

Université de POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNÉE : 2015

Thèse n°

THÈSE
POUR LE DIPLOME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

(arrêté du 17 juillet 1987)

présentée et soutenue publiquement

le 2 juillet 2015 à POITIERS

par Monsieur TRAQUET Joackim

Né le 23 juillet 1988

Recherche de biomarqueurs prédictifs du mélanome de l'uvée dans le but d'une thérapie ciblée anticancéreuse : étude à partir de xénogreffes dérivées de patients.

Composition du jury :

Président : Monsieur le Professeur FAUCONNEAU Bernard

Membre : Monsieur BRILLAULT Julien, Maître de conférences

Madame AUDIER Claire, Interne en médecine générale

Directrice de thèse : Madame PAGE Guylène, Professeur

Université de POITIERS
Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNÉE : 2015

Thèse n°

THÈSE
POUR LE DIPLOME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

(arrêté du 17 juillet 1987)

présentée et soutenue publiquement

le 2 juillet 2015 à POITIERS

par Monsieur TRAQUET Joackim

Né le 23 juillet 1988

Recherche de biomarqueurs prédictifs du mélanome de l'uvée dans le but d'une thérapie ciblée anticancéreuse : étude à partir de xénogreffes dérivées de patients.

Composition du jury :

Président : Monsieur le Professeur FAUCONNEAU Bernard

Membre : Monsieur BRILLAULT Julien, Maître de conférences

Madame AUDIER Claire, Interne en médecine générale

Directrice de thèse : Madame PAGE Guylène, Professeur

Remerciements

Je tiens à remercier dans un premier temps ma directrice de thèse Madame Guylène Page pour avoir supervisé le travail de rédaction de cette thèse ainsi que les membres du jury pour avoir accepté de s'intéresser à mon sujet.

Je remercie également Monsieur Didier Decaudin pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche et pour m'avoir confié les missions décrites dans ce document.

Je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes suivantes, pour l'expérience enrichissante et pleine d'intérêts qu'elles m'ont fait vivre durant ces quelques mois au sein de l'institut Curie :

Monsieur Guillaume Carita, étudiant en thèse de sciences, mon premier tuteur, Monsieur Ahmed Dahmani, ingénieur d'étude, mon second tuteur et Monsieur Franck Assayag ingénieur de recherche, tous membres du laboratoire d'investigation préclinique de l'institut Curie, pour m'avoir intégré rapidement au sein de l'équipe et m'avoir accordé leur confiance ; pour le temps qu'ils m'ont consacré tout au long de cette période, sachant répondre à toutes mes interrogations ; sans oublier leur participation au cheminement de cette thèse.

Je remercie enfin David Vallerand, Chloé Raymondi, Adèle Soria ainsi que l'ensemble du personnel du laboratoire d'investigation préclinique de l'institut Curie pour leur accueil sympathique et leur coopération professionnelle tout au long de ces derniers mois.

Enfin, je remercie ma famille et mes amis pour m'avoir soutenu tout au long de mes études et avoir rendu toutes ces années aussi bonnes que possible. Je tiens à remercier tout particulièrement mes grands parents sans qui tout ça n'aurait pas été possible.

Table des matières

Remerciements	3
Introduction	10
1. Description de l'œil	11
1.1. La tunique protectrice	12
1.2. La tunique vascularisée	12
1.3. La tunique visuelle	13
1.4. Le contenu de la cavité interne	13
2. Biologie du cancer	14
2.1. Présentation générale	14
2.2. Proto-oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs	15
2.3. Intégrité du génome	18
2.4. Signalisation cellulaire	21
2.5. Tumorigenèse	23
2.6. Microenvironnement tumoral	36
2.7. Concept de cellules souches tumorales	37
3. Thérapies pharmacologiques anticancéreuses	38
3.1. Classification des agents antitumoraux	38
3.2. Résistance aux traitements pharmacologiques anticancéreux	48
3.3. Principes de prise en charge thérapeutique du cancer	49
4. Présentation du mélanome uvéal	52
4.1. Epidémiologie	52
4.2. Considérations cliniques	53
4.3. Biologie	54
4.4. Traitements et suivis	58
5. Recherche préclinique en cancérologie	60
5.1. Généralités	60
5.2. Xénogreffes Dérivées de Patients (PDX)	60
Problématique	63
Objectifs	63

Matériels et méthodes	64
1. Méthode de xénogreffe et suivi des modèles :	64
1.1. Xénogreffe.....	64
1.2. Mesures et inclusions.....	65
1.3. Traitements	65
1.4. Récupération des données	66
1.5. Prélèvements et sacrifices.....	66
2. Recherche de cibles thérapeutiques protéiques	67
2.1. Définitions	67
2.2. Broyage des échantillons tumoraux.....	67
2.3. Western blot.....	68
2.4. Puces protéiques en phase inverse (RPPA).....	70
3. Evaluation <i>in vivo</i> du bevacizumab.....	71
3.1. Contexte de l'étude	71
3.2. Études de toxicité.....	72
3.3. Études d'efficacité	73
4. Recherche de marqueurs prédictifs	74
Résultats	74
1. Caractérisation des modèles	74
1.1. RPPA	74
1.2. Western blot.....	75
2. Évaluation du bévacizumab sur les modèles de mélanomes uvéaux	79
2.1. Étude de toxicité du bévacizumab.....	79
2.2. Étude d'efficacité du bévacizumab	80
3. Recherche de marqueurs prédictifs	82
Discussion	85
Perspectives	88
Bibliographie	101

Liste des figures

Figure 1: Schémas en coupe du globe oculaire humain	12
Figure 2: Amplification du gène N-myc et pronostic du neuroblastome pédiatrique.	16
Figure 3: Formation de chapeaux de mélanine sur des kératinocytes.....	19
Figure 4: Complexe multiprotéique composé de BRAC1, BRCA2 et leurs partenaires.	20
Figure 5: Mécanisme de la signalisation cellulaire.	22
Figure 6: Incidence des principaux cancers solides en fonction de l'âge.....	24
Figure 8: Statut mutationnel de p53 et la réponse aux rayons X.....	29
Figure 9: Effet des allèles mutés de <i>p53</i> sur une ligné de souris.....	30
Figure 10: Organisation chaotique de la vascularisation associée à la tumeur.	31
Figure 11: Recrutement de capillaires par une tumeur implantée.....	32
Figure 12: Réversibilité de la transition épithélio-mésenchymateuse.....	35
Figure 13: Principales voies de signalisation cellulaires impliquées dans le mélanome uvéal	56
Figure 14: Représentation simplifiée de l'ensemble des voies mises en jeu dans le mélanome uvéal	57
Figure 15: Voies de signalisation cellulaires candidates aux essais thérapeutiques ciblés.	59
Figure 16: Les différentes étapes de préparation et de validation d'un modèle de PDX.....	61
Figure 18: Mise en évidence de l'expression de la protéine GAPDH	76
Figure 19: Mise en évidence de la protéine Bcl-xL par western blot.....	77
Figure 20: Résultat de l'analyse Multigauge pour la protéine Bcl-xL.....	78
Figure 23: Effet du bevacizumab sur l'inhibition de la croissance tumorale des modèles MP34, MP41, MP46 et MP55.....	80

Liste des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des résultats RPPA.....	70
Tableau 2 : Comparaison des résultats RPPA et Western Blot.....	74

Liste des annexes

Annexe 1 : Chimiothérapies cytotoxiques.....	97
Annexe 2 : Hormonothérapies.....	100
Annexe 3 : Thérapies ciblées.....	101
Annexe 4 : Immunothérapies.....	103
Annexe 5 : Protéines étudiées par les techniques western blot et RPPA.....	104
Annexe 6 : Gènes testés en qPCR pour la recherche de marqueurs prédictifs.....	105

Liste des abréviations

5-FU : 5 fluorouracil
ADCC : cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps
AMM : autorisation de mise sur le marché
BAP1 : protéine associée à BRCA1
BCR : récepteur des cellules B
BER : réparation par excision de bases
BSA : bovine serum albumin
CDC : cytotoxicité dépendante du complément
CDD : récepteurs à transferts de charge
CFU-E : Colony Forming Unit-Erythroid
CLCC : centre de lutte contre le cancer
CTLA4 : récepteur 4 des protéines associées aux lymphocytes T cytotoxiques
DDPP : direction départementale de protection des populations
DHFR : dihydrofolate réductase
DO : densité optique
DTT : dithiothreitol
ECL : amplification de la chémiluminescence
EDTA : éthylène diamine tétra-acétique
EFS : Survie sans maladie
EMT : transition épithélio-mésenchymateuse
EOPS : exempté d'organismes pathogènes spécifiques
EPO : érythropoïétine
FISH : hybridation in situ en fluorescence
GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
HER2 : récepteur 2 des facteurs de croissances humains
HPV : papillomavirus
HR : recombinaison homologue
HRE : élément de réponse hormonale
HRP : horseradish peroxidase
INCa : institut national du cancer
InVS : institut de veille sanitaire
ITK : inhibiteur de tyrosines kinases
ITMO : institut multi-organismes cancer
LCR : liquide céphalorachidien
LH : hormone lutéinisante
LH-RH : libération hormonale de l'hormone lutéinisante
LMC : leucémie myéloïde chronique
MAPK : Mitogen Activated Protein kinase
MDR : multi drug resistance
MEC : matrice extracellulaire
MET : transition mésenchymo-épithéliale
MMP : métalloprotéase
MP : mélanome primaire
MSC : cellules myélosuppressives
mTOR : Mammalian Target of Rapamycine
NER : réparation par excision de nucléotides
NHEJ : non homologous end joining
NK : natural killer

PCR : réaction de polymérisation en chaîne
PDX : xéno greffe dérivée de patient
Pi3K : Phosphatidylinositol-3-kinase
Prkdcsid : protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide
PSA : antigène spécifique de la prostate
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
R-CHOP : Rituximab-Cyclophosphamide hydroxyadriamycine Oncovin® prednisolone
RCP : réunion de concertation pluridisciplinaire
ROS : espèce oxygénée réactive
RPPA : puces protéiques en phase inverse
RTV : volume tumoral relatif
SCID : immunodéficience sévère combinée
SDS : dodécylsulfate de sodium
SF3B1 : splicing factor 3 subunit 1
TAM : macrophage associé aux tumeurs
TBS : Tris-buffered saline
TCR : récepteur des cellules T
TGD : délai de croissance tumorale
TGI : inhibition de la croissance tumorale
THF : tétrahydrofolate
TIL : lymphocytes infiltrés dans les tumeurs
UM : mélanome uvéal
uPA : urokinase activatrice du plasminogène
uPAR : récepteur de l'urokinase activatrice du plasminogène
VDJ : gènes Variables de Diversité et de Jonction des immunoglobulines
VEGF : vascular endothelial growth factor
VEGFR : vascular endothelial growth factor receptor

Introduction

Le cancer est une maladie grave caractérisée par des anomalies de la prolifération et de la communication cellulaire. Son incidence de 350 000 nouveaux cas par an en France tous cancers confondus en fait un enjeu de santé publique. La lutte contre ce fléau de l'humanité est l'une des priorités du ministère de la santé en France qui en est à la mise en place de son troisième plan cancer depuis 2003. Le dernier plan cancer (2014 – 2019) se divise en trois axes principaux. Le premier axe est de guérir plus de personnes malades grâce à l'amélioration de l'efficacité du dépistage et de l'imagerie, à la mise en place de recommandations destinées aux professionnels de santé sur l'utilisation des chimiothérapies orales indispensables à l'établissement de traitements ambulatoires ou encore la facilitation d'accès aux essais cliniques pour les patients en situation d'échec thérapeutique. Le second axe de ce plan cancer est de préserver la continuité et la qualité de la vie. Cet axe concerne les enjeux médico-économiques de la prise en charge des cancers. Le troisième axe est l'investissement dans la prévention et la recherche. Cet axe passe par l'augmentation du nombre d'essais cliniques, l'amélioration de l'articulation entre les différents cancéropôles et le financement de la recherche fondamentale en 2014 à hauteur de 44 millions d'euros grâce à des appels à projets de l'Institut National du Cancer (INCa) et l'Institut Multi-Organismes cancer (ITMO cancer).

La mise en place de l'ensemble de ces mesures est particulièrement observée dans les centres de lutte contre le cancer (CLCC) comme l'Institut Gustave Roussy ou l'Institut Curie à Paris. Ces centres sont composés d'un pôle de recherche très actif dans les différents domaines de la cancérologie juxtaposé (sur le même site) à un hôpital spécialisé en cancérologie. Ainsi l'échange d'informations entre chercheurs et professionnels de santé est largement optimisé, ce qui facilite la mise en place de projets thérapeutiques innovants. La discipline à la jonction entre le milieu médical et la recherche biomédicale est appelée « recherche translationnelle ». Ce type de département de recherche exploite pleinement l'organisation des centres de lutte contre le cancer en transformant des données fondamentales en données médicales exploitables par les soignants. Il s'agit de véritables passerelles entre la médecine et la recherche. C'est au cœur du département de recherche translationnelle de l'institut Curie de Paris que les travaux décrits au cours de cette thèse se sont déroulés. Cette dernière s'intitule « Recherche de biomarqueurs prédictifs du mélanome de l'uvée dans le but d'une thérapie ciblée anti-cancéreuse : étude à partir de xénogreffes dérivées de patients ».

Le cancer étudié dans cette étude se déclare sous la forme d'une tumeur primitive localisée au niveau de l'œil. Dans un premier temps, une description anatomique et fonctionnelle de l'œil sera développée afin de mieux situer le sujet. Après avoir décrit le contexte anatomique, la biologie du cancer sera abordée et détaillée pour mettre en évidence certains éléments déterminants pour la genèse d'une tumeur nécessaires à l'appréhension du sujet.

Ces deux premiers chapitres seront suivis des différents traitements existants pour lutter contre cette pathologie. Une fois ces généralités établies, seront présentés le mélanome uvéal, cancer étudié au cours de l'étude préclinique, et la notion de xénogreffe utilisée au cours de cette étude.

Ce n'est qu'après avoir pris conscience de l'ensemble de ces éléments que sera exposée l'étude préclinique sur la recherche de nouvelles cibles protéiques ainsi que sur l'évaluation de la toxicité et de l'efficacité du bévacizumab. Sur la base de ces travaux, la mise en place d'une signature minimum prédictive de réponse à ce traitement dans le mélanome uvéal sera présentée.

1. Description de l'œil

L'œil est l'un des cinq organes de sens du corps humain ; c'est l'organe de la vue. Sa fonction est de transformer l'information lumineuse en influx nerveux transmis au cerveau. L'anatomie de l'œil se divise en deux parties principales avec d'une part le globe oculaire et d'autre part ses annexes (les muscles extra-oculaires, les nerfs, la paupière, le système lacrymal et l'orbite). Nous nous intéresserons ici uniquement à l'anatomie du globe oculaire. Cette zone se présente sous une forme sensiblement sphérique composée de plusieurs sous-unités appelées aussi tuniques ayant chacune des caractéristiques et des rôles spécifiques. La figure 1 ci-dessous est une illustration du globe oculaire.

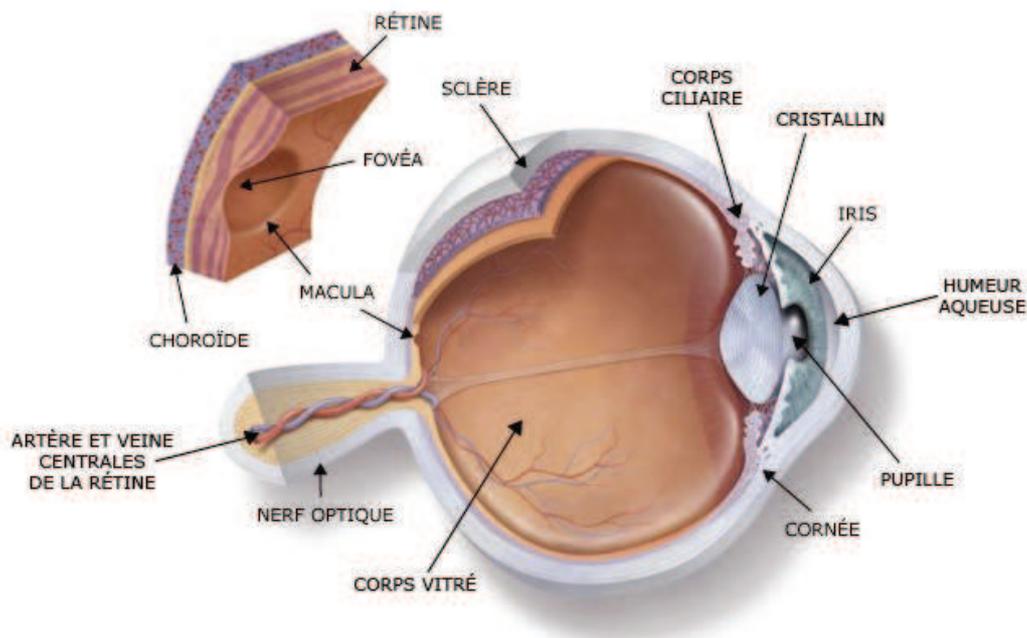


Figure 1: Schémas en coupe du globe oculaire humain¹

1.1. La tunique protectrice

Cette tunique comprend deux parties dont la cornée et la sclérotique ou sclère selon la localisation. Elles sont résistantes, épaisses et constituées de fibres de collagène. La cornée est transparente tandis que la sclère est opaque. La sclère est la plus externe des tuniques du globe oculaire. Fibreuse et inextensible, c'est la plus solide et la plus résistante des membranes de l'œil et en assure ainsi la protection. La cornée reçoit une innervation sensitive importante à partir des branches des nerfs ciliaires².

1.2. La tunique vascularisée

La tunique vascularisée, aussi appelée « uvée », comprend trois parties : l'iris, le corps ciliaire et la choroïde du plus antérieur au plus postérieur. Ces dernières sont composées notamment de mélanocytes. Cette tunique est la partie la plus vascularisée du globe oculaire. L'iris est la partie la plus antérieure de l'uvée, faisant suite au corps ciliaire. L'iris est une membrane en forme de disque constitué par un épithélium bistratifié pigmentaire qui va lui donner sa couleur. Elle est perforée en son centre d'un orifice circulaire, la pupille, qui se comporte comme un véritable diaphragme d'ouverture variable réagissant automatiquement selon l'intensité lumineuse.

Comme tous les segments de l'uvée, l'iris possède une riche vascularisation. Le corps ciliaire correspond à la partie intermédiaire de l'uvée. Il joue un rôle fondamental dans l'accommodation et la sécrétion de l'humeur aqueuse. La choroïde correspond précisément à la partie anatomique à partir de laquelle le mélanome uvéal va se développer. Ce cancer doit la mention « uvéal » de son nom à la tunique à laquelle appartient son tissu d'origine. En effet, la choroïde fait partie de l'uvée postérieure, riche en vaisseaux et nerfs et elle occupe les 2/3 postérieurs du globe situé entre la sclère et la rétine. La choroïde est, elle aussi, richement vascularisée et est appelée à ce titre « membrane nourricière de l'œil ». Cette vascularisation est constituée par les artères ciliaires courtes postérieures para-optiques (plaquées contre le nerf optique) et les artères ciliaires courtes postérieures distales (à distance du globe). Le passage des éléments du sang vers les tissus se produit au niveau du choriocapillaire qui est notamment responsable de l'alimentation de la rétine. Le sang appauvri est ensuite acheminé vers les veines vortiqueuses en périphérie de la choroïde².

1.3. La tunique visuelle

La couche la plus interne comprend la rétine et le nerf optique. La rétine est une membrane nerveuse hypersensible qui tapisse le fond de l'œil. Elle est traversée par un important réseau de veines et d'artères. Elle est composée de centaines de millions de cellules nerveuses : les cônes et les bâtonnets. Les cônes et les bâtonnets sont des cellules photoréceptrices. Le nerf optique permet la transmission des informations vers le cerveau. Toutes les fibres optiques issues des cellules visuelles convergent vers un point précis de la rétine : la papille. A cet endroit, débouche aussi le réseau vasculaire de la rétine. Les fibres optiques se rejoignent toutes là pour former le nerf optique².

1.4. Le contenu de la cavité interne

L'humeur aqueuse est un liquide transparent constamment renouvelé (toutes les 2 à 3 heures) responsable du maintien de la pression intra-oculaire. Elle est produite par les procès ciliaires et éliminée par le trabéculum. Le cristallin est une lentille biconvexe transparente et avasculaire. Le corps vitré est une masse gélatineuse claire et transparente capable d'amortir les chocs. Il représente 90% du volume de l'œil. C'est un tissu conjonctif transparent, entouré par une membrane appelée membrane hyaloïde. Il est formé de 95% d'eau².

