement de médicaments ayant eu un impact thérapeutique significatif.

Cependant, de nouvelles stratégies alternatives telles les thérapies ciblées émergent désormais, permettant une meilleure prise en charge des cancers en mettant à disposition de l'oncologue un arsenal thérapeutique plus conséquent.

De façon générale, les progrès attendus visent à définir de nouvelles cibles et à mieux comprendre les mécanismes d'apparition de la résistance aux traitements. Ils visent également à être capables de définir, pour un patient donné, un traitement adapté en fonction de certains critères biologiques des tumeurs et l'utilisation de composés capables de neutraliser les processus biologiques et biochimiques qui participent à la progression tumorale, tout en limitant au maximum la toxicité sur les tissus sains. Ces nouvelles approches tendent à devenir de plus en plus spécifiques, les cibles visées par ces thérapies sont :

- La membrane des cellules ex: les récepteurs des facteurs de croissance
- Le milieu intracellulaire ex: la machinerie complexe de signalisation intracellulaire ou le cytosquelette
- Le noyau cellulaire (ADN)
- L'environnement tumoral ex: le système immunitaire ou le système vasculaire alimentant les tumeurs.

Ces dernières études accréditent l'idée que les thérapies ciblées parmi plusieurs stratégies anticancéreuses à l'étude (thérapie génique, sénescence, virus oncolytiques, etc...) vont prendre une place de plus en plus conséquente aux côtés, voire en remplacement, des traitements de référence.

Résumé



Résumé:

Titre: Les Anticancéreux: nouvelles approches thérapeutiques.

Auteur: Benazzouz Abdelhamid.

Mots Clés: anticancéreux, thérapies ciblées, virus oncolytique, sénescence, molécules pro-apoptotiques.

Une meilleure compréhension des mécanismes de l'oncogenèse a permis l'émergence de nouvelles stratégies thérapeutiques ces dernières années. De nombreuses molécules dont certaines actuellement encore en cours de développement font figure de propositions thérapeutiques innovantes et porteuses d'espoirs, c'est notamment le cas de :

- La thérapie génique: puisque la conversion génétique même d'un simple gène peut inverser la tumorigénicité d'un cancer et ce malgré sa composante polygénique ou bien induire l'apoptose de certaines cellules cancéreuses.
- Des thérapies ciblées: nous nous sommes intéressés à celles ciblant les récepteurs des facteurs de croissance de type insuline (IGF) et les cyclines soit par inhibition de la prolifération induite par IGFI ou IGFI, soit par arrêt du cycle cellulaire et stimulation de l'apoptose de diverses lignées cancéreuses.
- Des thérapies ciblant le CTLA-4 et les Toll-like récepteurs: par modulation immunitaire des signaux de costimulation en immunothérapie menant à une induction de réponses immunitaires efficaces.
- De la thérapie par sénescence par le biais de molécules pro-apoptotiques visant à palier au potentiel prolifératif illimité des cellules cancéreuses en induisant leur apoptose.

Notre travail a pour but de mettre en évidence l'intérêt de ces nouvelles thérapies ainsi que leur mécanisme, qui nous l'espérons, seront en mesure d'enrichir l'arsenal thérapeutique de l'oncologue dans un futur très proche.

Abstract:

Title: Anticancer drugs: New Therapeutic Approaches

Keywords: anticancer drugs, gene therapy, target-directed Drug, senescence therapy, pro-apoptotic molecule

Author: Benazzouz Abdelhamid

Lately thanks to a better understanding of oncogenesis mechanism the making of new therapy became possible. Numerous molecules make a hopeful therapeutic proposal, some of them still under development; it's the case of:

-Gene therapy: the inversion of one gene can desactivate the tumorigenicity of a cancer despite of his multigenetic component, or even leads to apoptosis.

- Target-directed Drug: we focus on drug's targeting the insulin growth factor (IGF) and the cyclins who act by inhibiting cell's proliferation managed by IGFI or IGFII, or stopping the cellular cycle and stimulating the apoptosis of numerous cancer cell lineage.

-Target-directed Drug against the CTLA-4 and the TOLL like receptors: by immune modulation of the co-stimulation signal's in immunotherapy leading to an effective immune response.

-Senescence therapy: by way of pro-apoptotic molecule countering unlimited proliferation of cancer cell

The purpose of our work is to display these new therapeutic purposes and mechanisms that we hope will be able to enrich the oncologist armamentarium in a very near future.

ملخص

العنوان: مضادات السرطان: مقاربات علاجية جديدة

الكلمات الأساسية: مضادات السرطان، علاجات موجهة، فيروس محلل للورم، شيخوخة، الجزيئات المبرمجة لموت الخلايا.

الكاتب: عبد الحميد بنعزوز

الفهم الجيد لآليات تكون السرطان، مكن من تبني استراتيجيات علاجية جديدة لمرض السرطان في السنوات الأخيرة، حيث أن العديد من الأدوية والتي البعض منها في طريق الدراسة تشكل اقتراحات علاجية جد واعدة و خصوصا:

-العلاج الجيني: بما أن التحول الجيني و لو لمورثة بسيطة، يمكن أن يعكس تشكل الورم الجيني للسرطان، و بالرغم من مكوناته المتعددة الجينات أو الحث على موت الخلايا المبرمج.

-العلاج الموجه: نهتم خصوصا بالعلاجات الموجهة لمستقبلات عوامل النمو للأنسولين (عامل نمو الأنسولين) و الحلقيات، وذلك إما بكبح التكاثر الناتج عن عامل نمو الأنسولين واحداً واثنين، أو بوقف الدورة الخلوية، و تنشيط الموت المبرمج للخلايا لعدة أنواع من الخلايا.

-علاجات تستهدف CTLA-4 و TOLL-LIKE: و ذلك بالتعديل المناعي لإشارات الإهاجة المتزامنة في العلاج المناعي التي تمكن من إستجابات مناعية فعالة.

-العلاج بالشيخوخة عن طريق الأدوية التي تحث على الموت المبرمج للخلايا السرطانية، من أجل كبح جهد التكاثر غير المحدود للخلايا السرطانية عن طريق موتها المبرمج.

-الهدف من هذه الأطروحة هو إيضاح آليات العلاجات الجديدة لمرض السرطان، والتي نتمنى أن تغني و تفيد أخصائي مرض السرطان من أجل علاجه.



BIBLIOGRAPHIE

- [1].**Lowenser SW, Cissero E, Ewan G.** Intrinsic tumour mechanism. 2009 Nov 18; 4(715): 307-15.
- [2].**Ziller TJ, Lowe CW. Tumorigenicity functions.** Cold Spring Harbor new perspectives in biology. 2011 Dec; 1(5):a1883.
- [3].**Hans KH, John C.** Blinded by the Light: The Growing Complexity of cancer Cell. 2012; 137(3): 43-31.
- [4].**Harms J, bernard X.** The functional domains in cancer epigenetics, Cell death and differentiation. 2009 Jun; 13(6):890-7.
- [5].**Cryns V, Bergeron, Zhu H, Li H, and Yuan J.** (1996). Specific cleavage of alpha-fodrin during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by an interleukin-1beta-converting enzyme/Ced-3 protease distinct from the poly (ADP-ribose) polymerase protease. J Biol Chem 271, 31277-82.
- [6].**Cryns V, Byun Y, Rana A, Mellor H, Lustig K, Ghanem L, Parker P, Kirschner M. and Yuan J.** (1997). Specific proteolysis of the kinase protein kinase C-related kinase 2 by caspase-3 during apoptosis. Identification by a novel, small pool expression cloning strategy. J Biol Chem 272, 29449-53.
- [7].**De Laurenzi, V and Melino, G.** (2000). The little devil of death. Nature 406, 135-36
Delon, J., Gregoire, C., Malissen, B., Darche, S., Lemaitre, F., Kourilsky, P., Abastado, J. P., and Trautmann, A. (1998). CD8 expression allows T cell signaling by monomeric peptide-MHC complexes. Immunity 9, 467-73.
- [8].**Demand, J., Luders, J., and Hohfeld, J.** (1998). The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. Mol Cell Biol 18, 2023-8.
- [9].**Denny, M. F., Patai, B., and Straus, D. B.** (2000). Differential T-cell antigen receptor signaling mediated by the Src family kinases Lck and Fyn. Mol Cell Biol 20, 1426-35.
- [10].**Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S., and Reed, J. C.** (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. Embo J 17, 2215-23.
- [11].**Brognard J, Clark A.S, Dennis P.A.** (2001). Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. Cancer Research, 61, 3986-3997. Brooks, K.R., To, K., Moore Joshi, M.B., Conlon, D.H., Herndon li, J.E., D'Amico, T.A.,
- [12].**Harpole Jr, D.H., Smythe, W.R. & Daniel, T.M.** (2003). Measurement of chemoresistance markers in patients with stage III non-small cell lung cancer: A novel approach for patient selection. Annals of Thoracic Surgery, 76, 187-193.

- [13].**Brown, J.M. & Attardi, L.D.** (2005).The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nature Reviews Cancer*, 5, 231-237.
- [14].**Cavasotto, C.N., Ortiz, M.A., Abagyan, R.A. & Piedrafita, F.J.** (2006). In silico identification of novel EGFR inhibitors with antiproliferative activity against cancer cells.
- [15].**Chang, S.C., Tucker, T., Thorogood, N.P. & Brown, C.J.** (2006).Mechanisms of Xchromosome inactivation. *Frontiers in Bioscience*, 11, 852-866
- [16].**Delaval, K. & Feil, R.** (2004).Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Current Opinion in Genetics and Development*, 14, 188-195.
- [17].**Fesik, S.W.** (2005). Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nature Reviews Cancer*, 5, 876-885.
- [18].**Field, R.W.** (2001). A review of residential radon case-control epidemiologic studies performed in the United States. *Review of Environmental Health*, 16, 151-167.
- [19].**Furuno, M., Pang, K.C., Ninomiya, N., Fukuda, S., Frith, M.C., Bult, C., Kai, C., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Mattick, J.S. & Suzuki, H.** (2006). Clusters of internally primed transcripts reveal novel long noncoding RNAs. *PLoS Genetics*, 2,537-553.
- [20].**Ghobrial, I.M., Witzig, T.E. & Adjei, A.A.** (2005). Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *Ca-A Cancer Journal for Clinicians*, 55, 178-194.
- [21].**Giaccone, G., Herbst, R.S., Manegold, C., Scagliotti, G., Rosell, R., Miller, V., Natale, R.B., Schiller, J.H., Von Pawel, J., Pluzanska, A., Gatzemeier, U., Grous, J.Ochs, J.S., Averbuch, S.D., Wolf, M.K., Rennie, P., Fandi, A. & Johnson, D.H.**(2004). Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced nonsmall-cell lung cancer: A phase III trial - INTACT 1. *Journal of Clinical Oncology*, 22, 777-784.
- [22].**Mayer, A.M. & Hamann, M.T.** (2004).compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antitumorial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular,immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Mar Biotechnol (NY)*, 6, 37-52.
- [23].**Khuder, S.A. & Mutgi, A.B.** (2001).Effect of smoking cessation on major histologic types of lung cancer. *Chest*, 120, 1577-1583.*Toxicology and Pharmacology*, 22, 97-103. Mori, S., Ito, G., Usami, N., Shimokata, K., Sekido, Y., Yoshioka, H., Ueda, Y., Kodama,
- [24].**Y., Takahashi, M. & Fong, K.M.** (2004).p53 Apoptotic Pathway Molecules Are Frequently and Simultaneously Altered in Nonsmall Cell Lung Carcinoma. *Cancer*, 100, 1673-1682

- [25].**Kiokias, S. & Gordon, M.H.** (2004). Antioxidant properties of carotenoids in vitro and in vivo. *Food Reviews International*, 20, 99-121.
- [26].**Konishi, I., Hosokawa, M., Sashima, T., Kobayashi, H. & Miyashita, K.** (2011). Halocynthiaxanthin and fucoxanthinol isolated from *Halocynthia roretzi* induce apoptosis in human leukemia, breast and colon cancer cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 142, 53-59.
- [27].**Kotake-Nara, E., Asai, A. & Nagao, A.** (2009). Neoxanthin and fucoxanthin induce apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. *Cancer Letters*, 220, 75-84.
- [28].**Nara, E., Kushi, M., Zhang, H., Sugara, T., Miyashita, K. & Nagao, A.**(2011).proliferation of cancer cells. *Journal of Science*, 31, 303-306.
- [29].**Kotake, E., gawara, T. & Nagao, A.** (2012).Antiproliferative effect of xanthin on cancer cells. *Skynet Science*, 71, 459-461.
- [30].**Krinsky, N.I. & Johnson, E.J.** (2008).Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 459-516.
- [31].**Krozely, P.** (2009). Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: evolving role in the treatment of solid tumors. *Clinical journal of oncology nursing*, 8, 163-168.
- [32].**Leslie, W.T. & Bonomi, P.D.** (2009).Novel treatments in non-small cell lung cancer. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 18, 245-267.
- [33].**Maslyar, D.J., Jahan, T.M. & Jablons, D.M.** (2004).Mechanisms of and potential treatment strategies for metastatic disease in non-small cell lung cancer. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 16, 40-50.
- [34].**Mattick, J.S. & Makunin, I.V.** (2005).Small regulatory RNAs in mammals.*Human Molecular Genetics*, 14.
- [35].**Mayer, A.M.S. & Gustafson, K.R.** (2004). Marine pharmacology in 2001-2: antitumour and cytotoxic compounds. *European Journal of Cancer*, 40, 2676-2704.
- [36].**McCann, B.** (2005).Reviewing radon risk. *Water* 21, 12-13.
- [37].**Koehn, F.E. & Carter, G.T.** (2005).The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 206-220.
- [38].**Moreau, D., Tomasoni, C., Jacquot, C., Kaas, R., Le Guedes, R., Cadoret, J.-P., MullerFeuga, A., Kontiza, I., Vagias, C., Roussis, V. & Roussakis, C.** (2006).Cultivated microalgae and the carotenoid fucoxanthin from *Odontella aurita* as potent antiproliferative agents in bronchopulmonary and epithelial cell lines. *Environmental*

- [39].**Maslyar, D.J., Jahan, T.M. & Jablons, D.M.** (2004).Mechanisms of and potential treatment strategies for metastatic disease in non-small cell lung cancer. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 16, 40-50.
- [40].**Gilman A** (1963) The initial clinical trial of nitrogen mustard. *Am J Surg* 105: 574-78
- [41].**TK Weber, CL Waxman** (2011) Differential activationof phosphamide by cytochromes inhuman microsomes. *Cancer Res* 133: 29-37
- [42].**Brade WP, Herdrich K, Varini M** (2006) Ifosfamide-pharmacology, safetyand therapeutic potential. *Cancer Treat Rev* 12: 1-47
- [43].**Wagner T, Heydrich D, Jork T et al.** (2011) Comparative study on human pharmacokinetics of activated ifosfamide and cyclophosphamide by a modified fluorometric test. *J Cancer Res Clin Oncol* 100: 95-104
- [44].**Erickson LC, Bradley MO, Ducore JM et al.** (2010) DNA crosslinking and cytotoxicity in normal and transformed human cells treated with antitumor nitrosoureas. *Proc Natl Acad Sci* 77: 467-71
- [45].**Lokiec F, Beerblock K, Deloffre P et al.** (2009) Étude de pharmacocinétique clinique de la fotémustine dans différents indications tumorales. *BullCancer* 76: 1063-69
- [46].**Pendyala L, Creaven PJ** (1993) In vitro cytotoxicity, protein binding, red blood cell partitioning, and biotransformation of oxaliplatin. *Cancer Res*: 5970-6
- [47].**Fichtinger-Schepman AM, van der Veer JL, den Hartog JH et al.** (1985) Adducts of the antitumor drug cis-diammine dichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry* 24: 707-13
- [48].**Eastman A** (1986) Reevaluation of interaction of cis-dichloro(ethylenediamine)platinum II with DNA. *Biochemistry* 25: 3912-15
- [49].**Minn AJ, Rudin CM, Boise LH et al.** (1995) Expression of bcl-xL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood* 86: 1903-10
- [50].**Miyashita T, Reed JC** (1993) Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 81: 151-7
- [51].**Zhou BS, Bastow KF, Cheng YC** (1989) Characterization of the 3' region of the human DNA topoisomerase I gene. *Cancer Res* 49: 3922-27
- [52].**Cui Y, Konig J, Buchholz JK et al.** (1999) Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol* 55: 929-37

- [53].**Ishikawa T, Ali-Osman F** (2010) Glutathione-associated cis-diammine dichloroplatinum (II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *J Biol Chem* 268: 20116-25
- [54].**Nishimura T, Newkirk K, Sessions RB et al.** (2006) Immunohistochemical staining for glutathione S-transferase predicts response to platinum-based chemotherapy in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2: 1859-65
- [55].**Surowiak P, Materna V, Kaplenko I et al.** (2005) Augmented expression of metallothionein and glutathione S-transferase pi as unfavourable prognostic factors in cisplatin-treated ovarian cancer patients. *Virchows Arch* 447:626-33
- [56].**Dabholkar M, Thornton K, Vionnet J et al.** (2000) Increased mRNA levels of xeroderma pigmentosum complementation group B (XPB) and Cockayne's syndrome complementation group B (CSB) without increased mRNA levels of multidrug-resistance gene (MDR1) or metallothionein-II (MT-II) in platinum-resistant human ovarian cancer tissues. *Biochem Pharmacol* 60: 1611-9
- [57].**Dabholkar M, Vionnet J, Bostick-Bruton F et al.** (1994) Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *J Clin Invest* 94: 703-8
- [58].**Lieberthal W, Triaca V, Levine J** (1996) Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol* 270: F700-F708
- [59].**Rybak LP, Whitworth CA, Mukherjee D et al.** (2007) Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. *Hear Res* 226: 157-67
- [60].**Malonne H, Atassi G** (1997) DNA topoisomerase targeting drugs: mechanisms of action and perspectives. *Anti-Cancer Drugs* 8: 811-22
- [61].**Kehrer DFS, Soepenberg O, Loos WJ et al.** (2001) Modulation of camptothecin analogs in the treatment of cancer a review. *Anti-Cancer Drugs* 12:89-105
- [62].**Buick RN, Messner HA, Till JE, McCulloch EA** (1979) Cytotoxicity of adriamycin and daunorubicin for normal and leukemia progenitor cells of man. *J Natl Cancer Inst* 62: 249-55
- [63].**Bhuyan BK, Blowers CL, Crampton SL, Shugars KD** (1981) Cell kill kinetics of several nogalamycin analogs and adriamycin for chinese hamster ovary, L1210 leukemia, and melanoma cells in culture. *Cancer Res* 41: 18-24
- [64].**Ritch PS, Occhipinti SJ, Skramstad KS, Shackney SE** (1982) Increased relative effectiveness of doxorubicin against slowly proliferating sarcoma 180 cells after prolonged drug exposure. *Cancer Treat Rep* 66: 1159-68