2. Biologie du cancer

2.1. Présentation générale

Les organismes vivants se développent sur notre planète depuis plusieurs milliards d'années. Charles Darwin a proposé une théorie dans son ouvrage « *De l'origine des espèces* » paru en 1859 dans laquelle il décrit des liens phylogénétiques entre les différentes espèces vivantes. Cette théorie sera nommée « la théorie de l'évolution ». Selon cette dernière, les modifications de l'information génétique maintenues dans le temps par des phénomènes de pression de sélection sont responsables de la diversité du vivant que l'on observe aujourd'hui. Le vivant s'est adapté à son environnement au cours du temps grâce à des modifications génétiques qui lui ont conféré des caractéristiques favorables à sa survie. Les organismes les plus adaptés à leur milieu ont survécu alors que les moins adaptés se sont éteints. L'Homme se trouve aujourd'hui au sommet de l'évolution dans le règne animal.

La cellule représente l'unité structurale de base de notre organisme qui est composé d'environ un million de milliards de ces dernières. Les cellules sont organisées en tissus de manière à remplir des fonctions collectives diverses. Les cellules composant les différents tissus de notre organisme sont d'une extraordinaire diversité héritée de milliards d'années de remaniements génétiques.

Chez les eucaryotes, l'information génétique qui régit les caractéristiques et l'activité de la cellule est constituée par l'ADN que l'on retrouve dans un noyau cellulaire. L'ADN humain est une molécule de très grande taille que l'on retrouve dans un état de condensation extrême et organisée en 23 paires de chromosomes dont 23 d'entre eux sont hérités du père et 23 autres sont hérités de la mère. Les chromosomes sont composés de plusieurs régions (loci) contenant chacune des gènes différents. Les 23000 gènes qui composent notre génome possèdent plusieurs versions possibles appelées allèles. Le nombre infini de combinaisons potentielles d'allèles des différents gènes est en partie responsable de la diversité de notre espèce et de son pouvoir d'adaptation au cours du temps.

Les remaniements génétiques permettant la plasticité de notre génome ont été un atout collectif sur le long terme œuvrant pour l'adaptation de notre organisme à son environnement. Cependant, à l'échelle de l'individu, les modifications de l'information génétique peuvent être à la base de maladies dont le cancer.

En effet, une tumeur se développe à partir d'un tissu normal au sein duquel une cellule subit plusieurs modifications génétiques. Dans le cas où ces modifications se pérennisent, on observe une variation de l'information génétique de cette cellule par rapport à son état initial. Cette étape est appelée l'initiation du cancer et peut correspondre au point de départ d'une cascade de modifications du génome ayant pour conséquence l'altération du fonctionnement de gènes essentiels tels que ceux contrôlant la prolifération cellulaire. Les premières mutations sont majoritairement les conséquences des effets génotoxiques d'agents auxquels sont exposées les cellules dans leur environnement³. Certaines mutations peuvent aussi être transmises de façon héréditaire et initient la cascade de mutations. Il existe donc des formes héréditaires de plusieurs cancers tels que par exemple certains cancers du sein, du colon ou de la peau. Une fois l'étape d'initiation effectuée, on peut observer une étape de prolifération incontrôlée des cellules tumorales. Durant cette étape de prolifération, la tumeur devient hétérogène grâce à un processus de progression tumorale que l'on décrira par la suite.

Cette progression lui confèrera notamment l'immortalité et la capacité de former des métastases de manière à envahir de nouveaux tissus.

Le cancer est défini comme étant une maladie de la communication cellulaire et du contrôle de la prolifération dans un contexte d'instabilité génétique. Il représente la première cause de mortalité dans le monde et en France depuis les années 90. L'institut de veille sanitaire (InVS), chargé de la surveillance de l'état de santé des Français, a déclaré en Mai 2010 que le cancer (tous types confondus) était responsable de la mort d'environ 150 000 patients par an en France et que son incidence y était d'environ 350 000 nouveaux cas par an. Aujourd'hui, on sait qu'il existe différents mécanismes contribuant à l'établissement de cette pathologie. Je vais donc en développer plusieurs aspects afin de mieux cerner ce groupe de pathologies sur le plan biologique, ce qui nous servira de base de réflexion pour mieux appréhender les éléments de cette thèse.

2.2. Proto-oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs

La découverte des proto-oncogènes et des oncogènes provient de travaux de recherches s'intéressant aux mécanismes de prolifération cellulaire. Les protéines encodées par les proto-oncogènes participent à de nombreux niveaux à la réception cellulaire et à la transduction de signaux de croissance provenant de l'environnement extracellulaire. Lorsque ces gènes sont mutés, la libération de signaux stimulant la prolifération cellulaire est dérégulée. Cette prolifération dérégulée est parfois associée à la formation de cellules cancéreuses.

Les proto-oncogènes ont des rôles souvent indispensables au bon fonctionnement de la cellule mais une fois mutés, ces derniers deviennent des oncogènes⁴. Les mutations responsables du passage de proto-oncogènes vers oncogènes peuvent être des délétions, substitutions, amplifications géniques ou des réarrangements chromosomiques. Pour illustrer ce propos nous pouvons prendre pour exemple la translocation (9;22) provoquant la formation d'une protéine kinase BCR-ABL active constitutivement et responsable de la leucémie myéloïde chronique (LMC). On peut également s'intéresser à l'amplification du proto-oncogène *N-myc* qui est retrouvée dans environ 30% des neuroblastomes pédiatriques avancés et qui représente un critère de mauvais pronostic pour le patient⁵. La figure 2 ci-dessous nous montre que l'utilisation de l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) a révélé un grand nombre de copies du gène *N-myc* (en jaune) dans le neuroblastome pédiatrique.

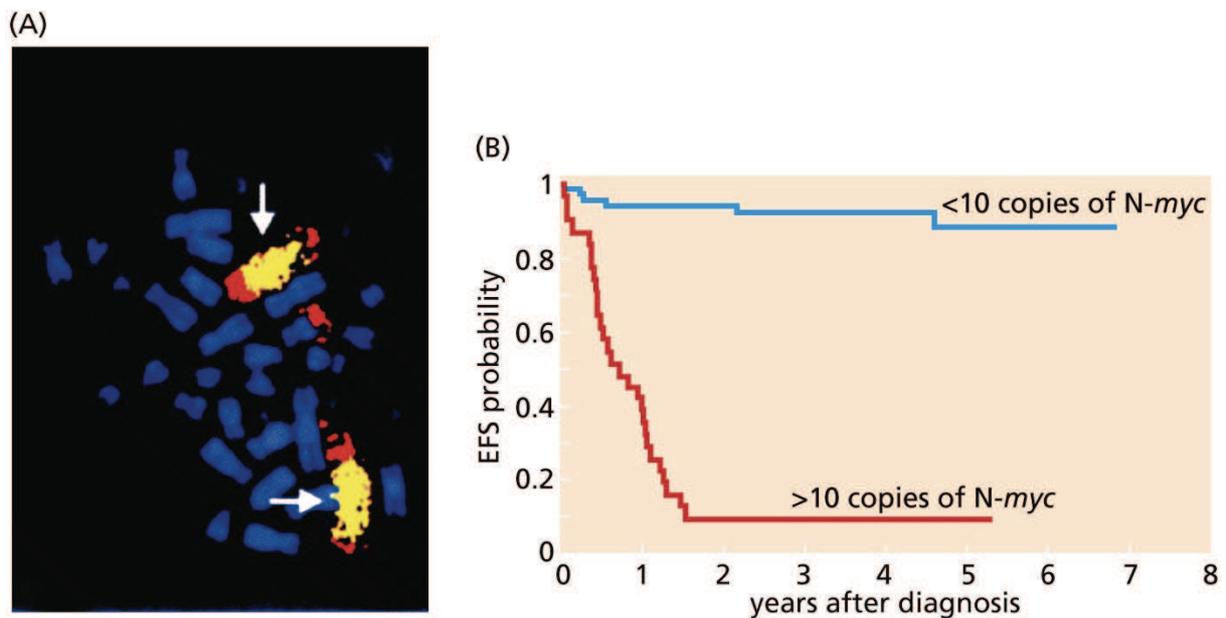


Figure 2: Amplification du gène *N-myc* et pronostic du neuroblastome pédiatrique⁵.

Le diagramme de Kaplan-Meier illustre la survie sans maladie (EFS) des enfants souffrant d'un neuroblastome en fonction du nombre de copies du gène *N-myc*. La figure montre clairement un pronostic favorable à sept ans pour les enfants ayant un nombre de copies du gène inférieur à dix alors que celui-ci est rapidement très défavorable pour les enfants ayant un nombre de copies du gène supérieur à dix.

Dans les années 70, l'accumulation des expérimentations a montré les limites des explications biologiques ne tenant uniquement compte des oncogènes et a permis de découvrir une seconde catégorie de gènes impliqués dans les cancers. Ces gènes ont un rôle de suppression de la prolifération cellulaire et sont appelés les gènes suppresseurs de tumeurs.

En effet, ces derniers sont capables de boquer le cycle cellulaire lorsqu'une anomalie est détectée. Le plus connu d'entre eux est *p53*. La protéine P53 active la transcription d'un grand nombre de gènes en se fixant, sous une forme tétramérique à un élément de réponse nucléaire présent soit dans le promoteur soit dans une séquence intronique de ces gènes. Les gènes ciblés par cette protéine sont impliqués notamment dans l'arrêt du cycle cellulaire (*p21*), la réparation de l'ADN (*GADD45*) ou encore l'induction de l'apoptose (*PUMA*, *Bax*)⁶. En fonction des altérations présentes au niveau de l'ADN, l'induction de *p53* va permettre un arrêt du cycle cellulaire et fournir à la cellule le temps de réparer son ADN avant l'entrée en phase S. Ce mécanisme assure la stabilité génétique et est lui-même régulé par la protéine MDM2. En cas de dommages trop importants sur le plan génétique, la protéine *p53* va induire l'apoptose permettant alors la mort de la cellule. Ce mécanisme permet d'empêcher la propagation des cellules contenant des altérations génétiques. Dans 50% des cancers on retrouve des mutations au niveau du gène *p53* qui ne peut alors plus effectuer son rôle⁵. Dans cette situation, le cycle cellulaire s'effectue sans interruption et les anomalies génétiques peuvent se propager grâce aux divisions cellulaires.

Les mutations qui touchent les gènes suppresseurs de tumeurs et qui aboutissent à des cancers sont des mutations ayant pour conséquence la perte de fonction des gènes mutés. On retrouve parmi ces mutations des mutations ponctuelles, des délétions et des méthylations (ou autres mécanismes épigénétiques⁷). La plupart du temps, il faut une combinaison de deux mutations (une sur chaque allèle d'un même gène) pour que le gène suppresseur de tumeur soit inactivé. En revanche les mutations qui touchent les proto-oncogènes et qui aboutissent à des cancers sont des mutations associées à des gains de fonctions des gènes mutés. L'altération d'un seul des deux allèles d'un proto-oncogène suffit pour le rendre oncogène.

La prédisposition génétique pour certains cancers peut être due à une mutation d'un gène suppresseur de tumeur héritée de l'un des parents. Dans ce cas de figure, l'individu n'a qu'un seul allèle valide. Une mutation de cet allèle valide au cours de la vie pourra être responsable du déclenchement d'un processus de prolifération cellulaire incontrôlée. Le patrimoine génétique hérité par cet individu lui confère une probabilité supérieure à la moyenne de développer un cancer. C'est ce phénomène que l'on appelle prédisposition génétique au cancer. Ce constat n'est pas retrouvé pour les proto-oncogènes car la mutation d'un seul allèle peut suffire à développer un cancer. Lorsque cette mutation est retrouvée chez l'embryon, on observe généralement une mort *in-utero*.

2.3. Intégrité du génome

La formation d'une tumeur humaine est issue d'un processus multi-étapes à partir duquel l'organisme va essayer de créer des stratégies de défense. L'une de ces stratégies de défense anti-cancéreuse est de maintenir la stabilité de la molécule d'ADN. La littérature qualifie cette méthode comme l'une des plus robustes pour la défense contre les cancers. En effet, ce maintien de stabilité peut avoir un rôle direct comme la restauration de l'activité initiale d'un proto-oncogène, mais peut également avoir un rôle indirect et ainsi permettre le bon fonctionnement d'autres types de mécanismes de défense eux-mêmes dépendant de différents gènes comme par exemple la compétence du réarrangement VDJ (gènes Variables, de Diversité et de Jonction des immunoglobulines) des lymphocytes.

La probabilité que l'ensemble des gènes codants pour ces moyens de défense soient mutés et non réparés, est extraordinairement faible. On sait que le génome est quotidiennement soumis à des agressions pouvant le modifier. Dans le but de conserver l'intégrité de l'information génétique, l'évolution a permis à l'organisme de développer des systèmes de réparations de l'ADN endommagé. Le type de mécanisme de réparation utilisé par la cellule diffère selon la nature de l'altération. Ces mécanismes ont plusieurs caractéristiques communes comme la reconnaissance des lésions, la réparation et la reconstitution de l'ADN à l'identique de la version originale. Les lésions peuvent être de nature simple brin, double brin ou pontage entre deux nucléotides d'un même brin ou deux nucléotides appartenant à des brins différents. Au cours de la vie normale d'une cellule, celle-ci va subir en moyenne 3000 à 4000 lésions oxydatives par jour. La plupart du temps, la cellule possède des enzymes dont les glycoxylases qui reconnaissent les bases anormales et sont capables de couper la liaison glycosidique pour les éliminer. On appelle ce système le « Base Excision Repair (BER)⁸ ». Parfois, la machinerie de réplication de l'ADN agit avant que le BER n'ait effectué son rôle de réparation, ce qui introduit une mutation ponctuelle à cet endroit du génome. Les lésions induites par les rayonnements ultraviolets du soleil sont réparées par un système appelé le « nucleotide excision repair (NER). Celui-ci digère un enchainement de nucléotides dans la zone lésée et permet à l'ADN polymérase et à la ligase de reconstruire le segment d'ADN manquant. Lorsque ce système n'est pas suffisamment efficace, on observe des maladies cancéreuses provoquées par le soleil comme par exemple le mélanome cutané. Si on s'intéresse de plus près à cet exemple, il faut savoir qu'au niveau de la peau, il existe différentes couches cellulaires ayant chacune des rôles distincts. Les mélanocytes ont pour rôle de synthétiser un pigment chromique appelé la mélanine.

Une fois ce pigment synthétisé, le mélanocyte doit le transférer directement dans les cellules cutanées les plus exposées aux rayonnements UV du soleil (notamment les UVB), c'est à dire les kératinocytes. Ce transfert se réalise par le biais de vésicules de transport appelées les mélanosomes. Cette opération se déroule dans la couche basale de l'épiderme⁵. L'objectif de ce pigment chromique sera ensuite de former un chapeau de protection à la surface des kératinocytes (figure 3 ci-dessous) afin de protéger son ADN des modifications induites par les rayonnements UV.

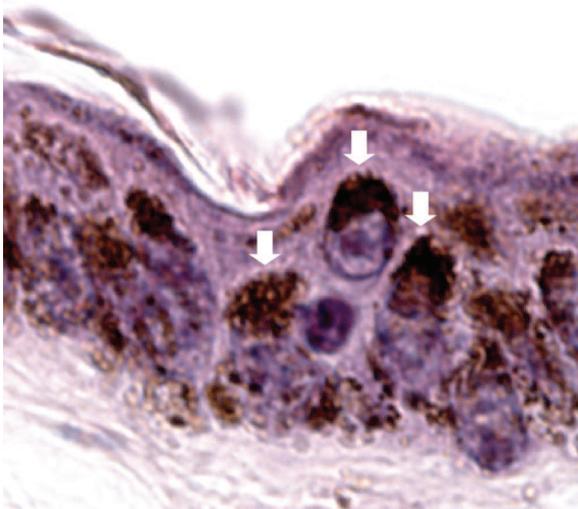


Figure 3: Formation de chapeaux de mélanine sur des kératinocytes⁵.

On a observé que les kératinocytes ne possédant pas de chapeaux efficaces montraient quatre fois plus de dommages de l'ADN que les autres. C'est ce nombre important de dommages de l'ADN des kératinocytes qui va saturer le mécanisme NER et qui sera responsable de la pérennisation de certaines mutations causées par les UV. C'est dans ce contexte que l'on peut voir apparaître des cas de mélanomes cutanés.

Les lésions doubles brins peuvent être causées par des éléments exogènes comme les radiations ionisantes ou les produits chimiques et des éléments endogènes comme les radicaux libres ou la mauvaise répllication de l'ADN. Il existe deux systèmes de réparation pour ce type de lésions. On a d'un côté la recombinaison homologue (HR) qui repère la cassure double brin de la molécule d'ADN. Des exonucléases digèrent une partie d'un brin d'ADN différent de chaque côté de la cassure double brin.

Grâce à l'activité d'un complexe multiprotéique illustré dans la figure 4 ci-dessous et constitué notamment de BRCA1, BRCA2, Rad50, de protéines checkpoint phase-S et de protéines checkpoint phase G2/M, la protéine RAD 51 va faire bouger l'ADN simple brin pour qu'il trouve sa séquence homologue au niveau de la chromatide sœur pour permettre la recombinaison. L'autre brin issu de la cassure peut se reconstruire grâce BRCA2 (ou RAD52) pour trouver sa chromatide sœur ou utiliser le brin réparé comme matrice pour se reconstruire. Le double brin initial est reformé et la double hélice sauvage se reforme elle aussi.

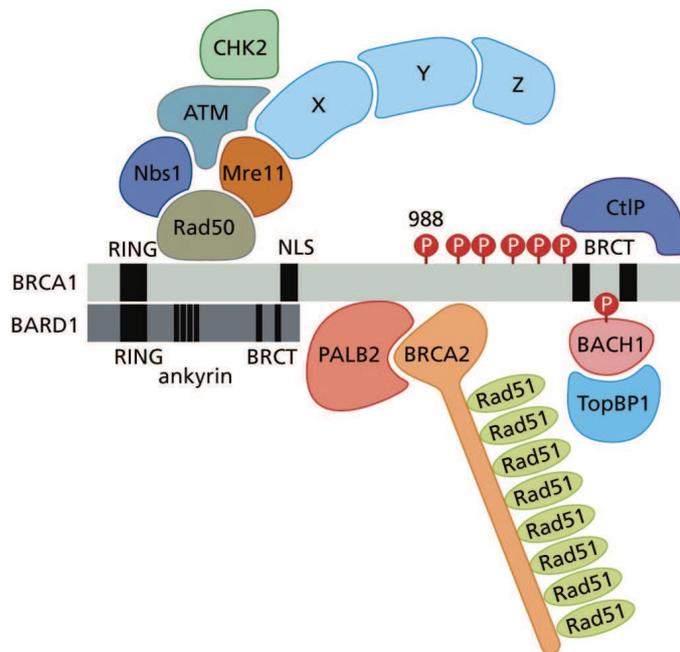


Figure 4: Complexe multiprotéique composé de BRCA1, BRCA2 et leurs partenaires⁵.

D'un autre côté on a la « non homologous end joining (NHEJ). Ce type de mécanisme est utilisé par l'organisme lorsque la chromatide sœur n'est pas disponible pour faire une recombinaison homologue. Dans ce cas aussi, des exonucléases digèrent une partie d'un brin d'ADN différent de chaque côté de la lésion cassure double brin⁹. Le code génétique est suffisamment redondant pour que les deux monobrins finissent par trouver une ou plusieurs séquences homologues sur l'autre brin et entament une recombinaison plus ou moins fiable. On assiste ensuite à la reconstruction de la double hélice¹⁰. Dans ce cas de figure, un certain nombre de paires de bases présentes à l'origine dans les séquences d'origine sont perdues. On peut donc dire que la NHEJ est une méthode de réparation de l'ADN utilisée en cas de cassure double brin moins performante que la recombinaison homologue sur sa capacité à restaurer les séquences initiales. On comprend alors pourquoi l'organisme utilise ce mécanisme en second recourt.

Les gènes *BRCA1* et *BRCA2* font parties des gènes les plus décrits et associés notamment aux carcinomes du sein et de l'ovaire. En effet, aujourd'hui on sait que 70 à 80% des cancers ovariens d'origines héréditaires sont causés par la transmission de mutations affectant la lignée germinale au niveau des gènes *BRCA1* ou *BRCA2*. Les protéines BRACA1 ou BRCA2 sont alors déficitaires et ne peuvent plus assurer la réparation de l'ADN par les mécanismes de recombinaisons homologues. Il existe un véritable équilibre entre les deux méthodes de réparation des cassures doubles brins où l'une doit prendre le relais de l'autre en cas de difficulté de cette dernière⁵.