- [65].**Mhatre R, Herman E, Huidobro A, Waravdekar V** (2011) relationship between metabolism and toxicity of daunomycin *Pharmacol Exp Ther* 28: 16-22
- [66].**Jaenke RS, Deprez-de-Campeneere D, Trouet A** (1980) Cardiotoxicity and comparative pharmacokinetics of six anthracyclines in the rabbit. *Cancer Res* 40: 3530-6
- [67].**Doroshov JH** (1983) Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res* 43: 460-72
- [68].**Herman EH, Rahman A, Ferrans VJ et al.** (1983) Prevention of chronic doxorubicin cardiotoxicity in beagles by liposomal encapsulation. *Cancer Res* 43: 5427-32
- [69].**Caponigro F, Comella P, Budillon A et al.** (2000) Phase I study of Caelyx (doxorubicin HCL, pegylated liposomal) in recurrent or metastatic head and neck cancer. *Ann Oncol* 11: 339-42
- [70].**Gill PS, Wernz J, Scadden DT et al.** (1996) Randomized phase III trial of liposomal daunorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J Clin Oncol* 14: 2353-64
- [71].**Ogden R, Matthew S et al.** (2011) Characterization, toxicity and therapeutic efficacy of chimios. *S Oncol* 56: 231-78
- [72].**Giaccone G, Linn SC, Welinket al.** (1997) A dose-finding and pharmacokinetic study of reversal resistance with SDZ PSC 833 in combination with doxorubicin in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 3: 2005-15
- [73].**Bissett D, Kerr DJ, Cassidy J et al.** (1991) Phase I and pharmacokinetic study of D-verapamil and doxorubicin. *Br J Cancer* 64: 1168-71
- [74].**Ozols RF, Cunnion RE, Klecker RW et al.** (1987) Verapamil and adriamycin in the treatment of drug-resistant ovarian cancer patients. *J Clin Oncol* 5:641-7
- [75].**Farber LK, Mercier ZF et al.** (2009) remission in acute leukemia in children *Engl J Med* 38: 23-44
- [76].**Bleyer WA** (1978) The clinical pharmacology of methotrexate. *Cancer* 41:36-51
- [77].**Jolivet J, Cowan KH, Curt GA et al.** (1983)The pharmacology and clinical use of methotrexate. *Cancer* 309: 1094-104
- [78].**Schornagel LH, McVie JG** (1983)The clinical pharmacology of methotrexate.*Cancer Treat Rev* 10: 53-75
- [79].**Lansiaux A, Lokiec F** (2007) Pemetrexed: de la préclinique à la clinique. *BullCancer* 94: 34-8

- [80].**Goldman ID, Zhao R** (2002) Molecular, Biochemical, and cellular pharmacology of pemetrexed. *Semin Oncol* 29, suppl 18: 3-17
- [81].**Duschinsky R, Plevin E, Heidelberg C** (1957)The synthesis of 5-fluoropyrimidines.*J Am Chem Soc* 79: 4559-60
- [82].**Santini J, Milano G, Thyss A et al.** (1989) 5-FU therapeutic monitoring with dose adjustment leads to an improved therapeutic index in head and neck cancer patients. *Br J Cancer* 59: 287-90
- [83].**Etienne, MC, Cheradame S, Fischel et al.** (1995) Response to fluorouraciltherapy in cancer patients: The role of tumoral dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *J Clin Oncol* 13: 1663-70
- [84].**Magne N, Etienne-Grimadi MC, Cals L et al.** (2007) Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and the IVS14+1G>A mutation in patients developing 5FU-related toxicity. *Brit J Clin Pharmacol* 64: 237-40
- [85].**Levêque D, Wihlm J, Jehl F** (1996) Pharmacologie des Catharantus alcaloïdes.*Bull Cancer* 83: 176-86
- [86].**Lokiec F** (1995) La pharmacocinétique des taxanes. *Sem Hop Paris* 71: 687-91
- [87].**Vaishampayan U, Parchment RE, Jasti BR, Hussain M** (1999) Taxanes: An overview of the pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Urology* 54: 22-9
- [88].**Lavelle F** (2002) Nouveaux taxanes et dérivés d'épothilone en cours d'études cliniques. *Bull Cancer* 89: 343-50
- [89].**Chen CSJ, Siegel DM** (2007) Dermatofibrosarcoma protuberans: treatment & medication. @Medecine – update
- [90].**Taylor HB, Helwig EB** (1965) Dermatofibrosarcoma protuberans: a study of 115 cases. *Cancer* 15: 717-25
- [91].**Magne N, Etienne-Grimadi MC, Cals L et al.** (2007) Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and the IVS14+1G>A mutation in patients developing 5FU-related toxicity. *Brit J Clin Pharmacol* 64: 237-40
- [92].**Osterlind A.** Epidemiology on malignant melanoma in Europe. *Acta Oncol* 1992;31:903–8.
- [93].**Balch CM, Soong SJ, Shan HM.**A comparison of worldwide melanoma data. In: Balch CM, Milton GW, editors. *Cutaneous Melanoma: clinical management and treatment results worldwide*. Philadelphia: Lippincott Company; 1985. p. 507.

[94].Hill GJ, Moss SE, Golomb FM, Fletcher WS, Minton JP, Kremenz ET. DTIC and combination therapy for melanoma: III DTIC (NSC 45388) surgical adjuvant COG protocol 7040. *Cancer* 1981;47:2556–62.

[95].Rosenberg SA, Longo DL, Lotze MT. Principles and application of biology therapy. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer, principles and practice of Oncology*. Philadelphia: JB Lippincort Company. p. 301–47.450 N. Penel, J. Bonneterre / *La revue de médecine interne* 24 (2012) 443–451[5]

[96].Merimsky O, Shenfeld Y, Baharv E, Altomonte M, Chaitchik S, Maio M, et al. Melanoma-associated hypopigmentation: where are the antibodies. *Am J Clin Oncol* 1996;19(6):613–8.

[97].Hansen MG, Mc Carten AB. Tumor thickness and lymphocytic infiltration in malignant melanoma of the head and neck. *Am J Surg*1974;128:557–61.

[98].Rosenberg SA. Interleukin-2 and the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. *Cancer J* 2000;6 S1:S36S8.

[99].Sreiber S, Kampgen E, Wagner E, Pirkhammer D, Trcka J, Korschan H, et al. Immunotherapy of metastatic malignant melanoma by a vaccine consisting of autologous interleukin-2-transfected cancer cells: outcome of a phase I study. *Hum Gene Ther* 2009;10:983–93.

[100].Palmer K, Moore J, Everard M, Harris JD, Rodgers S, Rees RC, et al. Gene therapy with autologous, interleukin 2-secreting tumor cells inpatients with malignant melanoma. *Hum Gene Ther* 1999;10:1261–8.

[101].Osanto S, Schiphorst PP, Weijl NI, Dijkstra N, Van Wees A, Brouwenstein N, et al. Vaccination of melanoma patients with an allogeneic genetically modified interleukin 2-producing melanoma cell line. *HumGene Ther* 2000;11:739–50.

[102].Stewart AK, Lassam NJ, Quirt IC, Bailey DJ, Robstein LE, Krajden M, et al. Adenovector-mediated gene delivery of interleukin-2 in metastatic breast cancer and melanoma: results of a phase 1 clinical trial. *Gene Ther* 1996;6:350–63.

[103].Roschlitz C, Jantscheff P, Bongartz G, Dietrich PY, Quiquerez AL,

Schatz C, et al. Gene therapy study of cytokine-transfected xenogeneic cells (Vero-interleukin-2) in patients with metastatic solidtumors. *Cancer Gene Ther* 1999;9:271–81.

[104].Galanis E, Herssh EM, Stopeck AT, Gonzalez R, Burch P, Akporiaye ET, et al. Immunotherapy of advanced malignancy by direct gene transfer of an interleukin-2 DNA/DMRIE/DOPE Lipid complex: phase I/II experience. *J Clin Oncol* 1999;17:3313–23.

- [105].**Abdel-Wahab Z, Weltz C, Hester D, Pickett N, Vervaert C, Barber JR, et al.** A phase I Clinical trial of immunotherapy with interferon- γ gene-modified autologous melanoma cells, Monitoring of humoral immune response. *Cancer* 1997;80:401–12.
- [106].**Nemunaitis J, Fong T, Burrows F, Bruce J, Peters G, Ognoskie N, et al.** Phase I trial of interferon γ retroviral vector administered intratumorally with multiple courses in patients with metastatic melanoma. *Hum Gene Ther* 1999;10:1288–9.
- [107].**Chang AE, Li Q, Bishop DK, Normolle DP, Redman BD, Nickoloff BJ.** Immunogenetic therapy of human melanoma utilizing autologous tumor cells transduced to secrete granulocyte-macrophage colony stimulating-factor. *Hum Gene Ther* 2010;11:839–50.
- [108].**Mastrangelo MJ, Maguire HC, Eisenlohr LC, Laughlin CE, Monken CE, McCue PA, et al.** Intratumoral recombinant GM-CSF encoding virus as gene therapy in patients with cutaneous melanoma. *Cancer Gene Ther* 2009;6:409–22.
- [109].**Ariel T, Berlusco F, Suso J, Mateocchi A, Gallino GF, et al.** Vaccination of melanoma. *Genetic Ther* 2010;10:1107–23.
- [110].**Belli F, Mascheroni L, Galliano G, Lenisa L, Arienti F, Melani C, et al.** Immunization of melanoma patients with IL-2. *Cancer Immunol Immunother* 2012 ;32:88–111.
- [111].**Kapcinska M, Wiznerowicz M, Malicki J, Nawrocki S, Nowak J, et al.** Immunogene therapy of human melanoma: phase I/II clinical trial. *Adv Exp Med Biol* 2012;451:557–60.
- [112].**Muller Y, Alijae S, Elmakki A, Jurgo L, et al.** anti-melanoma lytic activity in peripheral blood. *Br J Cancer* 2009;88:104–13.
- [113].**Sun Y, Jurgovsky K, Moller P, Alijagic S, Dorbic T, Georgieva J, et al.** Vaccination with IL-12 gene-modified autologous melanoma cells: a preclinical results and a first clinical phase I study. *Gene Ther* 1998;5:481–90.
- [114].**Stopeck A, Hersh EM, Akporiaye ET, Harris DT, Grogan T, Unger E, et al.** Phase I study of direct gene transfer of an allogeneic histocompatibility antigen, HLA-B7, in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 1997;15:341–9.
- [115].**Klatzmann D, Chérin P, Bensimon G, Boyer O, Coutellier A, Charlotte F, et al.** A phase I/II dose-escalation study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase « suicide » gene therapy for metastatic melanoma. *Hum Gene Ther* 1998;9:2585–94.
- [116].**Elshami AA, Saavedra A, Zhang H, Kucharczuck JC, Spray DC, Fishman GI, et al.** Gap junctions play a role in the « bystander effect » of the herpes simplex virus thymidine kinase/gancicovir system invitro. *Gene Ther* ;3:85–92.

[117].**West WH, Tauer KW, Yanelli JR, Marshall GD, Orr DW, ThurmanGD, et al.** Constant infusion recombinant interleukine-2 in adoptive immunotherapy of advanced cancer. *N Engl J Med* 1987;316:895–8.

[118].<http://cancernet.nci.nih.gov/trialsrch.shtml>.

[119].**Marchand M, Van Baren N, Weynants P, Brichard V, Dreno B, Tessier MH, et al.** Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by geneMAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* 1999;80:219–30.

[120].**Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, et al.**

{121}.**Bertin S, Mohsen-Kanson T, Baqué P, Gavelli A, Momier D, Anjuere F, Carle GF, Pierrefite-Carle V.** Tumor microenvironment modifications induced by soluble VEGF receptor expression in a rat liver metastasis model. *Cancer Lett.* 2010 Dec 8;298(2):264-72.

[122].**Bertin S, Pierrefite-Carle V.** Autophagy and toll-like receptors: a new link in cancer cells. *Autophagy.* 2008 Nov;4(8):1086-9.

[123].**Neves S, Faneca H, Bertin S, Konopka K, Duzgunez N, Pierrefite-Carle V, Simies S, Pedroso de Lima MC.** Transferrin lipoplex-mediated suicide gene therapy of oral squamous cell carcinoma in an immunocompetent murine model and mechanisms involved in the antitumoral response. *Cancer Gene Ther.* 2009 Jan;16(1):91-101.

[124].**Bertin S, Samson M, Pons C, Guignon JM, Gavelli A, Baqué P, Brossette N, Pagnotta S, Ricci JE, Pierrefite-Carle V.** Comparative proteomics study reveals that bacterial CpG motifs induce tumor cell autophagy in vitro and in vivo. *Mol Cell Proteomics.* 2008 Dec;7(12):2311-22.

[125].**Bertin S, Anjuere F, Gavelli A, Baque P, Soilihi BK, Brossette N, Loubat A, Pierrefite-Carle V.** Plasmidic CpG sequences induce tumor microenvironment modifications in a rat liver metastasis model. *Int J Mol Med.* 2008 Mar;21(3):309-15.

[126].**Bertin S, Neves S, Gavelli A, Baqué P, Brossette N, Simões S, Pedroso de Lima MC, Pierrefite-Carle V.** Cellular and molecular events associated with the antitumor response induced by the cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide gene therapy system in a rat liver metastasis model. *Cancer Gene Ther.* 2007 Oct; 14(10):858-66.

[127].**Tepper, R. I., Coffman, R. L., and Leder, P.** (1992). An eosinophil dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science* 257, 548–551.

[128].**Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A. et al.** (1993). Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3539–3543.

- [129].**Porgador, A., Bannerji, R., Watanabe, Y. et al.** (1993). Antimetastatic vaccination of tumor-bearing mice with two types of IFN-gamma gene inserted tumor cells. *J. Immunol.* 150, 1458–1470, 1993.
- [130].**Rosenthal, F. M., Cronin, K., Bannerji, R. et al.** (1994). Augmentation of antitumor immunity by tumor cells transduced with a retroviral vector carrying the interleukin-IL2 and interferon-gamma cDNAs. *Blood* 83, 1289–1298.
- [131].**Townsend, S. E., and Allison, J. P.** (1993). Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells. *Science* 259, 368–370.
- [132]. **Plautz, G. E., Yang, Z. Y., Wu, B. Y. et al.** (1993). Immunotherapy of malignancy by in vivo gene transfer into tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4645–4649.
- [133].**Nabel, G. J., Nabel, E. G., Yang, Z. Y. et al.** (1993). Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in human. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11307–11311.
- [134].**Trojan, J., Blossey, B. K., Johnson, T. R. et al.** (1992). Loss of tumorigenicity of rat glioblastoma directed by episome-based antisense cDNA transcription of insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4874–4878.
- [135].**Johnson R., Robin. D. et al. (2012).** Treatment of rat glioblastoma by immunogenic C6 *Science* 124, 55–64.
- [136].**E. Plantin-Carrenard, M.J. Foglietti** Le symporteur sodium/iodure: données récentes et perspectives thérapeutiques. *Beaudeux Pathol Biol*, 53 (2005), pp. 174–182
- [137].**Pourcher Th, S.L. Indenthal, C. Basquin, O. Ferhat, R. Marsault, P.M. Carrier et al.** Le transporteur d'iode (NIS): nouvelles perspectives en oncologie nucléaire *Med Nucl Imagerie Fonctionnelle Metabolique* (2005), p. 29
- [138].**Massart E, Corbineau S.** Transporteurs d'iodures et fonction thyroïdienne *Immuno analyse Biol Spec*, 21 (2006), pp. 138–143
- [139].**Leclère J, Panescu C.** Actualités en endocrinologie thyroïdienne. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* 10-010-B-10.
- [140].**G. Riesco-Eizaguirre, P. Santisteban** A perspective view of sodium iodide symporter research and its clinical implications *Eur J Endocrinol*, 155 (2006), pp. 495–512
- [141].**M. Hingorani, C. Spitzweg, G. Vassaux, K. Newbold, A. Melcher, H. Pandha et al.** The biology of the sodium iodide symporter and its potential for targeted gene delivery *Curr Cancer Drug Targets*, 10 (2010), pp. 242–267