Les éléments décrits ici ne sont pas exhaustifs et il existe d'autres systèmes de réparation de l'ADN plus complexes. Le fait est que dans les cancers, ces systèmes de réparation ne sont pas toujours fonctionnels et peuvent donc laisser des mutations génétiques devenir pérennes. Dans ces situations l'intégrité du génome n'est pas assurée. Si le cycle cellulaire n'est pas interrompu, grâce à un gène suppresseur de tumeur, la cellule dont le génome est altéré va proliférer. En fonction du type d'altération, la cellule peut être à la base d'une initiation ou d'une progression tumorale.

2.4. Signalisation cellulaire

La signalisation cellulaire est un système de communication qui coordonne les activités de la cellule. La capacité de ces dernières à percevoir les caractéristiques et les messages de leur environnement, ainsi qu'à organiser une réponse adaptée, est à la base de l'homéostasie tissulaire. Des dysfonctionnements dans le traitement de l'information cellulaire peuvent être responsables de maladies dont le cancer. Il existe de nombreuses voies de signalisations cellulaires qui sondent le milieu extracellulaire en utilisant des récepteurs localisés au niveau de la membrane plasmique. Ces récepteurs sont composés d'une partie extracellulaire capable de capter un ligand spécifique, d'une partie transmembranaire en hélice alpha et d'une partie intracellulaire responsable de la transduction du signal à l'intérieur de la cellule. Lorsque ces récepteurs sont activés par leurs ligands, ils vont être responsables de l'activation de messagers secondaires par phosphorylations sur des résidus sérine, thréonine ou tyrosine. Les différentes cibles touchées peuvent être à la base de cascades de réactions impliquant différents éléments cytoplasmiques jusqu'à ce que le message soit incorporé au niveau nucléaire. Une fois dans le noyau, les messagers vont activer des facteurs de transcriptions qui vont agir directement sur l'ADN (voir figure 5 ci-dessous) au niveau des sites qui leur sont dédiés. Ainsi, la cellule va pouvoir réagir rapidement aux variations paramétriques de son environnement grâce à une fine gestion du taux de transcription des différents gènes.

Cette gestion est très efficace car elle est en partie contrôlée par les éléments de l'environnement cellulaire. Il en résulte une adaptation rapide de la cellule à son environnement. De plus, à partir de cette transduction rapide de l'information, la cellule va pouvoir synthétiser d'autres facteurs de transcription pour que son comportement soit de plus en plus adapté à la situation.

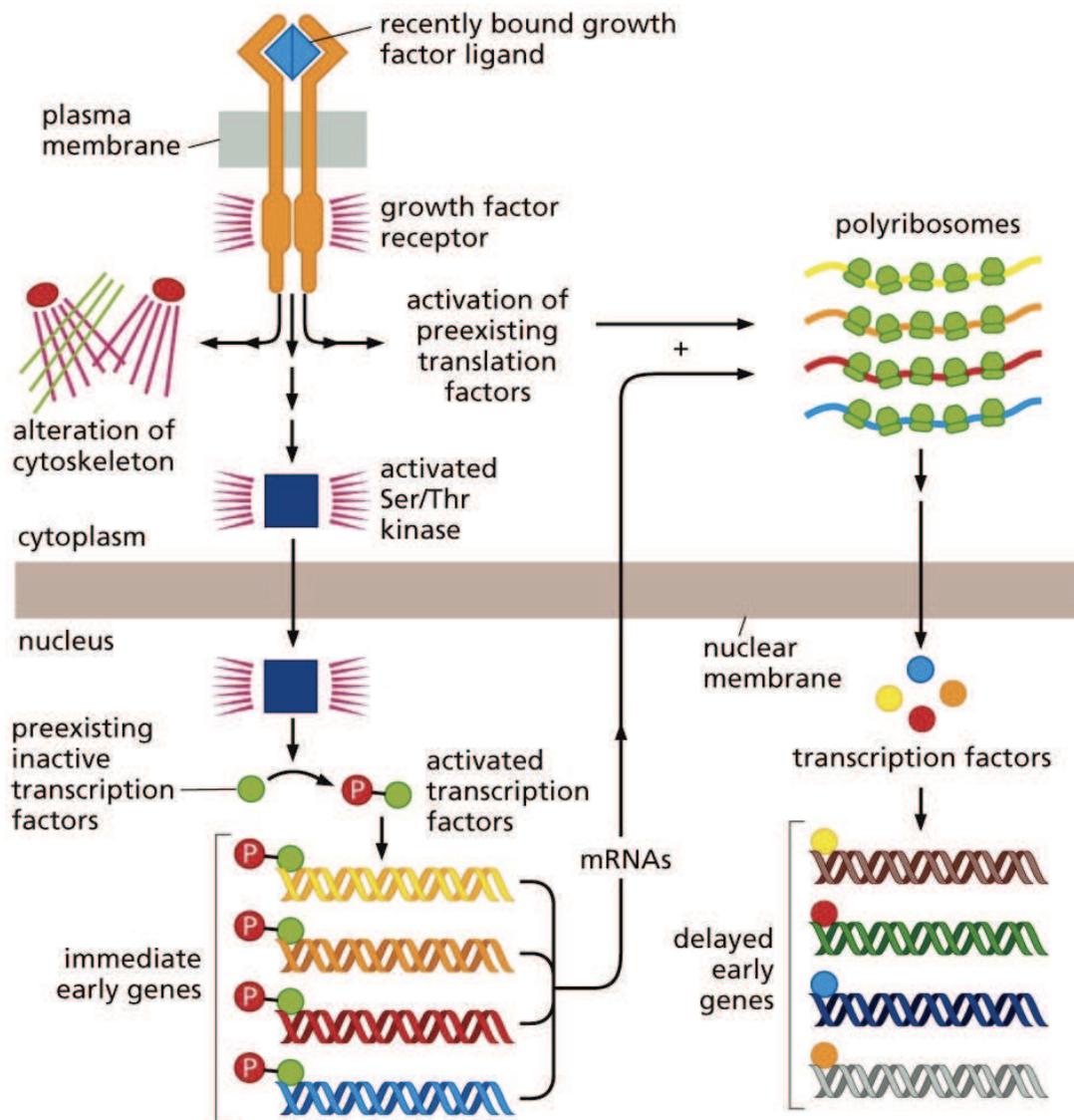


Figure 5: Mécanisme de la signalisation cellulaire⁵.

Ces voies de signalisations sont donc utilisées par les cellules normales comme par exemple les CFU-E (Colony Forming Unit-Erythroid) pour capter l'érythropoïétine (EPO) grâce aux récepteurs de l'EPO. Ainsi elles peuvent transduire un message de différenciation cellulaire jusqu'au stade érythrocyte en cas de libération d'EPO par les reins en situation d'hypoxie.

Dans le cadre du cancer on a observé de nombreuses voies de signalisations dont le fonctionnement normal est altéré par des mutations de gènes codants pour des éléments protéiques constituant ces voies. C'est notamment le cas des voies Phosphatidylinositol-3-kinase/AKT/Mammalian Target of Rapamycine (PI3K/AKT/mTOR) et Mitogen Activated Protein kinase (MAPK) sur lesquelles on va revenir dans la suite de cette thèse. Elles sont toutes deux impliquées dans les mécanismes de prolifération cellulaire et peuvent être, en situation pathologique, activées constitutivement à différents niveaux tout en échappant aux mécanismes de régulation.

Il résulte de cette situation, l'accumulation de messages de prolifération au niveau du noyau. Cela constitue un des éléments responsables de la prolifération incontrôlée de certaines cellules tumorales.

Il existe plusieurs voies de signalisations fréquemment altérées dans les tumeurs. On les retrouve impliquées dans des mécanismes divers de la genèse d'une tumeur aussi appelée la « tumorigenèse ».

2.5. Tumorigenèse

2.5.1. Progression tumorale

La première étape de la formation d'un cancer correspond à l'**initiation**. On peut voir derrière ce terme l'ensemble des mutations génétiques qui ont échappé aux mécanismes de réparation de l'ADN et qui sont devenues pérennes. Fort heureusement, toutes ces mutations ne vont pas être à la base de cancers. En effet, le processus de tumorigenèse est multi-étapes et nécessite un ensemble de circonstances hautement improbables pour se dérouler jusqu'au bout. Une fois l'initiation effectuée, l'étape qui va suivre est appelée la **progression tumorale**. Cette étape a deux objectifs. Le premier correspond à l'augmentation du nombre de cellules tumorales. Ce phénomène dépend de la prolifération cellulaire et de la demi-vie de ces cellules. Le second correspond quant à lui à la diversification cellulaire directement liée à l'acquisition de nouvelles caractéristiques. La tumeur en progression va donc évoluer pour devenir plus ou moins agressive. Il ne faut pas voir la progression tumorale uniquement comme une avancée vers un stade d'agressivité supérieur. L'agressivité peut également devenir inférieure. On a l'habitude de dire que la progression est un phénomène multi étapes permettant à un petit nombre de cellules cancéreuses peu différenciées, de devenir un ou plusieurs groupes de cellules cancéreuses hétérogènes et très différenciées. Ainsi ces groupes peuvent progresser jusqu'à un stade d'indépendance appelé « stade métastatique ».

En réalité, les métastases peuvent se former très tôt et se développer en parallèle de la tumeur primaire. D'autres métastases peuvent se créer à partir de métastases plus anciennes. On a même observé des métastases qui reviennent vers la tumeur primitive car le microenvironnement y est d'avantage propice à leur développement. Quoiqu'il en soit, la progression tumorale est un phénomène long et périlleux réussi par une proportion de cellules extrêmement faible. C'est précisément la lenteur de ce processus qui explique la rareté des tumeurs solides chez les enfants. Dans le cas où l'initiation a lieu pendant l'enfance, il faudra encore environ une dizaine d'années avant de voir apparaître la tumeur qui en découle comme présenté dans la figure 6 ci-dessous.

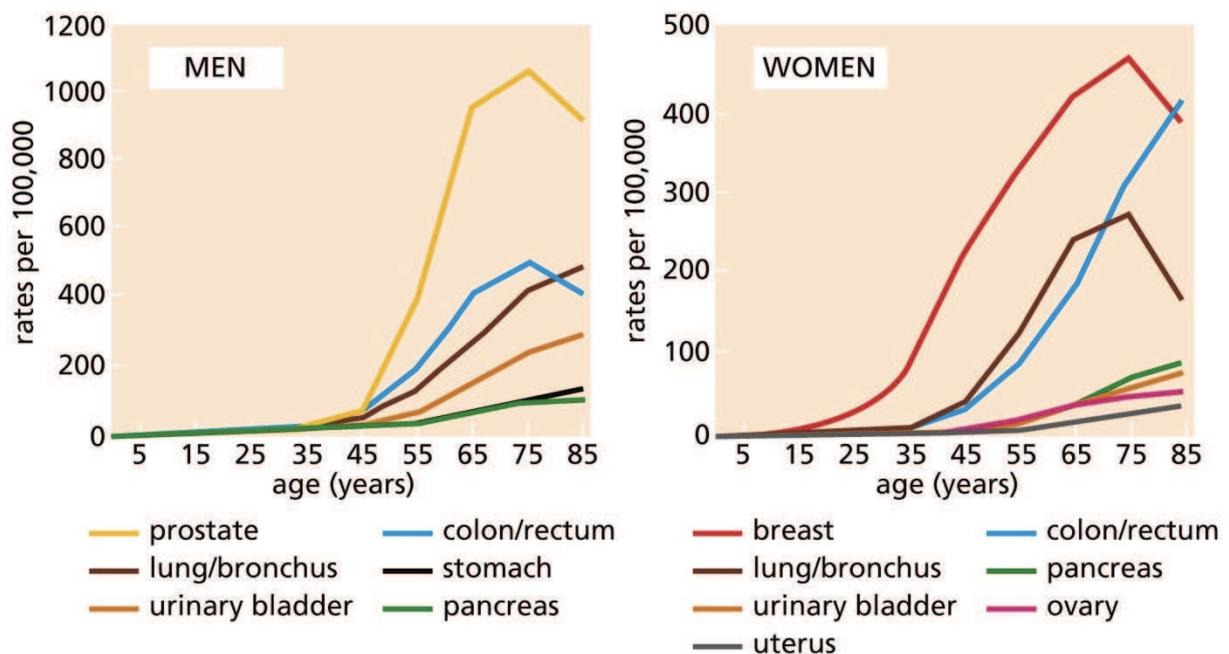


Figure 6: Incidence des principaux cancers solides en fonction de l'âge⁵.

On a cherché à déterminer la composante génétique de la progression tumorale en comparant le génome tumoral au génome du tissu sain et ainsi classer les tumeurs par leurs caractéristiques génétiques. La classification des cancers par organe est remise en cause car pour un même type de cancer, on peut observer jusqu'à un facteur 1000 du nombre de mutations comme le montre l'exemple du mélanome cutané¹¹. Il convient donc de s'intéresser au profil des mutations spécifiques par tumeur.

C'est à ce stade de compréhension du cancer que l'on peut introduire la notion de trajectoire génétique. Une trajectoire génétique est définie comme étant l'ensemble des modifications acquises par un génome en tenant compte de leur ordre d'apparition.

On a estimé qu'une trajectoire génétique était composée d'un très grand nombre modifications génomiques et qu'environ 1/6 des mutations était important pour la progression tumorale (Ce résultat ne prend pas en compte les modifications épigénétiques). Il est donc impossible de prévoir précisément la maladie et son évolution. À chaque modification, la cellule peut potentiellement devenir de plus en plus avantagée sur le plan sélectif. Cependant au bout d'un certain nombre de modifications, la cellule ne gagne plus beaucoup d'avantages sélectifs. La tumeur est très hétérogène mais à partir d'un certain stade de différenciation on peut s'interroger sur le véritable danger de cette hétérogénéité.

En termes d'évolution, la tumeur est un système fermé. Elle est donc exposée à des contraintes de type pression de sélection.

En effet, seules les cellules performantes vont survivre car l'espace est limité. Cette compétition est un véritable problème car les cellules sont globalement de plus en plus robustes à chaque génération. Pour imaginer ce propos, on peut comparer la tumeur à un arbre. Le tronc représente une mutation de base acquise par toutes les cellules. Ensuite, plus on monte vers les branches du haut, plus les mutations deviennent spécifiques à certaines cellules tumorales. Les cellules les plus tardives, comme les métastases dans de nombreux cas, ont donc en commun un certain nombre de caractéristiques avec la tumeur primitive. Cependant elles ont acquis d'autres caractéristiques qui peuvent les rendre encore plus malignes. On peut donc légitimement se poser la question du traitement à administrer. En effet, ce qui va être efficace pour lutter contre une partie des cellules de la tumeur primitive ne le sera pas forcément sur les métastases.

Toutes les mutations ne sont pas forcément responsables d'anomalies. On observe dans la population énormément d'allèles mutés qui n'ont pas de conséquence car il y a suffisamment de redondance dans le programme génétique pour que la cellule puisse s'adapter. Le problème peut venir de l'environnement cellulaire qui empêche les voies de secours de prendre le relais. Autrement dit, les cellules sont capables de coexister avec de nombreuses modifications, en revanche, ce qui est anodin pour une cellule dans un environnement donné ne l'est pas forcément pour une autre dans un environnement différent. Le rôle de l'environnement et notamment de l'inflammation est mis en avant avec les tumeurs pédiatriques qui ne possèdent, pour la plupart, pas un grand nombre de mutations (comme expliqué précédemment). C'est le microenvironnement mais aussi des éléments tels que l'épigénétique qui vont compenser ce manque de complexité génétique¹².

Il existe plus de 10^6 trajectoires génétiques possibles débouchant sur la formation d'une tumeur. Il est donc difficile de classer ces tumeurs sur leur progression tumorale. C'est dans ce contexte que Robert A. Weinberg a proposé les six grandes classes d'éléments perturbés permettant une progression tumorale efficace. Parmi ces éléments (illustrés dans la figure 7 ci-dessous) on retrouve les signaux de prolifération cellulaire, l'immunité vis à vis des facteurs suppresseurs de la croissance cellulaire, l'activation des processus de l'invasion métastatique, une capacité mitotique infini, l'induction de l'angiogenèse et enfin la résistance face aux mécanismes de mort cellulaire programmée.

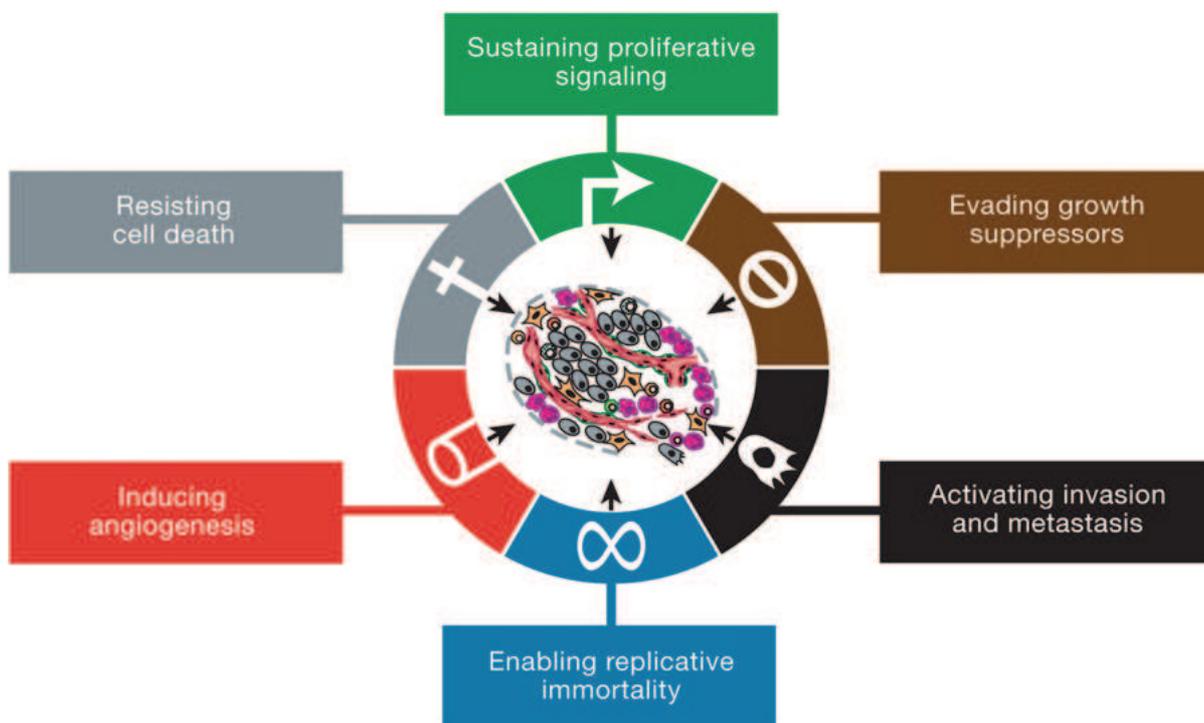


Figure 7 : The Hallmarks of cancer selon Weinberg⁵

Ces éléments sont depuis plusieurs années, à la base de nombreux travaux de recherche dans le monde sur la caractérisation et la classification des cancers.

2.5.2. Immortalisation cellulaire

Pour devenir maligne, une cellule cancéreuse doit au cours de sa progression, devenir immortelle. Chez une cellule normale, il existe un phénomène de vieillissement cellulaire. On observe un raccourcissement des chromosomes au niveau de leurs extrémités (télomères) à chaque division cellulaire. Lorsque les télomères deviennent trop courts, la cellule entre en senescence et des voies de signalisation s'activent et permettent le blocage du cycle cellulaire en phase G0.

Le nombre de mitoses effectuées par une cellule au cours de sa vie est donc limité à environ 50. Cependant chez les cellules tumorales on ne retrouve pas de raccourcissement des chromosomes. La cellule tumorale a donc un potentiel de mitoses infini, ce qui contribue à son immortalité.

Si on s'intéresse aux télomères on découvre qu'ils participent à l'architecture tridimensionnelle du noyau et qu'ils maintiennent l'intégrité structurale des chromosomes en évitant les fusions termino-terminales et en les protégeant de la dégradation enzymatique de type exonucléasique. Les télomères sont composés d'un grand nombre de répétitions de la séquence TTAGGG chez l'homme. La richesse en guanine de ce hexamère est largement conservée entre les différentes espèces.