- [142].**Y.J. Lee, J.K. Chung, J.H. Kang, J.M. Jeong, D.S. Lee, M.C. Lee** Wild-type p53 enhances the cytotoxic effect of radionuclide gene therapy using sodium iodide symporter in a murine anaplastic thyroid cancer model *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 37 (2010), pp. 235–241
- [143].**Vlaeminck-Guillem V.** Structure et physiologie thyroïdiennes. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* 10-002-B-10.
- [144].**C. Foujilas, C. Marakaki, N. Sirmos, J. Hell** Sodium-iodine symporter in thyroid, normal and cancer tissues and its relation to nuclear medicine and to gene cloning treatment *Nucl Med*, 12 (2009), pp. 189–193
- [145].**I.Peyrottes, V. Navarro, A. Ondo-Mendez, D. Marcellin, L. Bellanger, R. Marsault et al.** Immunoanalysis indicates that the sodium iodide symporter is not overexpressed in intracellular compartments in thyroid and breast cancers *Eur J Endocrinol*, 160 (2010), pp. 215–225
- [146].**F.C. Gaertner, F. Rohde, J. Mueller, B. Blechert, K.P. Janssen, M. Essler** Endogenous expression of the sodium iodide symporter mediates uptake of iodide in murine models of colorectal carcinoma *Int J Cancer*, 125 (2009), pp. 2783–2791
- [147].**M.A. Trujillo, M.J. Oneal, J. Davydova, E. Bergert, M. Yamamoto, J.C. 3rd. Morris** Construction of an MUC-1 promoter driven, conditionally replicating adenovirus that expresses the sodium iodide symporter for gene therapy of breast cancer *Breast Cancer Res*, 11 (2009), p. R53
- [148].**C. Renier, C. Yao, M. Goris, M. Ghosh, L. Katznelson, K. Nowles et al.** Endogenous NIS expression in triple-negative breast cancers *Ann Surg Oncol*, 16 (2009), pp. 962–967
- [149].**C. Renier, H. Vogel, O. Offor, C. Yao, I. Wapnir** Breast cancer brain metastases express the sodium iodide symporter *J Neurooncol*, 96 (2010), pp. 331–336
- [150].**M. Navarra, S. Micali, S.M. Lepore, A.M. Cesinaro, M. Celano, M.C. Sighinolfi et al.** Expression of the sodium/iodide symporter in human prostate adenocarcinoma *Urology*, 75 (2010), pp. 773–778
- [151].**A. Farnedi, L.H. Eusebi, F. Poli, M.P. Foschini** Immunohistochemical expression of the human sodium/iodide symporter distinguishes malignant from benign gastric lesions *Int J Surg Pathol*, 17 (2009), pp. 327–334

- [152].**P. Msaouel, I.D. Lankov, C. Allen, I. Aderca, M.J. Federspiel, D.J. Tindall et al.** Noninvasive imaging and radiotherapy of prostate cancer using an oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter *Mol Ther*, 17 (2009), pp. 2041–2208
- [153].**C. Spitzweg** Gene therapy in thyroid cancer *Horm Metab Res*, 41 (2009), pp. 500–509
- [154].**V.E. Smith, M.L. Read, A.S. Turnell, R.J. Watkins, J.C. Watkinson, G.D. Lewy et al.** A novel mechanism of sodium iodide symporter repression in differentiated thyroid cancer *J Cell Sci*, 122 (2009), pp. 3393–3402
- [155].**H. Li, K.W. Peng, D. Dingli, R.A. Kratzke, S.J. Russell.** Oncolytic measles viruses encoding interferon beta and the thyroidal sodium iodide symporter gene for mesothelioma virotherapy *Cancer Gene Ther*, 17 (2011), pp. 550–558
- [156].**S.H. Kim, H.K. Chung, J.H. Kang, K.I. Kim, Y.H. Jeon, Y.N. Jin et al.** Tumor-targeted radionuclide imaging and therapy based on human sodium iodide symporter gene driven by a modified telomerase reverse transcriptase promoter *Hum Gene Ther*, 19 (2010), pp. 951–957
- [157].**X.J. Ma, R. Huang, A.R. Kuang** AFP promoter enhancer increased specific expression of the human sodium iodide symporter (hNIS) for targeted radioiodine therapy of hepatocellular carcinoma *Cancer Invest*, 27 (2009), pp. 673–681
- [158].**R.S. Liu, Y.J. Hsieh, Wang R et al.** activation of sodium iodide symporter gene in hepatoma using alpha-fetoprotein promoter combined with hepatitis B virus enhancer (EIIAPA) *Anticancer Res*, 29 (2010), pp. 111–228
- [159].**L.L. You, J.L. Yong, J.A. Sohn, H.C. Tae, S.M. Byung, J.C. Gi et al.** Combined radionuclide-chemotherapy and in vivo imaging of hepatocellular carcinoma cells after transfection of a triple-gene construct, NIS, HSV1-sr39tk, and EGFP *Cancer Lett*, 290 (2010), pp. 129–134
- [160].**M.J. Willhauck, B.R. Samani, I. Wolf, R. H.J. Stark, G.J. Meyer et al.** The potential of ²¹¹Astatine for NIS-mediated radionuclide therapy in prostate cancer *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 35 (2010), pp. 1339–1487
- [161].**M.A. Trujillo, M.J. Oneal, S. McDonough, R. Qin, J.C. Morris** A probasin promoter, conditionally replicating adenovirus that expresses the sodium iodide symporter (NIS) for radiovirotherapy of prostate cancer *Gene Ther*, 17 (2010), pp. 1325–1332
- [162].**M. Hingorani, C.L. White, S. Zaidi, H.S. Pandha, A.A. Melcher, S.A. Bhide et al.** Therapeutic effect of sodium iodide symporter gene therapy combined with external beam radiotherapy and targeted drugs that inhibit DNA repair *Mol Ther*, 18 (2010), pp. 1599–1605

- [163].**H. Alotaibi, E. Yaman, D. Salvatore, V. Di Dato, P. Telkoparan, R. Di Lauro et al.** Intronic elements in the Na⁺/I⁻-symporter gene (NIS) interact with retinoic acid receptors and mediate initiation of transcription *Nucleic Acids Res*, 38 (2010), pp. 3172–3185
- [164].**K. Klutz, D. Schaffert, M.J. Willhauck, G.K. Grünwald, R. Haase, N. Wunderlich et al.** Epidermal growth factor receptor-targeted (131I)-therapy of liver cancer following systemic delivery of the sodium iodide symporter gene *Mol Ther*, 19 (2011), pp. 676–685
- [165].**C.G. Riese, S. Seitz, M.L. Schipper, T.M. Behr** Effective treatment of pancreatic neuroendocrine tumours transfected with the sodium iodide symporter gene by 186Re-perrhenate in mice *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 36 (2009), pp. 1767–1773
- [166].**S Renn, D Weger, D. Kemp S et al.** molecular imaging of viral therapy for pancreatic cancer, 192 (2012), pp. 321–344
- [167].**A.R. Penheiter, T.R. Wegman, K.L. Classic, D. Dingli, C.E. Bender, S.J. Russell et al.** Sodium iodide symporter (NIS)-mediated radiovirotherapy for pancreatic cancer *AJR Am J Roentgenol*, 195 (2010), pp. 341–
- [168].**Bertolin G, Mooreen F, Bart R, Gavelli A, Momier D, Anjuere F, Carle GF, Pierrefite-Carle V.** Tumor modifications induced by VEGF receptor. *Cancer Lett.* 2012 Dec 12;128:364-67.
- [169].**Bahr C, Groner B** (2005) The IGF-1 receptor and its contributions to metastatic tumor growth—novel approaches to the inhibition of IGF-1R function. *Growth Factors* 23: 1-14
- [170].**Wang Y, Sun Y** (2002) Insulin-like growth factor receptor-I as an anti-cancer target: blocking transformation and inducing apoptosis. *Curr Cancer Drug Targets* 2: 191-207
- [171].**Miller BS, Yee D** (2005) Type I insulin-like growth factor receptor as a therapeutic target in cancer. *Cancer Res* 65: 10123-7
- [172].**Arteaga CL, Kitten LJ, Coronado EB, et al.** (1989) Blockade of the type I somatomedin receptor inhibits growth of human breast cancer cells in athymic mice. *JCO* Invest 84: 1418-23
- [173].**Maloney EK, McLaughlin JL, Dagdigian NE, et al.** (2003) An anti-insulin-like growth factor I receptor antibody that is a potent inhibitor of cancer cell proliferation. *Cancer Res* 63: 5073-83
- [174].**Sachdev D, Singh R, Fujita-Yamaguchi Y, et al.** (2006) Down-regulation of insulin receptor by antibodies against the type I insulin-like growth factor receptor: implications for anti-insulin-like growth factor therapy in breast cancer. *Cancer Res* 66: 2391-402