On sait que physiologiquement certaines cellules ont besoin de vivre plus longtemps que les autres (cellules souches, lymphocytes mémoires, lignées germinales, cellules embryonnaires au stade précoce). Ces cellules utilisent donc une enzyme appelée la télomérase qui participe au maintien de la longueur des télomères. La télomérase est une reverse transcriptase portant un segment d'ARN comme matrice à la synthèse du brin d'ADN télomérique. Lors de la réplication de l'ADN, les amorces d'ARN nécessaire à l'ADN polymérase sont perdues laissant des extrémités 3'OH monobrin et un brin fils raccourci. Si aucun système ne compense cette perte de nucléotides sur le brin fils, alors celui-ci produira à la division suivante un brin fils encore plus court et ainsi de suite jusqu'à la perte des télomères et la mort de la cellule. La télomérase est donc utile pour allonger les extrémités 3'OH libre des deux brins parentaux et permettre à la suite d'ajouter les nucléotides complémentaires (donc riche en cytosine) sur le brin fils grâce à une amorce d'ARN produite par une primase, l'ADN polymérase et la ligase permettant de lier ce segment au dernier nucléotide en 3' du brin fils. La taille des télomères reste stable dans le temps et la cellule n'entre donc pas en sénescence. Les cellules tumorales ont détourné ce mécanisme à leur profit et n'entrent donc presque jamais en sénescence (90% des cas). Sur le plan moléculaire, la télomérase est composée d'une sous unité hTERT qui fixe l'ADN et d'une sous unité hTERC qui y fixe les nucléotides pour prolonger les télomères¹³. Les recherches actuelles montrent que dans les cancers, il y aurait des mutations dans le promoteur du gène *hTERT*¹⁴. Ces mutations provoqueraient la formation de séquences consensus qui activeraient constitutivement la télomérase .

2.5.3. Résistance à l'apoptose

L'apoptose correspond au processus de mort cellulaire programmée induite par un signal et peut être provoquée par deux grandes voies distinctes. D'un côté, il y a la voie extrinsèque qui fait intervenir des voies de signalisations cellulaires utilisant des récepteurs de la membrane plasmique comme Fas, Trail. Ce sont des récepteurs à domaines de mort qui permettent l'activation d'une cascade faisant intervenir notamment la caspase 8 et la caspase 3 de manière à initier l'apoptose. En observant Fas, on note que c'est un récepteur à domaines de mort impliqué dans la voie extrinsèque de l'apoptose. Son promoteur et le premier intron du gène *Fas* possèdent un site de fixation pour p53. L'induction du gène *Fas* peut se produire en réponse aux rayonnements ionisants et passera par l'intermédiaire d'un mécanisme faisant intervenir la protéine p53. En plus d'être un gène suppresseur de tumeur comme nous l'avons déjà décrit précédemment, *p53* est aussi un gène très largement impliqué dans l'apoptose. La voie extrinsèque est ainsi nommée car ce sont des éléments extracellulaires qui vont être à la base de l'apoptose en se fixant sur des récepteurs à domaines de mort. D'un autre côté, il y a la voie intrinsèque qui est caractérisée par la dépolarisation mitochondriale et la libération du cytochrome C dans l'espace intermitochondrial. Elle est finement régulée par des protéines membres de la famille Bcl-2 et permet l'activation de caspases effectrices de l'apoptose. Sur le plan mécanistique, on a mis en évidence qu'il y a un site de fixation pour p53 dans le promoteur des gènes *Puma* et *Noxa*¹⁵.

Puma et *Noxa* inhibent les inhibiteurs de l'apoptose de la famille de Bcl-2 (Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1, Bcl-w) et permettent donc de libérer la protéine Bax de la séquestration exercée par la protéine Bak. On a également mis en évidence un site de fixation pour p53 dans le promoteur du gène Bax. Une fois activé, Bax est une protéine clef de la voie intrinsèque de l'apoptose qui permet la fuite du cytochrome C en formant des pores dans la membrane mitochondriale. Le cytochrome C ainsi libéré dans le cytoplasme va activer la caspase 9, elle-même activant la caspase 3 qui sera responsable de l'initiation de l'apoptose. La voie intrinsèque de l'apoptose est un moyen pour la cellule de pouvoir induire sa propre mort en cas d'anomalie non réparable recensée. Cette voie est elle aussi sous le contrôle de la protéine p53. De plus, plusieurs études montrent que p53 a également un rôle dans l'apoptose indépendamment de son activité transcriptionnelle. Ces différents travaux suggèrent que p53 pourrait, en réponse à un stress, induire l'apoptose en interagissant avec certaines protéines de la famille de Bcl-2.

On sait que 50% des cancers montrent des mutations du gène codant pour p53. Les cellules qui survivent avec un ADN endommagé et dépourvues de p53 fonctionnelle peuvent poursuivre leur cycle cellulaire et se multiplier de façon anarchique pour ainsi aboutir à la formation de tumeur. Ce phénomène est appelé l'échappement à l'apoptose et est caractéristique de nombreux cancers. Observons la figure 8 suivante pour en être convaincu.

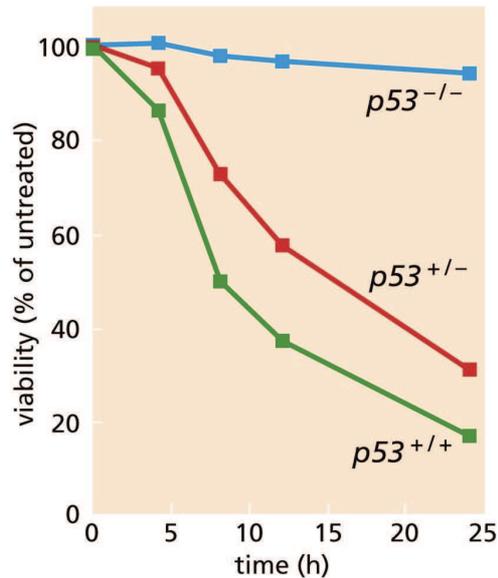


Figure 7: Statut mutationnel de p53 et la réponse aux rayons X⁵.

Le diagramme de Kaplan-Meier ci-dessus indique le pourcentage de viabilité cellulaire (en ordonnées) en fonction du temps.

Cette analyse est intéressante car elle compare ces paramètres pour des groupes de souris distincts élaborés à partir du statut mutationnel du gène *p53* de ces souris. Les cellules analysées ont toutes été exposées à la même quantité de rayons X. L'analyse de cette figure montre que les cellules ayant *p53* homozygote muté ont un pourcentage de viabilité proche de 100% à 25h alors qu'il est respectivement de 40% et 20% pour les cellules possédant un allèle *p53* hétérozygote muté et celles homozygotes sauvages. Ce résultat montre que pour des cellules ayant un statut non muté pour *p53*, le traitement par rayon X provoque suffisamment de lésions dans l'ADN pour que la cellule entre en apoptose. En revanche, ce même traitement est insuffisant pour provoquer le même résultat chez les cellules homozygotes mutées pour *p53*. Cette caractéristique les a donc rendues résistantes à l'apoptose. En poussant notre réflexion, on doit chercher à connaître les conséquences de cet échappement à l'apoptose. La figure 9 ci-dessous nous en propose une illustration.

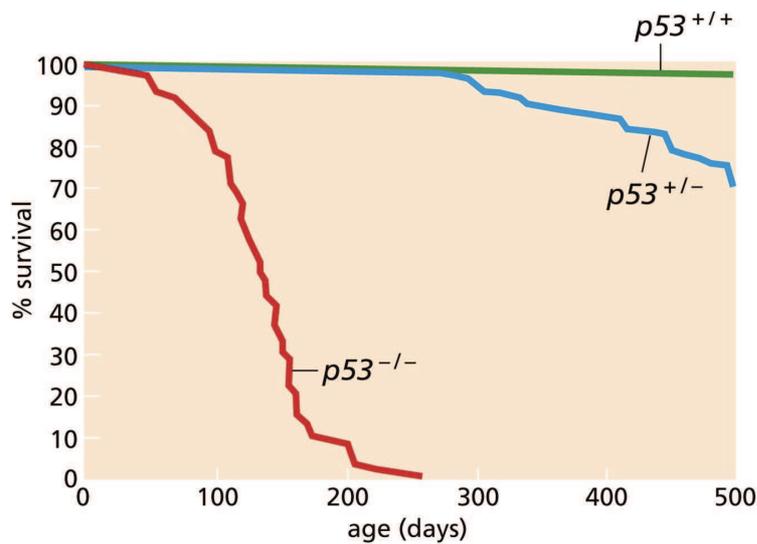


Figure 8: Effet des allèles mutés de *p53* sur une ligné de souris⁵.

Le diagramme de kaplan-Meier ci-dessus indique le pourcentage de survie (en ordonnées) en fonction du temps chez des souris. Cette analyse est intéressante car elle compare ces paramètres pour des groupes de souris distincts élaborés à partir du statut mutationnel du gène *p53* de ces souris. Lorsque *p53* est homozygote muté, toutes les souris sont décédées en 250 jours des suites de carcinomes et de leucémies. Lorsque qu'un seul des deux allèles est muté, les premiers décès sont visibles à partir de 250 jours. Enfin, dans le cas des souris homozygotes sauvages pour le gène *p53*, on n'observe pas de décès dans les 500 jours de l'expérience. Ces résultats montrent l'importance du rôle de *p53* et traduit les conséquences que peut engendrer l'échappement à l'apoptose.

2.5.4. Induction de l'angiogénèse

La néoangiogénèse correspond au processus complexe qui permet de faire de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants¹⁶. Ce processus est en général très précoce dans le développement du cancer. La figure 10 ci-dessous nous présente la structure quasiment anarchique de ces néo-vaisseaux.

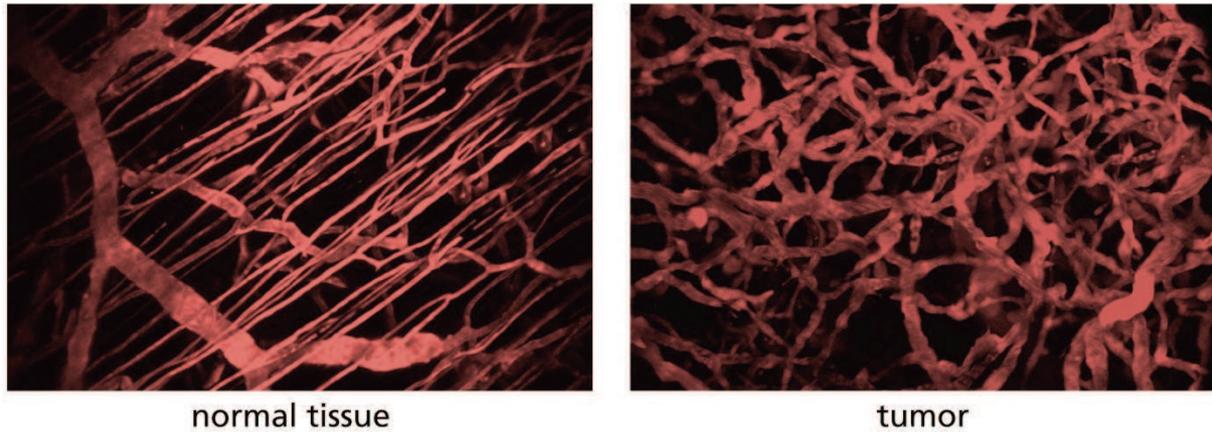


Figure 9: Organisation chaotique de la vascularisation associée à la tumeur⁵.

Pour comprendre, il faut savoir qu'il existe des cellules endothéliales qui possèdent des extensions cytoplasmiques appelées filipodes sur lesquelles on retrouve des récepteurs au VEGF (vascular endothelial growth factor). Ces récepteurs vont permettre à la cellule endothéliale de recevoir des informations de croissance vasculaire sous l'influence de la tumeur. C'est donc la tumeur qui envoie des stimuli capables de provoquer la néoangiogenèse à partir de cellules endothéliales saines¹⁷. Ces dernières vont ensuite devoir rompre la membrane basale pour pouvoir proliférer. Le récepteur TIE2 est un récepteur transmembranaire couplé aux protéines G qui peut être activé par la fixation de l'angiopoïétine 2 sur son domaine extracellulaire. Son activation permet dans ce cas de figure, la migration à la surface cellulaire du récepteur VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) ainsi capable d'être activé par le VEGF extracellulaire. Il faut savoir qu'il existe plusieurs isoformes de VEGF et de VEGFR qui se fixent préférentiellement les unes aux autres. On sait par ailleurs que le VEGF-A et le VEGF-B sont plutôt responsables de l'angiogenèse, alors que le VEGF-C et le VEGF-D sont plutôt responsables de la lymphogenèse. Le VEGF est sécrété de façon autocrine par les cellules endothéliales et paracrine par les cellules tumorales. Il est essentiellement produit dans des situations d'hypoxie ou par stimulation oncogénique. En cas d'hypoxie, les facteurs HIF1 α et HIF1 β sont synthétisés par la cellule et vont activer le promoteur de transcription appelé Élément de réponse hormonale (HRE) lui-même responsable de la transcription du gène codant pour le VEGF. La tumeur en pleine croissance a besoin de toujours plus de nutriments et d'oxygène.

Elle utilise donc entre autre cette voie de signalisation pour activer la néoangiogenèse. La rupture de la membrane basale vasculaire est une autre conséquence à l'activation de cellules endothéliales par le VEGF. Cette rupture est nécessaire pour que les néo-vaisseaux puissent se former.

Au moment de l'activation de la cellule endothéliale par le VEGF, celle-ci libère dans son environnement une enzyme appelée urokinase activatrice du plasminogène (uPA). Cette enzyme va se fixer sur son récepteur (uPAR) situé à la surface des cellules endothéliales elles-mêmes et ainsi permettre le clivage d'une protéine appelée plasminogène pour le transformer en plasmine. Le plasmine est alors responsable de l'activation de métalloprotéases (qui seront décrites dans le chapitre invasion métastatique). De plus, grâce à l'action d'alpha et de bêta intégrines, les cellules endothéliales activées sont proches de la matrice extracellulaire (MEC) et vont donc la dégrader par libération de métalloprotéases activées. Grâce à la destruction locale de la MEC et à la prolifération des cellules endothéliales, on observe la formation de néo-vaisseaux capable d'irriguer la tumeur. Ces vaisseaux pourront ensuite être utilisés pour la dissémination métastatique de la tumeur.

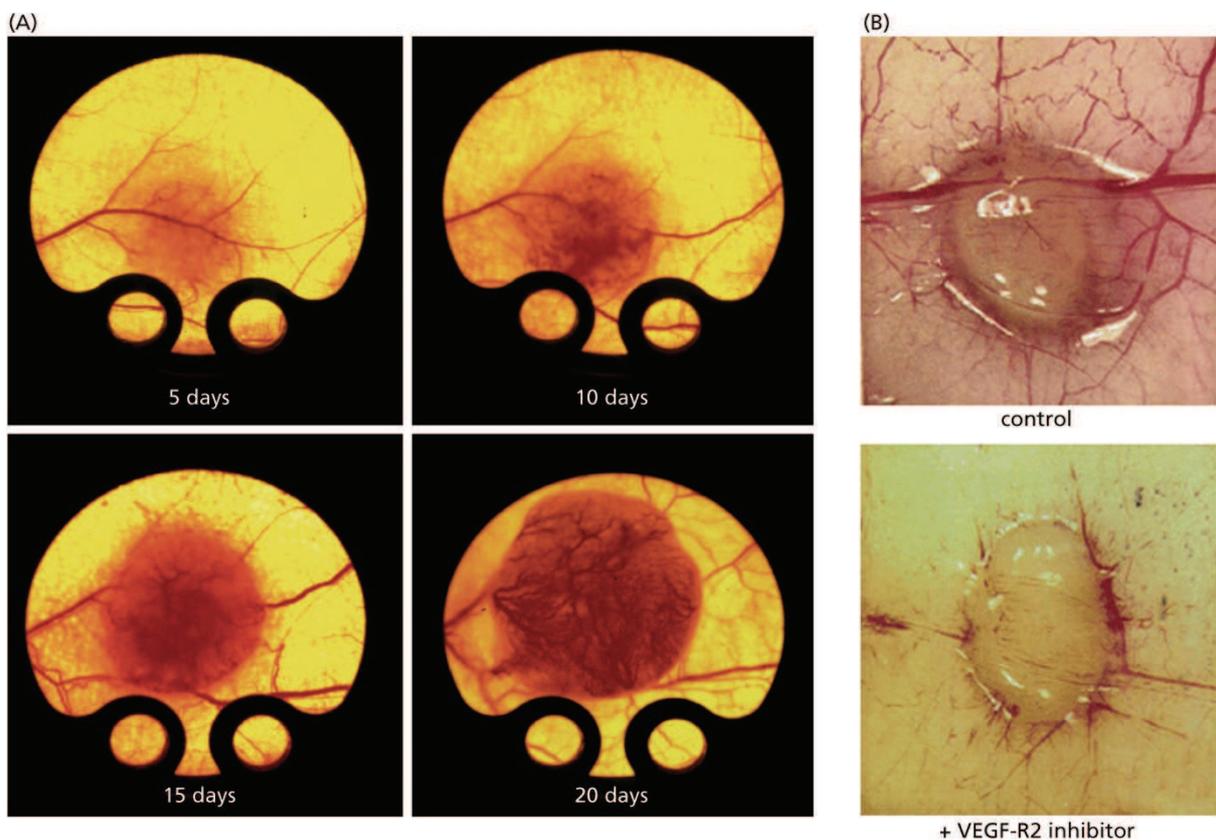


Figure 10: Recrutement de capillaires par une tumeur implantée⁵.

La figure 11 ci-dessus montre l'évolution de la néovascularisation sur une période de 15 jours dans le cas d'un adénocarcinome colorectal humain implanté par voie sous-cutanée sur un hôte murin. La figure B montre l'effet d'un inhibiteur de VEGF-R2 sur la vascularisation de cette tumeur.

En comparant le contrôle au traité, il apparaît clair que la suppression de la signalisation cellulaire utilisant VEGF-R2 suffit à stopper la vascularisation. Certaines thérapies anticancéreuses s'inspirent de ce mécanisme. Il existe donc des molécules capables d'activer ou d'inhiber la formation de vaisseaux sanguins. Dans le cas des cancers richement vascularisés cet équilibre est souvent rompu et favorise les facteurs pro-angiogéniques. Cependant il est nécessaire de relativiser ces propos car il existe aussi des tumeurs très peu vascularisées comme le cas d'ostéosarcomes qui arrivent à se développer sans néoangiogenèse intense.

2.5.5. Invasion métastatique

Les métastases sont des cellules tumorales qui se détachent de la tumeur primitive pour aller coloniser d'autres organes. Pour se faire, les cellules métastatiques doivent se déplacer et peuvent utiliser différents compartiments de dissémination comme le sang, la lymphe, les nerfs, la moelle osseuse ou encore de liquide céphalorachidien (LCR). Les déplacements cellulaires peuvent être de deux types. Il y a d'une part la migration cellulaire qui est une locomotion en deux dimensions et qui est utilisée lors de la régénération épithéliale par exemple. D'autre part il existe l'invasion, qui est un mode de locomotion en trois dimensions dans l'environnement et qui implique la dégradation de la MEC appelée la protrusion. Les métastases utilisent ce dernier mode de locomotion pour se désengager de la tumeur primitive. L'invasion peut être effectuée par des cellules seules. On parle alors d'invasion individuelle. Dans le cas où la tumeur primitive est un carcinome, la cellule tumorale épithéliale va devoir se transformer en cellule mésenchymateuse pour se déplacer. Ce processus est appelé la transition épithélio-mésenchymateuse¹⁸ (EMT) et est contrôlé par des facteurs de transcription (Snail/Twist). A ce moment-là, les intégrines à l'avant de la cellule sont engagées dans des interactions avec la MEC. Grâce à l'activité de différentes protéines (intégrines, RhoA/ROCK, Rac1, myosine) on observe un déplacement cellulaire par traction. Il existe également un mode d'invasion tumoral par déplacement amœboïdien. C'est un mode de locomotion utilisé par les lymphocytes basé sur la propulsion depuis l'arrière de la cellule. La propulsion est gérée par la voie de signalisation cellulaire Rho/ROCK qui active la contraction de l'actomyosine.

C'est la protéine Rac1 qui contrôle la direction. Les intégrines n'interviennent pas dans ce mode d'invasion. On observe aussi des invasions collectives par des groupes de cellules maintenues entre elles par des cadhérines.

Le groupe de cellules va se polariser pour former une structure supracellulaire avec à l'avant les cellules « Leaders » et à l'arrière les cellules « Followers ». Les leaders sont impliqués dans la détection du microenvironnement, le chimiotactisme, la destruction et le remodelage de la MEC. Le remodelage de la MEC sera ensuite reconnu par les Followers. Les Leaders utilisent la polymérisation de l'actine dirigée par la protéine Rac1 pour orienter le déplacement. Ces dernières ne sont pas forcément des cellules tumorales. En effet on y observe régulièrement des fibroblastes et ces derniers augmentent même l'efficacité de l'invasion. L'interaction hétérotypique entre fibroblastes et cellules tumorales est donc importante pour ce mode d'invasion. Les Followers sont plus passives dans l'invasion. En revanche elles sont tout de même impliquées dans la dégradation et le remodelage de la MEC. Ainsi, chaque Follower élargit la MEC pour le passage des suivants. Il y a donc une réelle coopération entre les Leaders et les Followers pour le déplacement de la cohorte de cellules. La dégradation de la MEC est assurée par une famille d'enzymes appelée métalloprotéases^{19,20} (MMP) possédant toutes un ion métallique dans leur structure. Ces MMP sont stockées dans des endosomes localisés au niveau des zones cellulaires directement en contact avec la MEC. Ces endosomes se déplacent grâce à des filaments d'actine polymérisée. Ces zones sont appelées les invadopodes et peuvent libérer la MT1-MMP responsable de la dégradation de la MEC. Ce mode de remodelage de la MEC est utilisé lors des déplacements collectifs et des déplacements mésenchymateux. En cas d'inactivation des MMP la cellule va utiliser un mode de déplacement amœboïdien. Pour finir, on observe parfois un autre mode de déplacement appelé le *multicellular streaming* dans lequel les cellules s'engouffrent dans les voies de faible résistance où la MEC y est lâche. Dans ce mode de déplacement il n'y a pas de protrusion et donc pas d'utilisation des métalloprotéases.

Au cours de leur migration, les cellules tumorales vont se retrouver dans différents microenvironnements et vont donc devoir adapter leur mode de locomotion²¹. On peut alors observer des migrations mésenchymateuses devenir amœboïdes et des migrations collectives devenir individuelles. L'invasion tumorale est donc un phénomène hétérogène et adaptatif qui va permettre aux métastases d'accéder à un compartiment de dissémination. On dit que les cellules qui entrent dans le compartiment de dissémination sont en intravasation et que celles qui en sortent pour coloniser un organe secondaire sont en extravasation.

C'est à ce moment que l'on peut observer la réversibilité de la transition épithélio-mésenchymateuse en transition mésenchymo-épithéliale. Ainsi la cellule cancéreuse quitte sa forme de transport pour réacquérir sa forme de colonisation épithéliale²² (voir figure 12 ci-dessous).

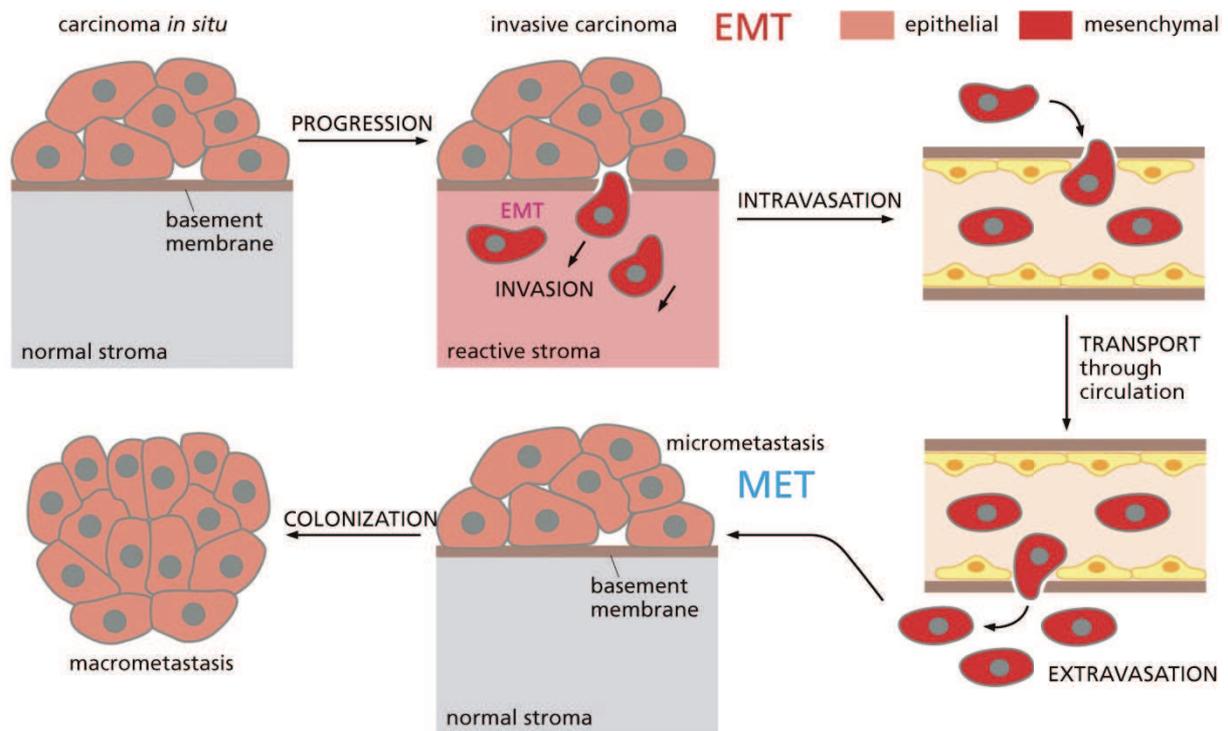


Figure 11: Réversibilité de la transition épithélio-mésenchymateuse⁵.

Au moment où elles arrivent dans leur nouvel environnement, elles ne vont pas toute survivre. En effet les cellules tumorales ne sont pas préparées à la circulation sanguine ni armées pour résister aux chocs contre les parois vasculaires ou aux attaques des cellules sanguines. Cependant, certaines vont réussir leur extravasation et se loger dans un tissu. La plus part du temps, elles restent en dormance sans se reproduire. Elles ne deviennent dangereuses que lorsqu'elles sortent de la dormance et qu'elles se mettent à proliférer pour coloniser l'organe. On a observé que 90% des décès par cancer le sont au stade métastatique. Le processus métastatique reste globalement très inefficace et l'agressivité d'une tumeur correspond à l'efficacité de ce processus. La localisation des métastases dépend en partie de l'origine histologique de la tumeur primitive mais aussi de la perméabilité des différentes barrières qu'elles devront franchir. En effet le tissu osseux est poreux et représente une cible facile pour l'implantation des métastases. Il en va de même pour l'endothélium pulmonaire et l'épithélium fenestré hépatique.

En revanche, la barrière hémato-encéphalique protège le cerveau d'un grand nombre d'assaillants. On retrouve malgré tout des métastases cérébrales dans plusieurs cancers.

2.6. Microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral est un des éléments majeurs des mécanismes d'échappement du cancer aux défenses naturelles de notre organisme. Ce microenvironnement est caractérisé par une composante cellulaire et une composante acellulaire. Au sein de la composante cellulaire, on retrouve notamment les fibroblastes. Ces derniers sont peu représentés au début du développement tumoral. Puis, au fur et à mesure de l'avancement de la maladie, la tumeur sécrète des chimiokines comme le $TGF\beta$ qui vont activer la formation de fibroblastes activés par le cancer²³ (CAF). Ces derniers sécrètent différents éléments qui participent à la protection de la tumeur vis à vis de la réponse immunitaire anti-tumorale. Les fibroblastes peuvent être présents dans la tumeur depuis le début ou être attirés vers la tumeur par chimiotactisme. Ils ont des propriétés immunosuppressives dues à la sécrétion d'interleukine 10 (IL10). Cette chimiokine (interleukine chimio-attractive) possède plusieurs fonctions comme l'inhibition des macrophages et des cellules dendritiques, le blocage de la mise en place de la réponse immune adaptative par les LT $CD8^+$, l'inhibition de la synthèse d'IL2, $INF\alpha$ et TNF par les LT $CD4^+$ et enfin la diminution de l'expression des molécules de CMH1 par les cellules tumorales.

En plus des CAF, au sein de la tumeur on trouve également différentes cellules immunitaires. On observe des macrophages de type M2 appelés les macrophages associés aux tumeurs (TAM). Ces macrophages jouent un rôle dans la tolérance immunitaire et dans la chimiorésistance. On observe également des cellules myelosuppressives (MSC) qui empêchent la prolifération des lymphocytes T naïfs, bloquent la fonction des LT effecteurs et Natural Killer (NK), induisent la différenciation des LTreg et stimulent l'EMT. On retrouve aussi les lymphocytes infiltrés dans les tumeurs (TIL) qui stimulent la différenciation des LT en LT $CD4^+$ et inhibent les LT $CD8^+$. On peut noter qu'il existe aussi des cellules dendritiques et des lymphocytes B dans les tumeurs alors que les NK sont cantonnées à la périphérie tumorale. Toutes les cellules du microenvironnement tumoral font partie d'un ensemble dont les différentes composantes s'activent les unes les autres et permettent la progression tumorale. La communication entre ces différentes composantes est permise par l'intermédiaire des cytokines, de micro-ARN ou encore de lipides (sphingosine1-P).

Ces éléments permettent même une communication à distance entre l'environnement tumoral et les futures niches métastatiques de manière à ce que ces dernières se préparent à recevoir les métastases.

Après avoir décrit la composante cellulaire du microenvironnement, on peut s'intéresser à ses composantes acellulaires. On y trouve en l'occurrence l'**inflammation**²⁴ dont la corrélation avec le cancer a été mise en évidence plusieurs fois avec le papillomavirus et le cancer du col de l'utérus, l'hépatite chronique et le cancer du foie ou encore la maladie de Crohn et le cancer du colon. Le rationnel biologique est basé sur l'infiltration leucocytaire au cours de l'inflammation qui va générer des espèces oxygénées réactives (ROS) capables de léser l'ADN. De plus le microenvironnement est pro-inflammatoire grâce à la sécrétion de nombreuses cytokines et chimiokines elles-mêmes pro-inflammatoires. La MEC est une autre composante acellulaire du microenvironnement tumoral. En effet, la MEC tumorale est plus dense qu'une MEC normale car les fibres de collagène y sont plus nombreuses et de nature différentes (MEC normal = collagène VI ; MEC tumorale = collagène I et III). Cette matrice est aussi moins élastique car il existe des liaisons covalentes entre les fibres de collagène qui la compose et l'élastine. En conséquence on observe donc une MEC dense et rigide hostile aux cellules extérieures. Les tumeurs sont tout de même capables de sécréter des protéases pour ouvrir des passages aux cellules endothéliales et ainsi favoriser l'arrivée de néo-vaisseaux eux-mêmes favorables à la dissémination métastatique. L'**hypoxie** est une autre composante acellulaire^{25,26}. En effet, la protéine HIF sécrétée en cas d'hypoxie est impliquée dans la synthèse du VEGF et donc de l'angiogenèse. L'**angiogenèse** est donc elle aussi une composante acellulaire car elle permet l'apport d'oxygène et de nutriments à la tumeur et aux cellules de son microenvironnement aussi appelées cellules stromales. Elle contribue également à la dissémination métastatique et au recrutement des éléments de la composante cellulaire⁵.

2.7. Concept de cellules souches tumorales

Dans la plus part des types tumoraux, on peut trouver des cellules plus ou moins matures. Il existerait des cellules si peu différenciées qu'on les qualifierait de « souches ». En réalité, ce sont des cellules tumorales immatures qui peuvent se différencier en cellules tumorales matures à tout moment²⁷. Il faut éviter de transposer ce que l'on connaît des cellules souches sur ce type de cellules tumorales. Cependant il faut reconnaître que les cellules souches normales et les cellules souches tumorales (aussi appelées cellules tumorigènes) possèdent des caractéristiques communes.

En effet, ces deux types cellulaires sont globalement résistants aux drogues soit grâce à un système de relargage, soit directement grâce à leur faible différenciation. Les thérapies ciblées n'ont par exemple aucun effet sur ces cellules.

On peut alors se dire qu'après un traitement anticancéreux visiblement efficace, il va rester les cellules tumorigènes capables de reformer à terme une nouvelle tumeur. Les cellules souches tumorales représentent actuellement une des pistes les plus sérieuses pour expliquer les rechutes de nombreux cancers après quelques années de rémission.

3. Thérapies pharmacologiques anticancéreuses

3.1. Classification des agents antitumoraux

Les traitements pharmacologiques du cancer sont établis à partir de plusieurs familles d'agents considérés comme antitumoraux pouvant être cytostatiques ou cytotoxiques. Une description de ces familles va nous permettre d'avoir une bonne idée des traitements existants et des pistes thérapeutiques déjà exploitées dans plusieurs cancers.

3.1.1. Agents alkylants

Les agents alkylants sont des composés organiques capables d'introduire un groupement de type alkyle (enchaînement hydrocarboné simple) sur une molécule d'ADN ou d'ARN. L'introduction de nombreux groupements alkyle dans l'ADN est à la base d'une saturation des systèmes de réparation de l'ADN et de l'entrée en apoptose de la cellule. Les agents alkylants agissent indépendamment du cycle cellulaire car ils peuvent pénétrer dans le noyau sans attendre la mitose. De plus, ils montrent une relation effet-dose Log linéaire. Au sein de cette famille de molécules, on retrouve des sous familles telles que les moutardes à l'azote (melphalan, cyclophosphamide), les nitrosourées (BCNU, fotemustine), les alkyles sulfonates (busulfan), les aziridines (thiotepa), les sels de platine (cisplatine, carboplatine, oxaliplatine) et autres (dacarbazine, temozolomide). Leur utilisation est limitée par leur toxicité due à leur manque de spécificité notamment au niveau de la moelle osseuse, de la muqueuse digestive, de la peau, des organes d'excrétions (foie, rein) et des cellules germinales²⁸.

3.1.2. Antimitotiques

Les agents antimitotiques (aussi appelés poisons du fuseau) représentent toutes les drogues qui exercent leurs actions cytotoxiques sur le fuseau mitotique et plus particulièrement au niveau de son constituant de base appelé microtubule lui-même constitué par polymérisation de sous-unités de tubuline.

Selon la nature du poison, on distingue la sous famille des taxanes capables d'inhiber la dépolymérisation des microtubules en se fixant sur leur site de fixation spécifique au niveau de la tubuline bêta. Il en résulte une stabilisation des microtubules qui ne sont plus capable d'organiser le fuseau mitotique pourtant indispensable à la division cellulaire. Les principaux représentants des taxanes sont le docétaxel et le paclitaxel. Récemment, le groupe Sanofi-Aventis a commercialisé le cabazitaxel qui aurait des effets indésirables moins importants que ces prédécesseurs.

On connaît également les alcaloïdes de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) aussi appelés vinca-alcaloïdes qui sont capables d'inhiber la polymérisation des microtubules en se fixant sur leur site de fixation spécifique au niveau de la tubuline bêta. Il en résulte une déstabilisation des microtubules qui ne sont plus capables d'organiser le fuseau mitotique pourtant indispensable à la division cellulaire. Les principaux représentants des vinca-alcaloïdes sont la vincristine, la vinblastine, la vindésine, la vinorelbine ou encore la vinflunine. Les poisons du fuseau mitotique sont des molécules très toxiques au niveau hématologique et neurologique. Ils peuvent être à la base de douleurs intenses, d'alopécie, de rétention hydrique, etc. Actuellement, il y a plusieurs composés à l'étude pour imiter les taxanes (ex : eprotilone) ou les vinca-alcaloïdes (ex : combrestatine) tout en limitant la toxicité²⁸.

3.1.3. Antimétabolites

Les antimétabolites sont des analogues de bases azotés qui vont s'incorporer dans l'ADN au moment de la réplication. Ces analogues de base sont non fonctionnels sur le plan biologique et empêchent donc l'ADN de se répliquer normalement. La mitose est alors interrompue en phase S et la cellule entre en apoptose. On distingue les analogues de bases pyrimidiques (5-fluorouracil, capecitabine, gemcytabine, cytarabine), les analogues de bases puriques (6-mercaptopurine, fludarabine, thioguanine). On observe là aussi de nombreux effets indésirables plus ou moins spécifiques de la drogue utilisée. On peut observer le cas de la capecitabine qui est en réalité la prodrogue Per Os du 5-FU et qui sera transformée en ce dernier grâce à l'activité d'une enzyme appelée la thymidine phosphatase. Cette enzyme est particulièrement présente au sein de la tumeur ce qui permet à la drogue d'avoir une activité cytotoxique pseudo spécifique. En réalité, la thymidine phosphatase est également présente à d'autres niveaux de l'organisme comme par exemple les extrémités des membres inférieurs et supérieurs. C'est ce qui explique la présence d'un effet secondaire bien connu des oncologues médicaux appelé le syndrome main/pied.

Il est caractérisé par une réaction inflammatoire qui fragilise les micro-vaisseaux des mains et des pieds qui se traduisent dans un premier temps par des rougeurs dans la paume des mains et sur la plante des pieds. L'ampleur du syndrome main/pied dépendant de chaque patient mais aussi de la dose de capécitabine administrée. Enfin, les analogues de l'acide folique (methotrexate, permetrexed) inhibent la tétrahydrofolate (THF) ce qui bloque la chaîne de synthèse des bases puriques et pyrimidiques.

Pour que le methotrexate soit actif il doit d'abord être polyglutamaté (étape du métabolisme). L'efficacité de ce médicament dépend de la capacité de l'organisme à le polyglutamater.

C'est pourquoi on a synthétisé le permetrexed qui possède le même mécanisme d'action que le methotrexate mais qui est plus facilement activé. Malgré les efforts dans le développement de nouveaux analogues, on observe parfois la résistance des cellules tumorales aux analogues de l'acide folique, expliquée par une augmentation de la dihydrofolate réductase (DHFR), une mutation du gène de la DHFR, une diminution du transport du médicament à travers la membrane plasmique ou encore une diminution de la polyglutamatisation²⁸.

3.1.4. Inhibiteurs des topoisomérases

Au sein de la famille des inhibiteurs des topoisomérases, on distingue ceux ayant pour cible la topoisomérase de type 1 et ceux ayant pour cible la topoisomérase de type 2. Dans les inhibiteurs de la topoisomérase 1, on retrouve des molécules issues de *Camptotheca accuminata*. À partir de la camptotécine, extraite de ce végétal, on peut synthétiser le topotécan et sa prodrogue l'irinotécan. Des essais cliniques sont actuellement en cours pour de nouvelles molécules elles aussi synthétisées à partir de la camptotécine (gimatecan, lurtotecan, exatecan). La topoisomérase 1 est nécessaire au dénouement de l'ADN afin de permettre une accessibilité aux enzymes de la réplication et de la transcription. Elle provoque une cassure simple brin pour faciliter le dénouement de l'ADN puis une religation pour laisser l'ADN intègre. Les inhibiteurs de la topoisomérase 1 forment un complexe ternaire entre l'ADN, la topoisomérase 1 et l'inhibiteur. Ce complexe est responsable l'inhibition de la religation de l'ADN. On observe donc une cassure simple brin stabilisée. Dans le cas où cette cassure n'est pas réparée par les systèmes de réparation de l'ADN avant la réplication, il se formera alors une cassure double brin qui entrainera la cellule vers l'apoptose. C'est la saturation des mécanismes de réparation de l'ADN qui permet d'aller jusqu'à l'apoptose.

Lors de l'utilisation de ces molécules, on observe une toxicité hématologique (neutropénie, thrombopénie, anémie), une toxicité digestive (diarrhée, nausée, vomissement, douleur abdominales) et une alopecie.

La topoisomérase 2 forme des cassures double brin dans l'ADN de manière à faciliter son réenroulement. Les inhibiteurs de la topoisomérase 2 empêchent la religation après l'enroulement. Ces cassures doubles brins vont elles aussi déclencher l'apoptose en cas d'accumulation sans réparation. Dans la famille des inhibiteurs de la topoisomérase 2, on classe les dérivés de l'épipodophyllotoxine (étoposide, téniposide) et les anthracyclines (doxorubicine, daunorubicine, épirubicine mitoxantrone). La toxicité immédiate est la même que celle retrouvée lors de l'utilisation des inhibiteurs de topoisomérase 1²⁸. Cependant il existe pour cette famille de molécules une toxicité tardive avec l'apparition possible de leucémie aiguë myéloïde et une cardiotoxicité caractéristique des anthracyclines.