- [175].**Burtrum D, Zhu Z, Lu D, et al.** (2003) A fully human monoclonal antibody to the insulin-like growth factor 1 receptor blocks ligand-dependent signaling and inhibits human tumor growth in vivo. *Cancer Res* 63: 8912-21
- [176].**WU JD, Odman A, Higgins LM, et al.** (2005) In vivo effects of the human type I insulin-like growth factor receptor antibody A12 on androgen-dependent and androgenin dependent xenograft human prostate tumors. *Clin Cancer Res* 11: 3065-74
- [177].**WU JD, Haugk K, Coleman I, et al.** (2006) Combined in vivo effect of A12, a type I insulin-like growth factor receptor antibody, and docetaxel against prostate cancer tumors. *Clin Cancer Res* 12: 6153-60
- [178].**Allen GW, Saba C, Armstrong EA, et al.** (2007) Insulin-like growth factor-I receptor signaling blockade combined with radiation. *Cancer Res* 67: 1155-62
- [179].**Cohen BD, Baker DA, Soderstrom C, et al.** (2005) Combination therapy enhances the inhibition of tumor growth with the fully human anti-type I insulin-like growth factor receptor monoclonal antibody CP-751,871. *Clin Cancer Res* 11: 2063-73
- [180].**Goetsch L, Gonzalez A, Leger O, et al.** (2005) A recombinant humanized anti-insulin like growth factor receptor type I antibody (h7C10) enhances the antitumor activity of vinorelbine and anti-epidermal growth factor receptor therapy against human cancer xenografts. *Int J Cancer* 113: 316-28
- [181].**Wang Y, Hailey J, Williams D, et al.** (2005) Inhibition of insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) signaling and tumor cell growth by a fully human neutralizing anti-IGF-IR antibody. *Mol Cancer Ther* 4: 1214-21
- [182].**Dittrich C, Zandvliet AS, Gneist M, et al.** (2007) A phase I and pharmacokinetic study of indisulam in combination with carboplatin. *Br J Cancer* 96: 559-66
- [183].**Ye JI, Liang SJ, Guo N, et al.** (2003) Combined effects of tamoxifen and a chimeric humanized single chain antibody against the type I IGF receptor on breast tumor growth in vivo. *Horm Metab Res* 35: 836-42
- [184].**Lu D, Zhang H, Koo H, et al.** (2005) A fully human recombinant IgG-like bispecific antibody to both the epidermal growth factor receptor and the insulin-like growth factor receptor for enhanced antitumor activity. *J Biol Chem* 280: 19665-72
- [185].**Morris DG, Bramwell VH, Turcotte R, et al.** (2006) A Phase II Study of Flavopiridol in Patients With Previously Untreated Advanced Soft Tissue Sarcoma. *Sarcoma* 2006:64374
- [186].**Warshamana-Greene GS, Litz I, Buchdunger E, et al.** (2005) The insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor, NVP-ADW742, sensitizes small cell lung cancer celllines to the effects of chemotherapy. *Clin Cancer Res* 11: 1563-71

- [187].**Tanno B, Mancini C, Vitali R, et al.** (2006) Down-regulation of insulin-like growth factor I receptor activity by NVP-AEW541 has an antitumor effect on neuroblastoma cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 12: 6772-80
- [188].**Zhang H, Pelzer AM, Kiang DT, et al.** (2007) Down-regulation of type I insulin-like growth factor receptor increases sensitivity of breast cancer cells to insulin. *Cancer Res* 67: 391-7
- [189].**Stromberg T, Ekman S, Girnita L, et al.** (2012) IGF-1 receptor tyrosine kinase inhibition by the cyclolignan PPP induces G2/M-phase accumulation and apoptosis in multiple myeloma cells. *Blood* 107: 669-78
- [190].**Vasilcanu D, Weng WH, Girnita A, et al.** (2011) The insulin-like growth factor-1 receptor inhibitor PPP produces only very limited resistance in tumor cells exposed to long-term selection. *Oncogene*: 25:3186-95
- [191].**Menu E, Jernberg-Wiklund H, Stromberg T, et al.** (2006) Inhibiting the IGF-1 receptor tyrosine kinase with the cyclolignan PPP: an in vitro and in vivo study in the 5T33MM mouse model. *Blood* 107: 655-60
- [192].**Stephen CL, Gough SCL, Walker L.S.K, Sansom DM** (2005) CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. *Immunol Rev* 204: 102-15
- [193].**Lemaitre B** (2004) The road to Toll. *Nat Rev Immunol* 4: 521-7
- [194].**Matzinger P** (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12:991-1045
- [195].**Gallucci S, Matzinger P** (2001) Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 13: 114-9
- [196].**Srivastava PK** (2005) Immunotherapy for human cancer using heat shock protein peptide complexes. *Curr Opin Immunol* 7: 104-8
- [197].**Shi Y, Evans JE, Rock KL** (2003) Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425: 516-21
- [198].**Killeen SD, Wang JH, Andrews EJ, et al.** (2006) Exploitation of the Toll-like receptor system in cancer: a double-edged sword? *Br J Cancer* 95: 247-52
- [199].**van Duin D, Medzhitov R, Shaw AC** (2006) Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends Immunol* 27: 49-55
- [200].**Huang B, Zhao J, Li H, et al.** (2005) Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res* 65: 5009-14

- [201].**Miggin SM, O'Neill LA (2006)** New insights into the regulation of TLR signaling. *J Leukoc Biol* 80: 220-6
- [202].**Parker LC, Prince LR, Sabroe I (2007)** Translational Mini-Review Series on Toll-like Receptors: Networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. *Clin Exp Immunol* 147: 199-207
- [203].**Sutmuller RP, Morgan ME, Netea MG, et al. (2006)** Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends Immunol* 27: 387-93
- [204].**Hopkins PA, Sriskandan S (2005)** Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin Exp Immunol* 140: 395-407
- [205].**Schmausser B, Andrusis M, Endrich S, et al. (2005)** Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: an implication for interaction with *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* 295: 179-85
- [206].**Iwasaki A, Medzhitov R (2004)** Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5: 987-95.
- [208].**Kawai T, Akira S (2006)** TLR signaling. *Cell Death Differ* 13: 816-25
- [209].**Seki E, Tsutsui H, Nakano H, et al. (2011)** Lipopolysaccharide-induced IL-18 secretion from murine Kupffer cells independently of myeloid differentiation factor 88 that is critically involved in induction of production of IL-12 and IL-1 β . *J Immunol* 166:2651-7
- [210].**Tsan MF (2006)** Toll-like receptors, inflammation and cancer. *Semin Cancer Biol* 16:32-7
- [211].**Perabo FG, Muller SC (2012)** Current and new strategies in immunotherapy for superficial bladder cancer. *Urology* 64: 409-21
- [212].**Krieg AM (2006)** Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* 5: 471-84
- [213].**Miyazaki J, Kawai K, Oikawa T, et al. (2006)** Uro epithelial cells can directly respond to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin through Toll-like receptor signalling. *BJU Int* 97: 860-4
- [214].**Kelly MG, Avero AB, Chen R, et al. (2006)** TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res* 66: 3859-68
- [215].**Klaffenbach D, Rascher W, Rollinghoff M, et al. (2011)** Regulation and signal transduction of toll-like receptors in human chorion carcinoma cell lines. *Am J Reprod Immunol* 53: 77-84

- [216].**Hassan F, Islam S, Tumurkhuu G, et al.** (2006) Intracellular expression of toll-like receptor 4 in neuroblastoma cells and their unresponsiveness to lipopolysaccharide. *BMC Cancer* 6: 281
- [217].**Molteni M, Marabella D, Orlandi C, Rossetti C** (2006) Melanoma cell lines are responsive in vitro to lipopolysaccharide and express TLR-4. *Cancer Letter* 235: 75-83
- [218].**Li K, Chen Z, Kato N, et al.** (2005) Distinct poly(I-C) and virus-activated signaling pathways leading to interferon-beta production in hepatocytes. *J BioI Chern* 280: 16739-47
- [219].**Lang KS, Georgiev P, Recher M, et al.** (2006) Immunoprivileged status of the liver is controlled by Toll-like receptor 3 signaling. *J Clin Invest* 116: 2456-63
- [220].**Salaun B, Coste I, Rissoan MC, et al.** (2006) TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J Immunol* 176: 4894-901
- [221].**Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA** (2005) Negative regulation of toll-like receptor mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 5: 446-58
- [222].**Stockfleth E, Trefzer U, Garcia-Bartels C, et al.** (2003) The use of Toll-like receptor-7 agonist in the treatment of basal cell carcinoma: an overview. *Br J Dermatol* 149 Suppl66: 53-6
- [223].**Schulze HJ, Cribier B, Requena L, et al.** (2005) Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from a randomized vehicle-controlled phase III study in Europe. *Br J Dermatol* 152: 939-947
- [224].**Speiser DE, Lienard D, Rufer N, et al.** (2005) Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J Clin Invest* 115: 739-46
- [225].**Friedberg JW, Kim H, McCauley M, et al.** (2005) Combination immunotherapy with a CpG oligonucleotide (1018 ISS) and rituximab in patients with non-Hodgkin lymphoma: increased interferon-alpha/beta-inducible gene expression, without significant toxicity. *Blood* 105: 489-95
- [226].**Pashenkov M, Goess G, Wagner C, et al.** (2006) Phase II trial of a toll-like receptor9-activating oligonucleotide in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 24:5716-24
- [227].**fleth S, Elisabeth R, Garcia E, et al.** (2012) The use of Toll-like agonist in the treatment cell carcinoma: *J Clin Onco* 19 Suppl 1265-36
- [228].**Carpentier A, Laigle-Donadey F, Zohar S, et al.** (2006) Phase 1 trial of a CpG oligodeoxynucleotide for patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-oncol* 8: 60-6