3.1.5. Thérapies ciblées

On a vu précédemment que le cancer est une maladie dans laquelle on retrouve des anomalies de la communication cellulaire. Ces anomalies orientent la cellule cancéreuse vers une prolifération incontrôlée malgré des mutations génétiques, des modifications chromosomiques, des variations de l'expression de différentes protéines, etc. Les voies de signalisations cellulaires régissent la communication entre les cellules mais aussi au sein d'une même cellule. Après avoir étudié les différentes composantes de la communication cellulaire chez les cellules cancéreuses, on a développé des traitements capables de réprimer certaines voies de signalisations. Actuellement, les chercheurs ont déjà isolé de nombreuses voies impliquées dans le développement des cancers. On essaie maintenant de classer les cancers en fonction des types de voies de signalisation perturbée. A partir de cette classification très complexe, on pourra déterminer à l'avance si une thérapie ciblant telle ou telle voie de signalisation a une bonne probabilité de réponse ou non sur tel ou tel cancer. Des études de caractérisation des différents cancers en fonction de leur réponse à différents traitements sont actuellement en cours et permettront de déterminer des signatures minimales prédictives de réponse aux traitements. Les molécules appartenant à la famille des thérapies ciblées sont divisées en deux catégories avec d'un côté les anticorps monoclonaux et de l'autre les inhibiteurs de tyrosine kinase²⁸.

3.1.5.1. Anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux sont des agents biologiques ayant une cible spécifique. Ceux utilisés en thérapie anticancéreuse sont dirigés contre des antigènes présents spécifiquement au niveau des cellules tumorales. Il existe différents types d'anticorps monoclonaux parmi lesquels on retrouve les anticorps murins dont l'intégralité de la structure est murine ce qui a été la cause de nombreux cas de toxicité. Les anticorps chimériques quant à eux possèdent une fraction constante humaine et sont donc mieux tolérés, à l'instar du rituximab (anti CD20) encore utilisé comme traitement de référence dans le lymphome non-Hodgkinien.

Les anticorps humanisés ne possèdent plus qu'une petite région murine et sont donc encore mieux tolérés. On retrouve notamment parmi ces derniers le trastuzumab utilisé dans le cancer du sein *HER2* muté. Les récepteurs membranaires *HER2* pourront alors être retrouvés avec une densité suffisante à la surface des cellules cancéreuses et constituer la cible de cette thérapie.

C'est pourquoi on réalise toujours un test à la peroxydase dans le but de déterminer la densité en récepteurs de types 2 de facteurs de croissances humains (*HER2*) avant d'utiliser le trastuzumab. On considère que le test est positif à partir de 1 à 2 millions de récepteurs par cellules cancéreuses. Ces tests associés aux traitements représentent un nouveau marché et sont appelés les théragnostiques. Enfin il existe maintenant des anticorps 100% humain. Ces derniers sont au cœur de l'actualité concernant les nouvelles thérapies ciblées indiquées dans le mélanome cutané avec entre autre l'ipilimumab. Cette molécule serait capable de lever une inhibition immunologique exercée par les cellules tumorales sur les lymphocytes T $CD8^+$ en ciblant le récepteur 4 des protéines associées aux lymphocytes T cytotoxiques (*CTLA4*) de ces lymphocytes. Sur un plan général, le mécanisme d'action des anticorps nus serait la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) aboutissant à la nécrose par formation de pores dans la membrane plasmique, la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) aboutissant à la phagocytose, l'apoptose ou la nécrose en fonction des cellules immunitaires activées (ex : cellules NK). Enfin le dernier mécanisme utilisé par les anticorps monoclonaux est le signal d'apoptose qui conduira directement la cellule tumorale en apoptose sans intermédiaire. Une nouvelle génération d'anticorps monoclonaux est aujourd'hui au stade clinique de développement.

Il s'agit des anticorps monoclonaux (thérapeutique ou non) utilisés comme des véhicules à destinations ciblées sur lesquels on fixe des poisons hautement toxiques (tel que celui de l'amanite phalloïde) ou des éléments radioactifs comme l' Y^{90} sur l'Ibritumomab tiuxetan (ZEVALIN®) et l' I^{131} sur le tositumomab (BEXXAR®). Ces médicaments sont appelés anticorps monoclonaux armés et utilisent volontairement des anticorps murins pour ne pas avoir de radioactivité à trop long terme. Les protocoles utilisent dans un premier temps une faible dose pour permettre une imagerie par scintigraphie afin de repérer la tumeur et l'agrégation des anticorps sur celle-ci. Ensuite, une dose de charge est administrée dans un but thérapeutique. Pour finir, on sait que les anticorps monoclonaux sont des substances qui fixent leur ligand la plus part du temps à la surface cellulaire ou dans le microenvironnement.

Cependant, certaines mutations génétiques vont être responsables de l'activation de protéines intracellulaires hors de portée des anticorps monoclonaux. Dans cette situation on peut envisager l'utilisation de la seconde catégorie de thérapie ciblée, les inhibiteurs de tyrosine kinases.

3.1.5.2. Inhibiteurs des tyrosines kinases

L'activation anormale de certaines protéines impliquées dans les grandes voies de signalisation cellulaires peut être à la base d'un processus de transformation néoplasique.

On sait que ces protéines sont activées dans de nombreux cas par des phénomènes de phosphorylations au niveau de certains de leurs résidus tyrosines. De manière à empêcher cette activation, les chercheurs ont mis au point des molécules capables d'inhiber les kinases responsables de la phosphorylation de ces résidus tyrosines intracellulaires appelées inhibiteurs de tyrosines kinases (ITK). Le mécanisme d'action repose sur la fixation de l'ITK sur la tyrosine kinase au niveau de l'emplacement dédié à l'ATP. L'ATP étant le fournisseur de phosphate indispensable à la phosphorylation, l'activation de la protéine est rendue impossible. Les ITK fonctionnent donc grâce à un mécanisme d'antagonisme compétitif vis à vis de l'ATP. Cet antagonisme est irréversible et perdurera jusqu'à la mort de la cellule. Il existe de nombreux inhibiteurs de tyrosines kinases destinés à stopper l'activation de protéines spécifiques. En théorie, ces protéines sont les cibles spécifiques de chacune des thérapies les ciblant. En réalité on s'est aperçu qu'un inhibiteur de tyrosine kinase pouvait avoir plusieurs protéines cibles, qu'elles soient activées pathologiquement ou non. C'est dans ce contexte que l'on va observer l'apparition des effets indésirables de ce type de thérapies.

Les chercheurs ont essayé de modéliser un kinome propre à chaque ITK et qui représente sur une seule figure l'ensemble des kinases dont le fonctionnement est altéré par le médicament. L'objectif actuel des nouveaux ITK est d'avoir un kinome représentant un minimum de kinases impactées par son activité.

Un des exemples les plus spectaculaires de l'efficacité des ITKs est l'imatinib (GLIVEC®) indiqué dans le traitement de la LMC. Si on s'intéresse à cette pathologie, on apprend que le diagnostic de la LMC repose sur la mise en évidence d'une translocation (9,22) responsable de la synthèse d'une protéine kinase ABL juxtaposée à la protéine BCR. Il en résulte la formation d'un complexe BCR-ABL et une activation constitutive de BCR aboutissant au déclenchement et au maintien d'une leucémie myéloïde. Cette mutation est majoritairement retrouvée sur les cellules de la lignée myéloïde dans le compartiment sanguin et dans la moelle osseuse mais aussi sur une petite proportion de cellules souches hématopoïétiques situées dans des niches hématopoïétiques au niveau de la moelle osseuse. La LMC est un des rares cancers résultant de la dérégulation d'une voie unique. On a donc mis au point un ITK capable d'inhiber l'activation constitutive de la protéine BCR par la protéine ABL. Les statistiques sont fortement favorables aux patients avec une survie globale à 5 ans d'environ 90% sans signe de leucémie.

Ce cancer n'utilise pas de voies de signalisation de secours qui prennent le relais une fois la voie principale enrayée. Cependant, le problème encore non résolu de la LMC consiste à trouver un moyen d'atteindre les cellules souches hématopoïétiques leucémogènes porteuses de la translocation (9,22) appelées « Ph1+ ». En effet, celles-ci sont cachées dans des niches hématopoïétiques situées en profondeur dans la moelle osseuse et hors de portée des molécules pharmacologiques. De plus, ces cellules n'étant pas différenciées, leur détection et l'activité de nos médicaments sur ces dernières restent très incertaines. Ces cellules leucémogènes Ph1+ sont à la base des rechutes de LMC lorsqu'on arrête d'exercer une pression pharmacologique sur les cellules leucémiques matures du compartiment sanguin. Autrement dit, l'arrêt du traitement d'une LMC par imatinib même des années après la rémission complète expose à un risque important de rechute.

Dans la plupart des cancers, il existe de nombreuses voies de signalisations impliquées dans le processus de transformation néoplasique. L'enjeu de ces maladies est de déterminer quelles sont les voies les plus fortement impliquées.

Ainsi on pourra orienter le traitement vers une thérapie ciblée plus ou moins spécifique qui enrayera une voie de signalisation plus ou moins indispensable à la pérennité du cancer. Pour potentialiser l'efficacité des traitements anticancéreux, les thérapies ciblées doivent être utilisées en association entre elles mais surtout en association avec des chimiothérapies cytotoxiques plus anciennes et moins spécifiques comme l'indique le protocole R-CHOP. Ce protocole associe le Rituximab (anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur membranaire CD20 surexprimé à la surface de certaines cellules cancéreuses), le Cyclophosphamide (agent alkylant), l'hydroxyadriamycine (anthracycline), l'Oncovin® (poison du fuseau mitotique) et la prednisolone (glucocorticoïde). L'intérêt de faire des associations est d'atteindre la cellule cancéreuse grâce à différents mécanismes simultanés de manière à lutter contre ses mécanismes de résistance. De plus, l'utilisation de plusieurs molécules permet de diminuer les doses de chacune d'entre elles grâce à l'additivité des effets de ces drogues.

Parfois on observe même une potentialisation de l'effet de la chimiothérapie cytotoxique induite par l'administration d'une thérapie ciblée. Qu'il s'agisse d'un effet additif ou d'une véritable synergie, les combinaisons permettent de diminuer les doses de médicaments à administrer et donc de limiter les effets indésirables liés à ces médicaments.

3.1.6. Immunothérapie

L'immunothérapie consiste à utiliser le système immunitaire comme une arme dirigée contre le cancer. Il faut différencier les immunothérapies qui ne vont pas éduquer le système immunitaire, dite « immunothérapie passive » de celle qui vont l'éduquer, dite « immunothérapie active ». Les mécanismes d'immunothérapies passives n'utilisent pas de réaction spécifique mais consistent à administrer des éléments immunitaires déjà compétents et dirigés contre les cellules cancéreuses du patient. Parmi ces traitements on retrouve notamment les anticorps monoclonaux (tantôt classés dans les thérapies ciblées, tantôt classés dans les immunothérapies) tels que le trastuzumab déjà évoqué précédemment, les cellules cytotoxiques telles que des monocytes purifiés (aussi appelée thérapie cellulaire adoptive) tels que Provenge® (Sipuleucel-T) indiqué dans le cancer de la prostate ou encore des cytokines pro-inflammatoires comme l'interféron alpha et l'interleukine 2. À l'inverse, l'immunothérapie active provoque une réaction immunitaire spécifique en introduisant un signal de danger associé à un antigène spécifique des cellules tumorales du patient ou d'un élément nécessaire à la transformation néoplasique. C'est dans cette catégorie de thérapies que l'on peut classer la vaccination anti tumorale au sein de laquelle on différenciera la vaccination à but préventif et la vaccination à but curatif.

Dans la première, il est question de prévenir l'apparition du cancer en administrant un vaccin composé entre autre d'antigènes spécifiques de cellules fréquemment retrouvées dans le cancer ciblé. On peut également prévenir l'apparition d'un cancer en luttant contre les éléments déclencheurs de ce cancer à l'image du Gardasil® indiqué chez l'adolescente de moins de 14 ans pour prévenir l'apparition du cancer du col de l'utérus. En effet, ce cancer se développe à partir de lésions néodysplasiques localisées au niveau du col de l'utérus et résultant d'une infection antérieure de la patiente par un papillomavirus (HPV). Les industriels de la pharmacie ont donc commercialisé des vaccins contre l'HPV tels que le Gardasil® dans un but de prévenir le cancer du col de l'utérus. Les vaccins à but curatifs sont administrés à des sujets déjà atteints du cancer.

Ces vaccins contiennent des signaux de danger, tels que des cytokines pro-inflammatoires destinées à exciter le système immunitaire du patient, ainsi que des cellules présentatrices d'antigènes chargées d'antigènes spécifiques de la tumeur traitée ou des virus modifiés exprimant à leur surface des antigènes de la tumeur. On peut illustrer cette dernière catégorie avec l'exemple du ProstaVac® qui est un vaccin expérimental à base de vecteurs viraux vivants atténués. Celui-ci est composé de deux vecteurs viraux à utiliser ensemble dans une primo-vaccination avec rappel. D'un côté le PROSTVAC-V est un virus recombinant de la vaccine contenant un gène modifié codant pour l'antigène spécifique de la prostate (PSA) humain et des gènes codant pour trois molécules immunologiques co-stimulantes humaines dont B7.1, ICAM-1 (molécule d'adhésion intracellulaire-1) et LFA-3 (antigène de fonction leucocytaire-3). Le gène PSA utilisé porte une altération dans un épitope spécifique de l'antigène HLA-A2 (système d'histocompatibilité). D'un autre côté, le PROSTVAC-F est un virus recombinant de la variole aviaire (F = Fowlpox) co-exprimant les quatre mêmes gènes humains que PROSTVAC-V. L'immunothérapie est un axe de recherche qui évolue lentement et qui divise la communauté scientifique quant à son avenir. Aujourd'hui, seule les anticorps monoclonaux ont fait preuve d'une efficacité significative et sont entrés en routine dans les pratiques cliniques.

3.1.7. Hormonothérapie

Dans certains cancers les hormones stimulent la prolifération tumorale car la tumeur exprime des récepteurs hormonaux. Les trois cancers hormono-dépendants sont le cancer du sein, de la prostate et de l'endomètre utérin. Le principe de l'hormonothérapie est donc d'empêcher cette stimulation hormonale par deux grandes méthodes.

La première consiste à diminuer la production hormonale soit au niveau central comme avec les agonistes de la libération hormonale de l'hormone lutéinisante (LH-RH) qui inhibent la sécrétion de l'hormone lutéinisante (LH) hypophysaire, soit au niveau périphérique avec une chirurgie ou radiothérapie des ovaires ou des testicules (irréversibles) ou l'utilisation d'anti-aromatases chez la femme²⁹. La deuxième méthode consiste à bloquer les récepteurs hormonaux à l'aide d'anti-hormones.

En cas de cancer de la prostate on peut agir au niveau périphérique par castration chirurgicale ou au niveau central par castration chimique grâce aux analogues de la LH-RH (Enantone, Décapeptyl). Il en résultera la suppression de la production hypophysaire de LH. Il est également possible de bloquer l'action des androgènes en périphérie en utilisant des anti-androgènes stéroïdiens (acétate de cyprotérone) ou non stéroïdiens (flutamide, nilutamide bicalutamide).

Les anti-androgènes peuvent être utilisés en association avec les analogues de la LH-RH pour éviter l'effet « flare up ». Cet effet est caractérisé par une augmentation initiale de la production de LH suite à l'utilisation des anti-androgènes. L'effet flare up peut être associé à une croissance tumorale rapide et entraîner des complications de type métastatiques notamment au niveau osseux.

En cas de cancer du sein, l'examen anatomopathologique de la pièce d'exérèse doit préciser si la tumeur exprime des récepteurs aux oestrogènes ou aux progestatifs. La tumeur est alors dite hormonosensible. En cas de présence de l'un ou de l'autre de ces récepteurs, il y a une indication à une hormonothérapie d'une durée de cinq ans indépendamment du stade tumoral, selon deux cas de figure. Si la femme est non ménopausée, elle recevra un anti-oestrogène périphérique (tamoxifène = agoniste/antagoniste) alors que si elle est ménopausée elle recevra un anti-aromatase (arimidex). Il faut savoir que toute hormonothérapie entraîne une ménopause induite appelée trouble climatérique et caractérisée cliniquement par des bouffées de chaleur, une irritabilité et une prise de poids. Le tamoxifène est antagoniste des récepteurs aux oestrogènes au niveau de l'épithélium mammaire normal et tumoral mais agoniste de ces mêmes récepteurs au niveau de certains tissus comme les os et l'endomètre utérin. Cette ambivalence lui permet donc de limiter sa toxicité. Ce paramètre n'est pas retrouvé chez les anti-aromatases comme l'arimidex, ce qui explique des effets indésirables de type ostéoporose et ses complications.

Pour comprendre l'intérêt des anti-aromatases, il faut savoir qu'après la ménopause, les androgènes d'origine surrénalienne sont convertis en oestrogènes par l'aromatase. Les inhibiteurs de l'aromatase suppriment cette activité. De plus, avant la ménopause la production ovarienne d'oestrogènes et de progestérone rend inefficace l'anti-aromatase²⁹.

3.2. Résistance aux traitements pharmacologiques anticancéreux

L'hétérogénéité des cellules tumorales leur permet de sélectionner et d'utiliser différents mécanismes de défense pour lutter contre une grande variété d'agressions. Certaines de ces agressions sont d'origines naturelles, parmi lesquelles on retrouve les agressions physiques (ex : chocs contre les parois vasculaires lors de la dissémination métastatique), les agressions cellulaires (ex : activité physiologique du système immunitaire de l'hôte) ou encore les agressions chimiques (ex : libération de cytokines anti tumorales). La seconde catégorie d'agressions correspond à celles provoquées par l'administration de traitements pharmacologiques décrits précédemment de nature chimique et biologique.

L'ensemble de ces agressions va concourir à la formation d'une pression de sélection appliquée sur les cellules tumorales. Cette pression de sélection peut influencer des paramètres tels que la trajectoire génétique, l'épigénétique, le microenvironnement tumoral, la transition épithélio-mésenchymateuse, etc. Ainsi les cellules tumorales sélectionnées sont celles dont la différenciation a été orientée par un ensemble de diverses contraintes et peuvent être qualifiées de résistantes. Ces dernières possèdent des caractéristiques plus ou moins connus et spécifiques de la résistance. La nature et le nombre de ces caractéristiques sont extrêmement variables et peuvent différer en fonction du type de cancer, au sein d'une même tumeur ainsi que dans le temps.

Parmi les mécanismes de résistance connus on retrouve la synthèse de protéines de la famille des multi drug resistance (MDR). Ces éléments sont des protéines de reflux qui empêchent l'accumulation de substances chimiques, comme certains médicaments, au sein de la cellule cancéreuse. De cette manière, la cellule peut devenir résistante lorsque le traitement est reconnu par les MDR et que la dose maximum tolérée devient insuffisante pour saturer les acteurs de ce système de reflux. Des études ont montré qu'il est possible d'utiliser des inhibiteurs des transporteurs ABC comme le vérapamil ou la cyclosporine A pour induire une chimiosensibilisation des cellules qui utilisent ce type de mécanisme de résistance. Certaines cellules cancéreuses sont capables de modifier le métabolisme des médicaments.

Ainsi, elles vont accélérer l'élimination de la drogue par augmentation du métabolisme ou au contraire ralentir voir inhiber la transformation d'une pro-drogue en drogue active par diminution du métabolisme. On a également observé des phénomènes de modifications qualitatives et/ou quantitatives des cibles médicamenteuses. Ce mécanisme de résistance est redoutable et peut en partie expliquer l'échappement de certaines cellules à des traitements trop ciblés. De plus, lorsque la modification de la cible ne suffit pas à résister au traitement, la cellule tumorale peut également modifier les proportions d'utilisation des voies de signalisations cellulaires mises en jeu par la maladie. Dans ce cas de figure, les voies de signalisations touchées par le traitement et utilisées de façon majeure par le cancer vont être délaissées par celui-ci. Des voies de signalisation initialement mineurs mais non touchées par le traitement vont prendre le relais et devenir majeures. Ainsi, le cancer peut continuer son développement jusqu'à la prochaine adaptation du traitement. Certaines chimiothérapies cytotoxiques comme par exemple les agents alkylants ont pour objectif de modifier ponctuellement la structure de l'ADN. L'accumulation de ces modifications structurales induira à terme l'entrée en apoptose de la cellule.

On comprend alors pourquoi on peut observer la suractivation de mécanismes de réparation de l'ADN dans certains cancers ainsi que leur échappement à certains traitements cytotoxiques. Lorsque la mise en jeu accrue de plusieurs mécanismes de réparation de l'ADN se montre inefficace pour empêcher l'apoptose, des modifications de l'équilibre des voies pro-apoptotiques et anti-apoptotiques peuvent être mises en place. De cette façon, la cellule cancéreuse shunt les étapes précédentes et se concentre sur son immortalisation quel que soit l'activité du traitement. L'ensemble vaste et complexe des considérations biologique et pharmacologique est à prendre en compte lors de l'instauration ou de l'adaptation d'un traitement pharmacologique anticancéreux.

Ainsi, le clinicien doit prendre des décisions en sachant qu'il n'y a pas deux cancers identiques mais autant de cancers différents que de patients cancéreux. La prise en charge doit être personnalisée au maximum pour prétendre aux meilleurs résultats.

3.3. Principes de prise en charge thérapeutique du cancer

Le cancer est la première cause de mortalité en France et dans le monde depuis 1990. On observe pourtant depuis cette période une diminution de cette mortalité grâce aux avancées en matière de dépistage et de traitement. En effet il y a quelques années encore, un cancer au stade métastatique était synonyme de mortalité à court terme.

Grâce au travail collaboratif des médecins et des chercheurs on voit naître depuis quelques années une nouvelle catégorie de patients pour lesquels le cancer est passé du statut de maladie aiguë à celui de maladie chronique. Il existe donc aujourd'hui des patients cancéreux au stade métastatique suivi depuis 5 ans et dont l'avenir à plus ou moins long terme bien qu'incertain, reste envisageable.

Il est nécessaire de distinguer la détection d'un cancer réalisée par un clinicien à partir d'éléments cliniques et le dépistage nécessitant des éléments infracliniques tels que des examens biologiques ou histologiques. C'est l'association des deux savoir-faire qui permet d'évaluer l'évolution de la maladie et d'orienter efficacement une pratique médicale à visée anticancéreuse. À partir de ce constat, médecins cliniciens, médecin non cliniciens et pharmaciens hospitaliers se réunissent régulièrement autour de cas pour établir la meilleure stratégie à suivre pour lutter contre la maladie. Ces réunions sont appelées réunions de concertation pluridisciplinaire (RCP) et permettent d'avoir une vision pluridisciplinaire au cas par cas. Au cours de ces réunions, l'enjeu est d'élaborer une stratégie de traitement dont je vais vous énoncer les grands axes. Il faut savoir qu'aujourd'hui, la chirurgie et la radiothérapie sont les seuls traitements qui guérissent les patients du cancer.

Il faut comprendre que les traitements pharmacologiques ont le plus souvent pour objectif principal l'amélioration des performances des deux autres. Le traitement pharmacologique garde une place décisive dans la prise en charge des patients. En effet, il donne la possibilité d'une action à spectre large, représente le seul traitement systémique et offre des possibilités de combinaisons à travers de multiples protocoles thérapeutiques. En revanche, les principales limites sont la toxicité et la variabilité de l'efficacité suivant les types tumoraux.

Les stratégies thérapeutiques sont catégorisées en fonction du placement dans le temps du traitement pharmacologique par rapport au traitement chirurgical ou radiothérapeutique²⁹. Le choix de la stratégie dépend de plusieurs facteurs dont certains sont liés à la maladie (stade d'avancement, cinétique de progression, hétérogénéité cellulaire, etc), d'autres sont liés aux patients (état général ou spécifique d'un système d'intérêt).

3.2.1. Chimiothérapie adjuvante

Parmi ces stratégies on trouve la chimiothérapie adjuvante effectuée en aval de la chirurgie. L'objectif de cette chimiothérapie est d'éliminer les micrométastases résiduelles (circulantes dans un compartiment de migration ou dans un organe secondaire) après élimination chirurgicale de la tumeur primitive.

Ces micrométastases ne pourront alors plus aller coloniser des organes secondaires comme décrit précédemment. Grâce à cette stratégie, on lutte directement contre le risque de rechute de la maladie. Une des limites de cette stratégie réside au niveau des modalités d'applications. En effet, seuls les patients dont le cancer est à un stade précoce vont bénéficier de cette prise en charge car si des métastases sont déjà présentes et suffisamment volumineuses pour être visibles à l'imagerie médicale, alors la chirurgie est le plus souvent refusée. Il faut savoir que chaque acte chirurgical comporte un risque. Ce risque est proportionnel au nombre d'actes effectués sur un même patient. On comprend donc que l'élimination de la tumeur primitive ainsi que de toutes les métastases (probablement sur des organes différents) serait une pratique médicale possédant un rapport bénéfice/risque défavorable au patient. Cette théorie est renforcée par notre incapacité à détecter toutes les métastases quel que soit leurs tailles. La seconde contrainte est la dose à administrer. Les patients bénéficiant de ce type de prise en charge sont potentiellement guéris. Il faut donc éviter les rechutes liées aux micrométastases mais il faut aussi préserver le patient des toxicités du traitement. Le consensus est donc d'administrer au patient un traitement faiblement toxique à faible dose pendant une période inférieure à six mois en espérant ne pas favoriser la résistance à ce traitement.

3.3.1. Chimiothérapies néo-adjuvantes

Il existe également les chimiothérapies néo-adjuvantes réalisées en amont de la chirurgie. Ces chimiothérapies ont pour objectif principal de diminuer la taille de la tumeur primitive afin de la rendre plus accessible au chirurgien et lui permettre de faire une intervention moins mutilante. Grâce à cette stratégie, on a observé une diminution significative des mastectomies dans la prise en charge du cancer du sein.

L'objectif secondaire de cette chimiothérapie est l'élimination d'éventuelles micrométastases circulantes et sensibles aux mêmes drogues que la tumeur primitive.

3.3.2. Chimiothérapie concomitante

La chimiothérapie concomitante consiste à administrer le traitement pharmacologique simultanément avec le traitement radiothérapeutique. On a observé que certaines chimiothérapies pouvaient potentialiser l'effet des rayons ou tout au moins additionner leur activité. Ce type de stratégie est choisi notamment lorsque la tumeur est localisée sur une zone inaccessible au chirurgien ou simplement trop risquée pour le traitement chirurgical.

3.3.3. Chimiothérapie en situation métastatique

Enfin, il existe la chimiothérapie en situation métastatique dont l'objectif est d'améliorer la qualité de vie du patient tout en évitant que la maladie devenue chronique ne redevienne aiguë. La plupart du temps, cette stratégie mène le patient de rechutes en rechutes le plus confortablement possible. Les contraintes de cette stratégie sont la toxicité des traitements et la réévaluation fréquente du confort du patient. À chacune de ces réévaluations, le choix est difficile pour le clinicien entre interruption momentanée et entretien du traitement. Ces interruptions momentanées sont appelées pauses thérapeutiques et ont pour objectif d'améliorer la qualité de vie du patient. Cependant, à chaque pause thérapeutique, le clinicien prend le risque que le cancer évolue en phase aiguë.

4. Présentation du mélanome uvéal

4.1. Epidémiologie

Le mélanome de l'uvée est une tumeur relativement rare par rapport à l'ensemble des cancers puisque seulement 500 à 600 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année en France. Cependant, c'est la plus fréquente des tumeurs oculaires malignes primitives de l'adulte³⁰.

Il se développe préférentiellement dans les yeux bleus ou verts et il est vraisemblable que l'exposition solaire favorise sa survenue. Il est exceptionnel chez les sujets de couleur noire. L'âge moyen au diagnostic est de 56 ans. Bien qu'il ne semble pas s'agir d'une maladie héréditaire, des cas familiaux peuvent se voir ainsi que des associations dans une même famille à des mélanomes cutanés ; les formes bilatérales sont très rares. La dissémination métastatique survient dans plus de 50% des cas et parfois plusieurs années après le diagnostic initial. Dans plus de 90 % des cas³¹, les métastases sont localisées au niveau du foie. Il existe différents facteurs de risque pour que la maladie *in situ* devienne métastatique comme l'exposition aux UV-A et UV-B, l'âge, le volume tumoral, la localisation tumorale, le détachement de la rétine ou encore le type de cellules épithélioïdes³².

Le seul traitement de cette tumeur a longtemps été l'énucléation (ablation de l'œil) et le syndrome « œil de verre gros foie » est bien connu des gastro-entérologues. Depuis une vingtaine d'années les progrès du traitement sont tournés vers le traitement conservateur de l'œil et de sa fonction grâce à l'apparition de nouvelles méthodes de radiothérapie. Cependant, les métastases hépatiques lorsqu'elles surviennent gardent un pronostic très péjoratif. La mortalité des patients atteints de mélanomes choroïdiens après énucléation est d'environ 30% à 5 ans et 50 % à 10 ans. De nombreuses études rétrospectives n'ont pas mis en évidence de différence significative de pronostic vital entre l'énucléation et les traitements conservateurs comme la radiothérapie pour des tumeurs de taille comparables^{32,33}.

4.2. Considérations cliniques

Les mélanomes uvéaux se développent à partir des mélanocytes de l'uvée et se présentent comme des masses tumorales plus ou moins pigmentées, pouvant être parfois très noires ou au contraire totalement achromes. Du pigment orange peut être visible en surface. Les tumeurs antérieures peuvent parfois envahir la racine de l'iris et alors elles deviennent visibles. L'aspect extérieur du globe oculaire peut montrer la présence d'un nævus d'Ota. Il s'agit d'une pigmentation unilatérale congénitale bénigne, intéressant la sclère, l'uvée et les paupières. La constatation d'une telle anomalie doit faire pratiquer un examen régulier du fond d'œil car ces patients développent plus souvent que la moyenne des mélanomes de l'uvée. La symptomatologie habituelle des mélanomes de l'uvée est constituée par des troubles visuels qui imposent un examen ophtalmologique avec dilatation et fond d'œil. Lorsque la tumeur commence à refouler la rétine, elle peut entraîner des phosphènes intermittents (éclairs lumineux se répétant toujours au même endroit). Le développement de la tumeur au niveau du pôle postérieur de l'œil peut entraîner une baisse d'acuité visuelle. Lorsque la tumeur atteint un certain volume, une amputation du champ visuel est notée. Enfin les formes évoluées s'accompagnent d'un décollement total de la rétine comportant une perte complète de la vision de l'œil malade. Ces formes évoluées se rencontrent surtout lorsque les symptômes initiaux sont négligés ou mal perçus par le patient et le médecin³².

4.3. Biologie

4.3.1. Introduction

Dans les cancers, on observe des perturbations du fonctionnement normal des cellules résultant de modifications de l'information génétique contenu dans le noyau pouvant avoir pour conséquences des perturbations de l'activité des voies de signalisations intracellulaires. Il est donc nécessaire de caractériser les différents types de cancers en fonction de perturbations qui leurs sont spécifiques. Dans le cas du mélanome uvéal, plusieurs éléments concernant ces perturbations ont été décrits dans la littérature scientifique. Je vais vous décrire les principaux éléments concernés.

4.3.2. GNAQ/GNA11

Les nævus mélanocytaires et les mélanomes cutanés montrent des mutations oncogéniques fréquentes sur les gènes *BRAF* et *NRAS* dont les protéines respectives jouent un rôle déterminant dans la voie MAPK. Ces mutations se traduisent par une activation constitutive de la voie MAPK³⁴. En revanche, les tumeurs mélanocytaires telles que les mélanomes de l'uvée ne montrent que très rarement de mutations affectant *BRAF* et *NRAS*^{35,36}. Récemment, des mutations somatiques dans le gène *GNAQ* codant pour la sous-unité alpha q de la protéine G hétérotrimérique GNAQ ont été trouvées³⁷. La protéine GNAQ intervient en amont de BRAF et NRAS dans la voie MAPK et permet l'activation de celle-ci. On sait maintenant que chez l'Homme, *GNAQ* est fréquemment muté dans le mélanome uvéal (46 %)³⁸.

Ces mutations se produisent exclusivement sur le codon 209 dans le domaine Ras-like et conduisent à l'activation constitutive de la voie des MAPK ($\approx 50-90\%$). Comme décrit précédemment dans le chapitre biologie du cancer, la voie MAPK est une voie de signalisation cellulaire intimement liée à la prolifération cellulaire. On comprend alors qu'une activation constitutive de cette voie va mener la cellule vers la synthèse d'une quantité disproportionnée de messages de prolifération. Des mutations ont également été retrouvées sur le gène *GNA11* qui est un paralogue de *GNAQ*. Les conséquences des mutations affectant *GNA11* sont similaires à celles touchant *GNAQ*. Ces mutations sont exclusives et ne sont donc jamais retrouvées simultanément chez un même individu³⁹. On sait que le statut de *GNAQ* n'est pas corrélé à la survie sans maladie et n'est donc pas considéré comme un facteur pronostic.

4.3.3. Voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR

Phosphatase and TENsin homolog (PTEN) est une protéine modératrice de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. Elle a pour objectif de transformer le PIP3 et PIP2 et ainsi empêcher l'activation de la protéine AKT par la PI3Kinase. On observe une suractivation de cette voie par perte de l'activité de PTEN dans 20 à 40%⁴⁰ des cas qui se traduit une fois de plus par une production anormale de signaux de prolifération cellulaire. Cette voie est particulièrement connue des hématologues pour être impliquée dans près de 50% des leucémies par le biais de mutations s'intéressant à l'activation constitutive d'AKT. Ce voisinage mécanistique entre certaines leucémies et le mélanome uvéal doit être un élément à garder en tête et pourrait être une piste de réflexion à venir.

4.3.4. BAP1

Les métastases sont caractéristiques des tumeurs malignes et sont quasiment systématiquement retrouvées (90%) en cas de décès par cancer. Cependant, leur génétique reste mal comprise. Des mutations somatiques ont été identifiées sur le gène codant pour BAP1 (BRCA1-associated protein) au niveau du chromosome 3p21.1 dans 84% des métastases analysées issues de mélanomes uvéaux. On sait que la protéine BAP1 intervient en association avec la protéine BRCA1 qui est elle-même directement impliquée dans des mécanismes de réparation de l'ADN. La mutation du gène codant pour BAP1 impliquant la perte de l'activité de cette protéine est retrouvée dans la majorité des mélanomes uvéaux métastatiques. Ce résultat suggère que la mutation de *BAP1* est un facteur pronostic négatif et que les mécanismes de réparation de l'ADN pourraient représenter un axe de recherche judicieux pour mieux comprendre et lutter contre ce cancer⁴¹.

4.3.5. SF3B1

Les mutations touchant le gène splicing factor 3 subunit 1 (*SF3B1*) sont présentes dans 15 à 20% des mélanomes uvéaux. Le séquençage de l'ARN a révélé que *SF3B1* code pour un composant du spliceosome et que sa mutation est associée à un épissage alternatif aberrant de gènes codants⁴². Les mutations de *SF3B1* seraient liées à un bon pronostic, d'autant plus qu'elles ne coïncident que rarement avec les mutations de *BAP1*.

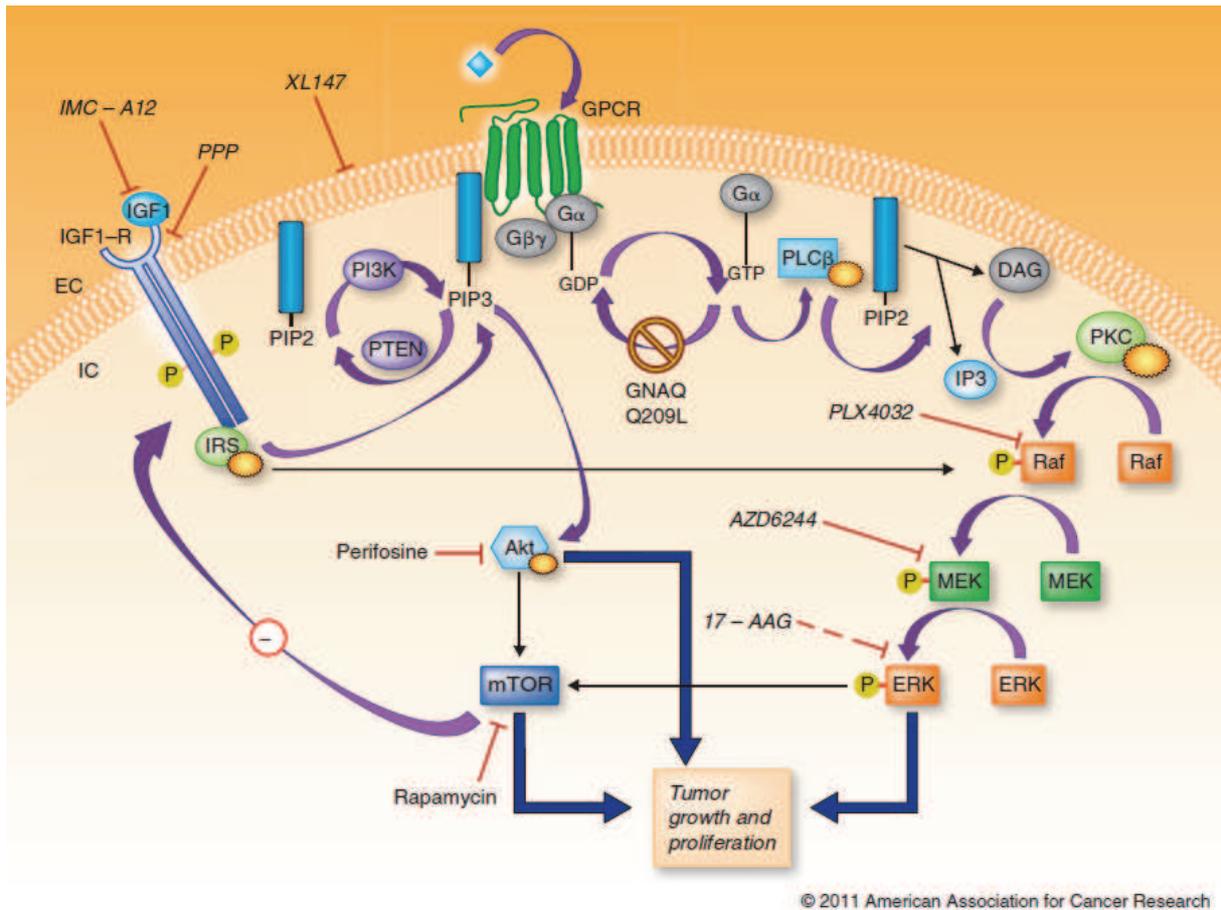


Figure 12: Principales voies de signalisation cellulaires impliquées dans le mélanome uvéal

Dans la figure 13 ci-dessus on peut voir la voie MAPK altérée par des modifications du gène *GNAQ* ainsi que le rôle de PTEN dans voie PI3K/AKT/mTOR. Cette représentation illustre également des communications entre ces deux grandes voies de signalisations⁴³.

4.3.6. Chromosome 3 et chromosome 8

La monosomie du chromosome 3 est fréquemment retrouvée chez les cellules mélanocytaires présentant la pathologie d'intérêt⁴⁴.

Le chromosome 3 contient le gène *BAP1* qui est donc globalement sous-exprimé en cas de monosomie 3 (car présent uniquement sur le chromosome 3 restant), ce qui explique le mauvais pronostic de cette anomalie chromosomique. L'altération du gène *BAP1* et, *a fortiori*, la monosomie du chromosome 3 sont associées à un mauvais pronostic⁴⁵. L'amplification du chromosome 8 est fréquemment retrouvée dans le mélanome uvéal, cependant la littérature scientifique ne propose pas encore beaucoup de données à ce sujet.

Les études sur la biologie du mélanome uvéal ont donc permis d'isoler quelques caractéristiques de cette pathologie pour en améliorer la compréhension.

Cependant, il est nécessaire de garder à l'esprit que la réalité est bien plus complexe et qu'une simplification trop extrême de la réalité peut nous faire passer à côté d'éléments parfois essentiels. La figure 14 ci-après, bien que simplifiée et non exhaustive, se rapproche sûrement plus de la réalité biologique des phénomènes intracellulaires mis en jeu dans ce cancer.