- [229].**Beck KE, Blansfield JA, Tran KQ, et al.** (2006) Enterocolitis in patients with cancer after antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4. *J Clin Oncol* 24:2283-9
- [230].**Egen JG, Allison JP** (2002) Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity* 16: 23-35
- [231].**Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA** (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14: 233-58
- [232].**Shiratori T, Miyatake S, Ohno H, et al.** (1997) Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2. *Immunity* 5: 583-9
- [233].**Linsley PS, Bradshaw J, Greene J, et al.** (1996) Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity* 6: 535-43
- [234].**Rudd CE, Schneider H** (2003) Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 3: 544-6
- [235].**Lin H, Rathmell JC, Gray GS, Thompson CB, et al.** (1998) Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4 (CTLA4) Blockade Accelerates the Acute Rejection of Cardiac Allografts in CD28-deficient Mice: CTLA4 Can Function Independently of CD28. *J Exp Med* 188:199-204
- [236].**Masteller EL, Chuang E, Mullen AC, et al.** (2000) Structural Analysis of CTLA-4 Function In Vivo. *J Immunol* 164: 5319-27
- [237].**Ribas A, Camacho LH, Lopez-Berestein G, et al.** (2005) Antitumor activity in melanoma and anti-self responses in a phase I trial with the anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody CP-675,206. *J Clin Oncol* 23: 8968-77
- [238].**Schneider H, Prasad KV, Shoelson SE, Rudd CE** (1995) CTLA-4 binding to the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase in T cells. *J Exp Med* 181: 351-5
- [239].**Chuang E, Fisher TS, Morgan RW, et al.** (2000) The CD28 and CTLA-4 receptors associate with the serine/threonine phosphatase PP2A. *Immunity* 13: 313-22
- [240].**Maker AV, Attia P, Rosenberg SA, et al.** (2005) Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA-4 blockade. *J Immunol* 175: 7746-54
- [241].**Reuben JM, Lee BN, Li C, et al.** (2006) Biologic and immunomodulatory events after CTLA-4 blockade with ticilimumab in patients with advanced malignant melanoma. *Cancer* 106: 2437-44

- [242].**Lute KD, May KF [r, Lu PHuman, et al.** (2005) CTLA4 knock-in mice unravel the quantitative link between tumor immunity and autoimmunity induced by anti-CTLA-4 antibodies. *Blood* 106: 3127-33
- [243].**Maker AV, Phan GQ, Attia P, et al.** (2005) Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase VII study. *Ann Surg Oncol* 12: 1005-16
- [244].**Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW.** Telomerase activity in human germline activity and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 1996 ; 18 : 173-9.
- [245].**Weng NP, Granger L, Hodes RJ.** Telomere lengthening and telomerase activation during human B cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 10827-32.
- [246].**Yasumoto S, Kunimura C, Kikuchi K, Tahara H, Ohji H, Yamamoto H, et al.** Telomerase activity in normal human epithelial cells. *Oncogene* 1996 ; 13 : 433-9.
- [247].**Riou JF, Morjani H, Trentesaux C.** Télomères et télomérase, de nouvelles cibles pour la chimiothérapie anticancéreuse. *Ann Pharm Fr* 2006 ; 64 : 97-105.
- [248].**Shay JW, Wright WE, Hayflick,** limit, and cellular ageing. *Mol Cell Biol* 2000 ; 1: 72-6.
- [249].**Hanahan D, Weinberg RA.** The hallmarks of cancer. *Cell* 2000 ; 100 : 57-70.
- [250].**Dunham MA, Neuman NAA, Fasching CL, Reddel RR.** Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet* 2000 ; 26 : 447-50.
- [251].**Riou JF, Gomez D, Mergny JL, Guittat L, Paterski R, Chenais B, et al.** Régulation de la longueur des télomères : rendre le télomère accessible ? *Bull Cancer* 2005 ; 92 : 13-22.
- [252].**De Lange T. Shelterin:** the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Gene Dev* 2005 ; 19 : 2100-10.
- [253].**Kelleher C, Kurth I, Lingner J.** Human protection of telomeres 1 (POT1) is a negative regulator of telomerase activity in vitro. *Mol Cell Biol* 2005 ; 25 : 808-18.
- [254].**Ye JZ, Hockemeyer D, Krutchinsky AN, Loayza D, Hooper SM, Chait BT, et al.** POT 1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex. *Genes Dev* 2004 ; 18 : 1649-54.
- [255].**Cook BD, Dynek JN, Chang W, Shostak G, Smith S.** Role for the related poly(ADP-ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres. *Mol Cell Biol* 2002 ; 22 : 332-42.
- [256].**Zhu XD, Kuster B, Mann M, Petrini JH, de Lange T.** Cell cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet* 2000 ; 25 : 347-52.

- [257].**Opresko PL, von Kobbe C, Laine JP, Harrigan J, Hickson ID, Bohr VA.** Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 41110-9.
- [258].**Song K, Jung D, Jung Y, Lee SG, Lee I.** Interaction of human ku70 with TRF2. *BEBS Lett* 2000 ; 481 : 81-5.
- [259].**Karlseder J, Hoke K, Mirzoeva OK, Bakkenist C, Kaston MB, Petrini JH, et al.** The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. *PLoS Biol* 2004 ; 2 : E240.
- [269].**Gilson E.** Une bonne année pour la télomérase. *Bull Cancer* 1998 ; 85 : 119-23.
- [261].**Cohen SB, Graham ME, Lovreczy GO, Bache N, Robinson PJ, Reddel RR.** Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science* 2007 ; 315 : 1850-3.
- [262].**Cong YS, Wright WE, Shay JW.** Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol R* 2002 ; 66 : 407-25.
- [263].**Hoare SF, Bryce LA, Wisman GBA, Burns S, Going JJ, van de Zee AGJ, et al.** Lack of telomerase RNA gene hTERT expression in alternative lengthening of telomeres cells is associated with methylation of the hTERT promoter. *Cancer Res* 2001 ; 61 : 27-32.
- [264].**Atkinson SP, Hoare SF, Glasspool RM, Keith WN.** Lack of telomerase gene expression in alternative lengthening of telomere cells is associated with chromatin remodeling of the hTR and hTERT gene promoters. *Cancer Res* 2005 ; 65 : 7585-90.
- [265].**Colgin LM, Wilkinson C, Englezou A, Kilian A, Robinson MO, Reddel RR.** The hTERT α splice variant is a dominant negative inhibitor of telomerase activity. *Neoplasia* 2000 ; 2 : 426-32.
- [266].**Lundblad V.** Telomeres: taking the measure. *Nature* 2003; 423 : 926-7.
- [267].**Blackburn EH. Telomeres and telomerase:** their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett* 2005 ; 579 : 859-62.
- [268].**Olaussen KA, Dubrana K, Domont J, Spano JP, Sabatier L, Soria JC.** Telomeres and telomerase as targets for anticancer drug development. *Crit Rev Oncol Hemat* 2006 ; 57 : 191-214.
- [269].**Ouellette MM, Lee K. Telomerase:** diagnostics, cancer therapeutics and tissue engineering. *Ther Focus* 2001 ; 23 : 1231-7.
- [270].**Folini M, Zaffaroni N.** Targeting telomerase by antisense-based approaches: perspectives for new anti-cancer therapies. *Curr Pharm Design* 2005 ; 11 : 1105-17.

- [271].**Folini M, Brambilla C, Villa R, Gandellini P, Vignati S, Paduano F, et al.** Antisense oligonucleotide-mediated inhibition of hTERT, but not hTERC, induces rapid cell growth decline and apoptosis in the absence of telomere shortening in human prostate cancer cells. *Eur J Cancer* 2005 ; 41 : 624-34.
- [272].**Fuessel S, Meye A, Kraemer K, Kunze D, Hakenberg OW, Wirth MP.** Synthetic nucleic acids as potential therapeutic tools for treatment of bladder carcinoma. *Eur Urol* 2007; 51 : 315-27.
- [273].**Asai A, Oshima Y, Yamamoto Y, Uochi TA, Kusaka H, Akinaga S, et al.** A novel telomerase template antagonist (GRN163) as a potential anticancer agent. *Cancer Res* 2003 ; 63 : 3931-9.
- [274].**Gellert GC, Jackson SR, Dikmen ZG, Wright WE, Shay JW.** Telomerase as therapeutic target in cancer. *Drug Discovery Today Dis Mech* 2005 ; 2 : 159-64.
- [275].**Elayadi AN, Demieville A, Wancewicz EV, Monia BP, Corey DR.** Inhibition of telomerase by 2'-O-(2-methoxyethyl) RNA oligomers: effect of length, phosphorothioate substitution and time inside cells. *Nucleic Acids Res* 2001 ; 29 : 1683-9.
- [276].**Koga S, Kondo Y, Komata T, Kondo S.** Treatment of bladder cancer cells in vitro and in vivo with 2-5A antisense telomerase RNA. *Gene Ther* 2001 ; 8 : 654-8.
- [277].**Kondo Y, Komata T, Kondo S.** Combination therapy of 2-5A antisense against telomerase RNA and cisplatin for malignant gliomas. *Int J Oncol* 2001 ; 18 : 1287-92.
- [278].**Kore AR, Vaish NK, Kutzke U, Eckstein F.** Sequence specificity of the hammerhead revisited: the NHH rule. *Nucleic Acids Res* 1998 ; 26 : 4116-20.
- [279].**Yeo M, Rha Y, Jeung HC, Hu SX, Yang SH, Kim YS, et al.** Attenuation of telomerase activity by hammerhead ribozymes targeting human telomerase RNA induces growth retardation and apoptosis in human breast tumor cells. *Int J Cancer* 2005 ; 114 : 484-9.
- [280].**Kanazawa Y, Ohkawa K, Ueda K, Mita E, Takehara T, Sasaki Y, et al.** Hammerhead ribozyme-mediated inhibition of telomerase activity in extracts of human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Co* 1996 ; 225 : 570-6.
- [281].**Folini M, Pennati M, Zaffaroni N.** Targeting human telomerase by antisense oligonucleotides and ribozymes. *Curr Med Chem AntiCancer Agents* 2002 ; 2 : 605-12.
- [282].**Yokoyama Y, Takahashi Y, Shinohara A, Wan X, Takahashi S, Niwa K, et al.** The 5' end of hTERT mRNA is a good target for hammerhead ribozyme to suppress telomerase activity. *Biochem Biophys Res Co* 2000 ; 273 : 316-21.
- [283].**Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T.** Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 2002 ; 26 : 199-213.

- [284].**Kosciolek BA, Kalantidis K, Tabley M, Rowley PT.** Inhibition of telomerase activity in human cancer cells by RNA interference. *Mol Cancer Ther* 2003 ; 2 : 209-16.
- [285].**Lu XD, Qin WX, Pan DN, Li JJ, Wan DF, Wen CJ, et al.** A DNA vector-based RNAi technology to inhibit the activity of the telomerase of cell line HCCLM3. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2004 ; 84 : 1381-5.
- [286].**Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, et al.** Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med* 1999 ; 5 : 1164-70.
- [287].**Lin SY, Elledge SJ.** Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. *Cell* 2003 ; 113 : 881-9.
- [288].**Misiti S, Nanni S, Fontemaggi G, Cong YS, Wen J, Hirte HW, et al.** Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells. *Mol Cell Biol* 2000 ; 20 : 3764-71.
- [289].**Wu KJ, Grandori C, Amacker M, Simon-Vermot N, Polack A, Lingner J, et al.** Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat Genet* 1999 ; 21 : 220-4.
- [290].**Grand CL, Han H, Munoz RM, Weitman S, Von Hoff DD, Hurley LH, et al.** The cationic porphyrin TMPyP4 down-regulates c-MYC and human telomerase reverse transcriptase expression and inhibits tumor growth in vivo. *Mol Cancer Ther* 2002 ; 1 : 565-73.
- [291].**Li H, Lee TH, Avraham H.** A novel tricomplex of BRCA1, Nmi, and c-Myc inhibits c-MYC-induced human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT) promoter activity in breast cancer. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 20965-73.
- [292].**Goueli BS, Janknecht R.** Upregulation of the catalytic telomerase subunit by the transcription Factor ER81 and Oncogenic HER2/Neu, Ras, or Raf. *Mol Cell Biol* 2004 ; 24 : 25-35.
- [293].**Guilleret I, Benhattar J.** Unusual distribution of DNA methylation within the hTERT CpG island in tissues and cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 ; 325 : 1037-43.
- [294].**Kitagawa Y, Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Koshida K, Namiki M, et al.** Demethylating reagent 5-azacytidine inhibits telomerase activity in human prostate cancer cells through transcriptional repression of hTERT. *Clin Cancer Res* 2000 ; 6 : 2868-75.
- [295].**Woo HJ, Lee SJ, Choi BT, Park YM, Choi YH.** Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity by trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, in human leukemic U937 cells. *Exp Mol Pathol* 2007 ; 82 : 77-84.

- [296].Wang Z, Kyo S, Takakura M, Tanaka M, Yatabe N, Maida Y, et al. Progesterone regulates human telomerase reverse transcriptase gene expression via activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res* 2000 ; 60 : 5376-81.
- [297].Kimura A, Ohmichi M, Kawagoe J, Kyo S, Mabuchi S, Takahashi T, et al. Induction of hTERT expression and phosphorylation by estrogen via Akt cascade in human ovarian cancer cell lines. *Oncogene* 2004 ; 23 : 4505-15.
- [298].Yu CC, Lo SC, Wang TC. Telomerase is regulated by protein kinase C-zeta in human nasopharyngeal cancer cells. *Biochem J* 2001 ; 355 : 459-64.
- [299].Hemann MT, Strong MA, Hao LY, Greider CW. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* 2001 ; 107 : 67-77.
- [300].Chen CSJ, Siegel DM (2007) Dermatofibrosarcoma protuberans: treatment medication. @Medecine – update
- [301].Hurley LH, Wheelhouse RT, Sun D, Kerwin SM, Salazar M, Fedoroff OY, et al. G-quadruplex as targets for drug design. *Pharmacol Ther* 2000 ; 85 : 141-58.
- [302].Chen CSJ, Siegel DM (2007) Dermatofibrosarcoma protuberans: treatment & medication. @Medecine – update
- [303].Magne N, Etienne-Grimadi MC, Cals L *et al.* (2007) Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and the IVS14+1G>A mutation in patients developing 5FU-related toxicity. *Brit J Clin Pharmacol* 64: 237-40
- [304].Boukamp P, Mirancea N. Telomeres rather than telomerase a key target for anticancer therapy? *Exp Dermatol* 2007 ; 16 : 71-9.
- [305].Gomez D, Wenner T, Brassard B, Douarre C, O'Donohue MF, ElKhoury V, et al. Telomestatin-induced telomere uncapping is modulated by POT1 through G-overhang extension in HT1080 human tumor cells. *J Biol Chem* 2006 ; 281 : 38721-9.
- [306].de Cian A, Lacroix L, Douarre C, Temime-Smaali N, Trentesaux C, Riou JF, et al. Targeting telomeres and telomerase. *Biochimie* 2008 ; 90 : 131-55.
- [307].Huppert JL, Balasubramanian S. G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic Acids Res* 2007 ; 35 : 406-13.
- [308].Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, De Lange T. p53- and ATM dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 1999 ; 283 : 1321-5.
- [309].Magne N, Etienne-Grimadi MC, Cals L *et al.* (2007) Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and the IVS14+1G>A mutation in patients developing 5FU-related

toxicity. *Brit J Clin Pharmacol* 64: 237-40 310. Seimiya H. The telomeric PARP, tankyrase, as targets for cancer therapy. *Br J Cancer* 2006 ; 94 : 341-5.

[310]. **Byrd-Leifer CA, Block EF, Takeda K, et al.** (2001) The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxo. *Eur J Immunol* 31: 2448-57

[311]. **Rybak LP, Whitworth CA, Mukherjea D et al.** (2007) Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. *Hear Res* 226: 157-67

[312]. **Bermudez Y, Ahmadi S, Lowell NE, Kruk PA.** Vitamin E suppresses telomerase activity in ovarian cancer cells. *Cancer Detect Prev* 2007; 31 : 119-28.

[313]. **Cortez-Gonzalez X, Zanetti M.** Telomerase immunity from bench to bedside: round one. *J Transl Med* 2007; 5 : 12.

[314]. **Irving J, Wang Z, Powell S, O'Sullivan C, Mok M, Murphy B, et al.** Conditionally replicative adenovirus driven by the human telomerase promoter provides broad-spectrum antitumor activity without liver toxicity. *Cancer Gene Ther* 2004 ; 11 : 174-85.

[315]. **Lansiaux A, Lokiec F** (2012) telomeres in tumor progression. *N. Oncoly* 233: 21-9

[316]. **Feldser DM, Greider CW.** Short telomeres limit tumor progression in vivo by inducing senescence. *Cancer Cell* 2007 ; 11 : 461-9.

Serment de Galien

- *Je jure en présence des maîtres de cette faculté :*
- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé publique, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*
- *D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.*
- *Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois méprisé de mes confrères si je manquais à mes engagements.*



جامعة محمد الخامس
كلية الطب والصيدلة
- الرباط -

قسم الصيدلي

بسم الله الرحمن الرحيم

وأحس بالله العظيم

- أن أراقب الله في مهنتي
- أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيا لتعاليمهم.
- أن أزاول مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبدا في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
- أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأداب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.
- أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلى أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
- لأحضى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.

"والله على ما أقول شهيد"



جامعة محمد الخامس –السويسي–
كلية الطب والصيدلة بالرباط

أطروحة رقم: 69

سنة: 2013

مضادات السرطان مقاربات علاجية جديدة

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم:.....

من طرف

السيّد : بنعزوز عبد الحميد

المزداد في 1988/10/30 بالرباط
لنيل شهادة الدكتوراة في الصيدلة

الكلمات الأساسية: مضادات السرطان، علاجات موجهة، فيروس محلل للورم، شيخوخة،
الجزئيات المبرمجة لموت الخلايا.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيسة

مشرفة

أعضاء

السيدة : سكيّنة الحمزاوي

أستاذة في علم الجراثيم

السيدة: سعيدة طلال

أستاذة في الكيمياء العلاجية

السيد: عبد القادر لعتيريس

أستاذ في الصيدلة الجالينوسية

السيد : محمد إيشو

أستاذ في علم الأورام الطبية

السيدة : نزهة مسعودي

أستاذة في علم الدم الإحيائي