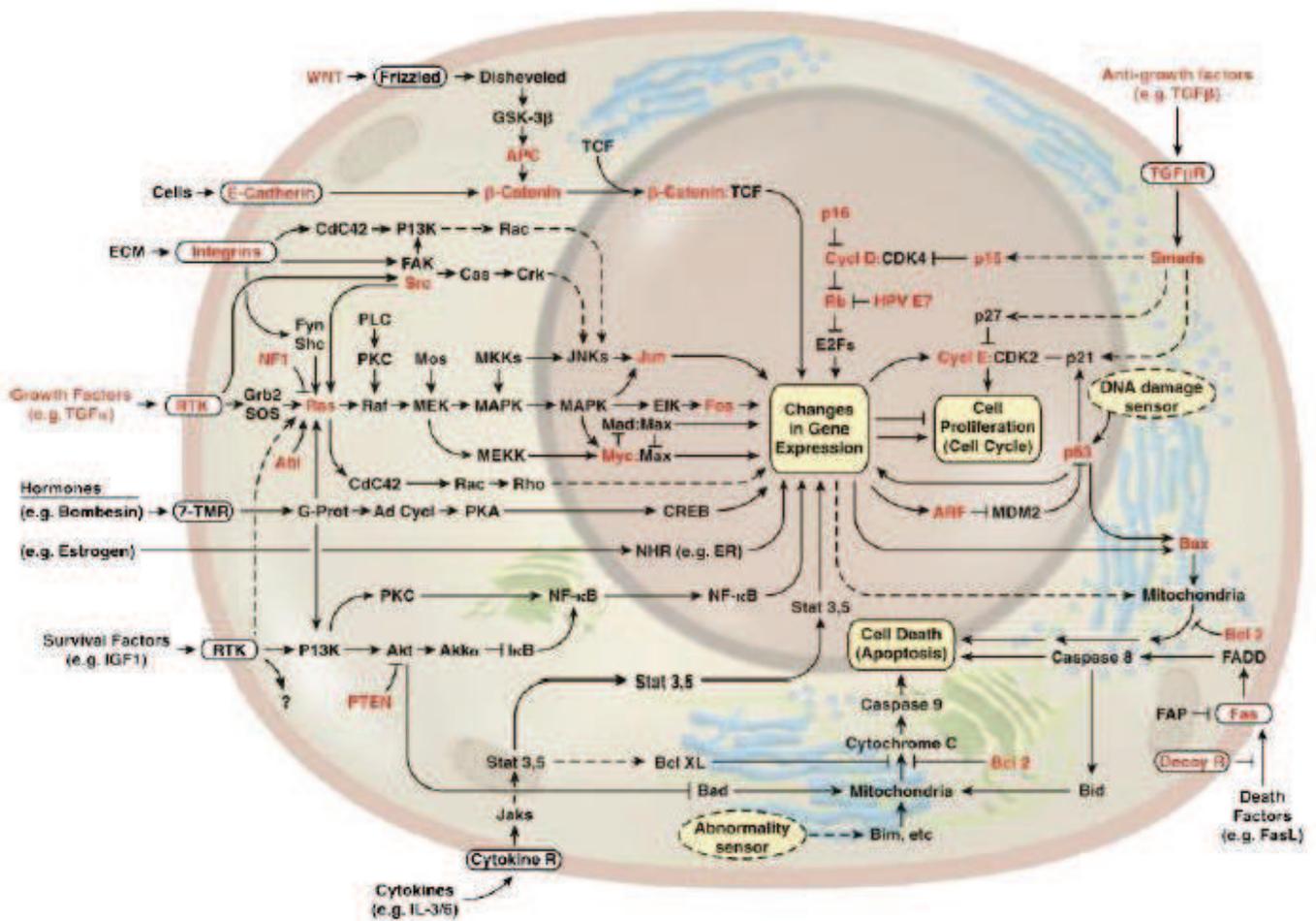


Figure 13: Représentation simplifiée de l'ensemble des voies mises en jeu dans le mélanome uvéal

C'est en tenant compte de l'ensemble de ces voies de signalisations cellulaires exposées dans la figure ci-dessus, ainsi que de leurs mécanismes de régulations que l'on peut commencer à élaborer un raisonnement biologique sur cette maladie.

4.4. Traitements et suivis

Le seul traitement disponible pour le mélanome uvéal a longtemps été l'énucléation. Les premiers traitements conservateurs ont été réalisés dans les années 50 par Stallard qui utilisa la curiethérapie par des plaques de cobalt 60. Puis Zimmerman en 1978 a souligné que l'énucléation n'évitait pas toujours la survenue d'une dissémination métastatique. La curiethérapie au cobalt 60 a progressivement été remplacée par la curiethérapie à l'iode 125. La protonthérapie (ou irradiation par faisceaux de protons) permet une irradiation homogène de la tumeur et existe depuis 1975. Le suivi post-thérapeutique doit être prolongé et rigoureux. Après un traitement conservateur, il doit comporter un examen ophtalmologique tous les trois mois pendant deux ans puis tous les six mois avec échographie de l'œil. En cas de métastases multiples ou diffuses, il est possible de proposer une chimiothérapie soit par voie intraveineuse soit directement dans l'artère hépatique. Les drogues les plus utilisées sont la dacarbazine (Déticène®) et la fotemustine (Muphoran®)³². Elles sont toutes deux classées dans la famille des agents alkylants et agissent directement sur l'ADN. Ces chimiothérapies manquent de spécificité et les cellules touchées ne sont donc pas toujours des cellules cancéreuses. C'est ce qui explique les effets indésirables importants comme la thrombocytopénie, la leucopénie, les vomissements, les douleurs abdominales, les affections hépato-biliaires, les troubles du système nerveux central, l'alopécie, etc. Il est donc important et dans l'intérêt des patients de rechercher des thérapies pharmacologiques plus ciblées afin de limiter la toxicité et d'augmenter l'efficacité anti-tumorale. L'analyse de la littérature scientifique sur la biologie de cette pathologie chez l'homme permet d'isoler certaines voies de signalisations candidates à un ciblage pharmacologique ciblé. Il est important de garder la figure 15 ci-après en tête pour bien appréhender la suite de cette thèse.

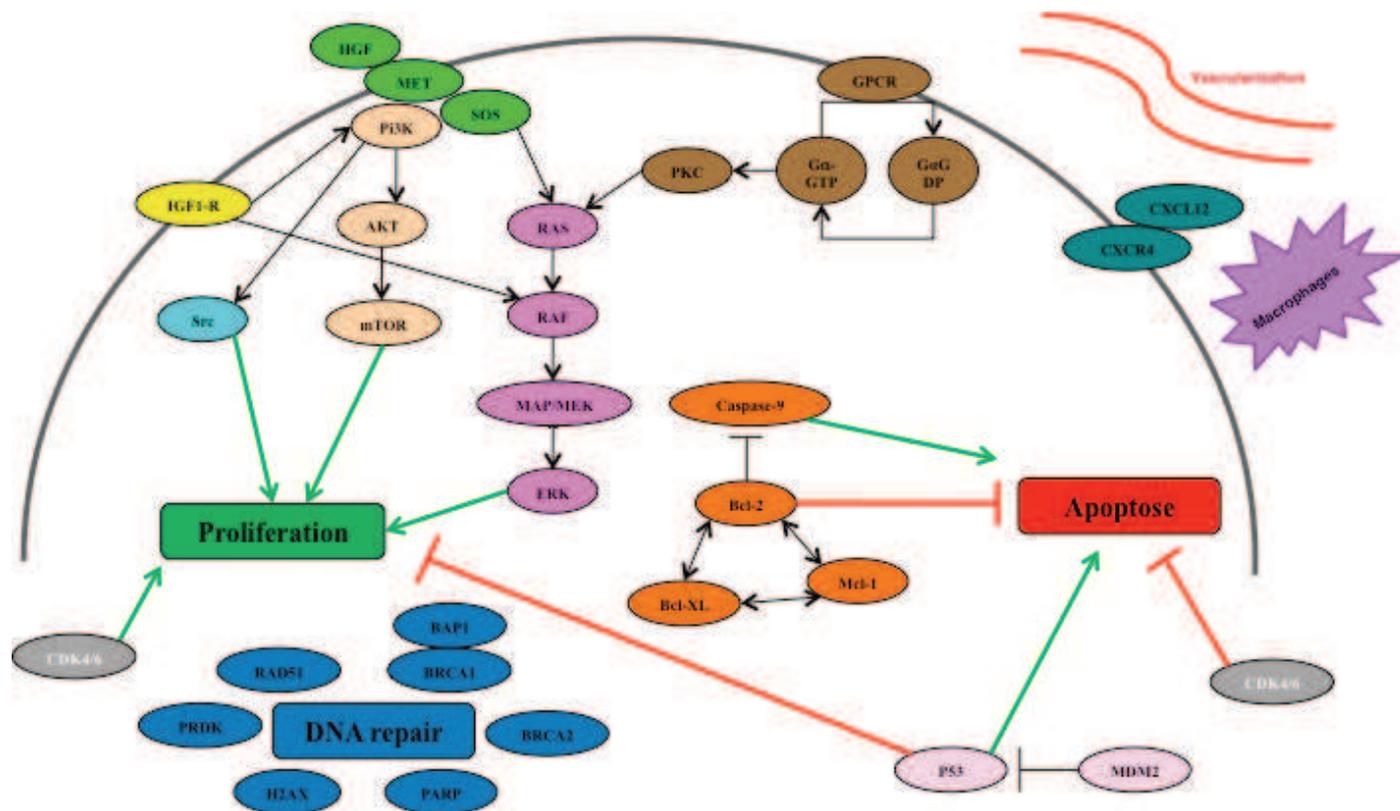


Figure 14: Voies de signalisation cellulaires candidates aux essais thérapeutiques ciblés.

La figure 15 ci-dessus représente les principales voies de signalisations cellulaires candidates à des essais thérapeutiques utilisant des thérapies ciblées. Ces voies de signalisations ont été isolées à partir de données biologiques issues de tumeurs humaines de nombreux patients.

Le mélanome uvéal reste une maladie grave qui met en jeu le pronostic visuel de l'œil atteint et le pronostic vital. Le dépistage précoce améliore considérablement le pronostic. Il est donc important d'examiner soigneusement le fond de l'œil dès qu'il existe une symptomatologie visuelle. Il n'existe pas actuellement de thérapie pharmacologique efficace et ciblée de cette tumeur. Etant donné le mauvais pronostic de cette maladie en cas de dissémination métastatique, il est dans l'intérêt des patients que la recherche scientifique et médicale s'investisse sur cette problématique. Afin de pouvoir faire avancer les connaissances et essayer de proposer des solutions thérapeutiques aussi pertinentes que possibles, j'ai participé à des études précliniques de toxicité et d'efficacité de thérapies ciblées sur le mélanome uvéal ainsi qu'à des recherches de marqueurs prédictifs de réponse aux traitements. Ces études se sont déroulées au sein du laboratoire d'investigation préclinique de l'institut Curie à Paris.

5. Recherche préclinique en cancérologie

5.1. Généralités

Les études précliniques visant à évaluer la toxicité et l'efficacité de molécules thérapeutiques peuvent être réalisées de plusieurs manières. Il existe, par exemple, des expériences *in vitro* réalisées sur des lignées cellulaires. Ces tests se font dans un environnement artificiel qui ne représente pas toujours bien l'environnement d'un tissu humain. Il y a aussi les tests *ex vivo* réalisés sur des tissus obtenus à partir d'un organisme vivant et manipulés hors de leur milieu. Ces deux types de tests ont l'avantage d'être rapides et économiques car ils nécessitent de petites quantités de produit et peu d'entretien. Cependant, les résultats ne reflètent pas toujours ce qu'il se passe dans un organisme vivant et c'est pourquoi on peut s'intéresser particulièrement aux tests *in vivo*. Ces derniers se réalisent sur des organismes vivants, ce qui peut poser des problèmes d'ordres financiers ou d'éthiques mais restent actuellement les tests les plus fiables pour évaluer la toxicité et l'efficacité de molécules en préclinique.

5.2. Xénogreffes Dérivées de Patients (PDX)

5.2.1. Présentation des PDX

Le traitement du cancer est en constante amélioration grâce à une meilleure compréhension de l'oncogénèse et au développement de nouveaux composés ciblés. Les études cliniques évaluant ces composés candidats nécessitent un grand nombre de patients et sont coûteuses, longues et exposent les patients à des risques. Pour choisir les molécules les plus efficaces, la recherche préclinique de composés anti-tumoraux est une étape importante dans le processus de développement de médicaments. On peut utiliser des modèles précliniques de cancer, tels que ceux obtenus à partir de fragments de tumeurs humaines implantées directement dans des souris immunodéficientes. Ces modèles sont appelés xénogreffes dérivées de patients (PDX).

Le développement de PDX constitue un processus à long terme comprenant différentes étapes dont l'objectif final est de montrer que le modèle reproduit fidèlement le cancer humain. Ces modèles doivent proposer une forte valeur prédictive de l'efficacité thérapeutique et imiter de près les situations cliniques fréquemment observées chez les patients atteints de cancer.

Il existe une méthode pour le développement et la maintenance de mélanome de l'uvée (UM) xénogreffé sur des souris immunodéficientes. Cette maintenance tumorale est réalisée à l'animalerie Exempte d'Organisme Pathogènes Spécifiques (EOPS) de l'Institut Curie à Paris.

Un petit morceau de tumeur est implanté dans le coussinet adipeux intrascapulaire (graisse entre les deux omoplates de la souris). La croissance tumorale est ensuite surveillée par le personnel de l'animalerie EOPS jusqu'à ce qu'elle arrive à une taille définie comme la taille éthique. À ce moment-là, l'animal est sacrifié et un morceau de la tumeur est prélevé puis greffé sur une nouvelle souris. Le fait de passer la tumeur d'une souris à une autre est appelé un « passage ». Les modèles seront ensuite caractérisés en fonction du type de tumeur et du nombre de passages qu'a subi la tumeur (exemple MP55p16 signifie : Mélanome Primaire du patient numéro 55 dont la tumeur a subi 16 passages). Les modèles proposés par cette méthode sont validés par plusieurs critères clairement définis. Ces critères évaluent principalement la reproductibilité, la stabilité et la représentativité des modèles par rapport à l'humain. Le modèle doit passer par un contrôle histologique pris en charge par un médecin anatomopathologiste pour prouver l'analogie architecturale cellulaire et histologique. De bonnes analogies doivent ainsi être établies entre le patient et le modèle correspondant ainsi qu'entre les différents passages de ce modèle. On effectue également des contrôles cytogénétiques et génomiques pour mettre en évidence les mêmes mutations (translocation, amplification, mutation ponctuelle, etc) chez les modèles murins que chez l'humain ainsi qu'au travers des passages chez la souris. Enfin, il est nécessaire de confirmer la robustesse des modèles en les confrontant aux mêmes thérapies que l'humain. Si les réponses aux traitements sont comparables, qu'il y a une équivalence génétique et histologique et que ces paramètres ne varient pas au cours des passages, le modèle est alors validé et utilisable par les équipes de recherche. La figure 16 ci-dessous nous propose une illustration des événements.

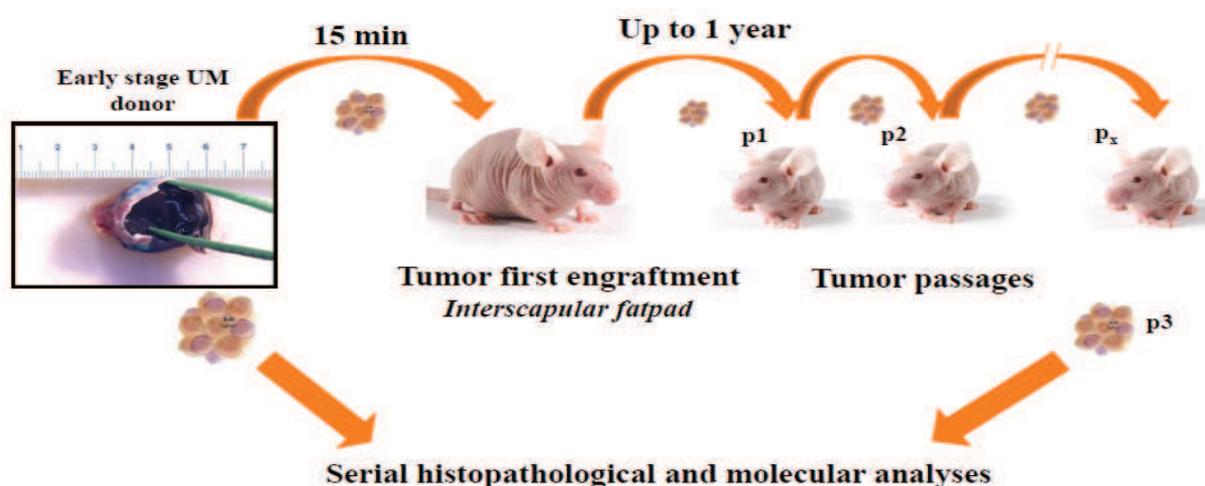


Figure 15: Les différentes étapes de préparation et de validation d'un modèle de PDX

L'intérêt des modèles de xéno greffe dérivés des patients par rapport aux autres types de modèles *in vivo* est d'utiliser des tumeurs humaines qui représenteront au mieux le tissu cible et notamment son hétérogénéité. C'est élément est un avantage qui met en avant les modèles de xéno greffes comme modèle préclinique par rapport aux modèles de souris transgéniques ou aux modèles chimio-induits ou viro-induits. En ce qui concerne le mélanome uvéal, la comparaison des profils génétiques des tumeurs humaines à leurs xéno greffes montre un bon coefficient de corrélation⁴⁰. Les tumeurs ont été analysées pour le statut mutationnel de *GNAQ*, *GNAI1*, *GNAS*, *GNAI5*, *BAP1*, et *BRAF*, ainsi que pour les altérations génomiques fréquemment observées dans le mélanome uvéal. Les PDX de mélanomes uvéaux récapitulent précisément les caractéristiques génétiques des tumeurs primaires humaines et font preuve de stabilité génétique au cours de leur entretien *in vivo* (à travers les multiples passages). La robustesse du modèle est confirmée par les caractéristiques histologiques et thérapeutiques.

La xéno greffe nécessite l'utilisation de souris immunodéficientes. Au cours des travaux qui vous seront décrits dans la suite de cette thèse, on a utilisé des souris SCID (Severe Combined Immunodeficient) présentant une mutation sur un locus du chromosome 16. Cette anomalie génétique est responsable d'un défaut enzymatique de Prkdcscid⁴⁶ (Protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide). On observe alors une absence de réparation de l'ADN et de réarrangement VDJ (TCR et BCR). Ces souris sont donc dépourvues de lymphocytes B et T même s'il faut savoir que la littérature scientifique a déjà décrit la génération de cellules T et B spontanément avec l'âge de la souris ainsi que la présence d'une immunité innée résiduelle (granulocytes, NK et macrophage).

5.2.2. Limites des modèles

Les modèles de xéno greffes dérivées de patients sont donc de très bons modèles pour améliorer la compréhension des mécanismes du cancer ou évaluer l'efficacité des traitements. Cependant, ces modèles ont aussi leurs limites. La première contrainte est la difficulté de prise de greffe initiale de la tumeur primaire du patient directement implantée chez la souris. La différence d'espèce est donc la première barrière à franchir. C'est la raison pour laquelle il est nécessaire de réaliser cette greffe sur des souris immunodéficientes. Du fait que les souris SCID soient immunodéprimées, il se crée un biais par rapport à ce que l'on pourrait observer chez un patient immunocompétent. Nous savons maintenant que le système immunitaire joue un rôle déterminant dans la protection naturelle de l'organisme contre le cancer. Les PDX sont donc des modèles incompatibles avec les études sur les immunothérapies pures (type vaccination antitumorale).

La deuxième limite de ces modèles est l'environnement tumoral qui reste murin et qui peut être responsable de biais au moment de l'analyse des résultats par rapport à ce que l'on observe chez le patient.

Actuellement les PDX sont considérées comme les modèles *in vivo* les plus fidèles aux caractéristiques cliniques et biologiques. Les équipes de recherche possédant une banque de xénogreffes disponibles pour différentes tumeurs sont encore peu nombreuses dans le monde. Le département de recherche translationnelle de l'Institut Curie est donc dans une dynamique novatrice et favorise une bonne coordination entre la recherche préclinique et la recherche clinique. Ceci permet d'optimiser la diffusion des connaissances et d'avancer vers des propositions de solutions thérapeutiques toujours plus performantes.

Problématique

En raison du risque très élevé de métastases hépatiques (50% des patients), le pronostic des patients atteints d'UM reste défavorable. Afin d'améliorer leur devenir, de nouvelles thérapies sont donc nécessaires. Dans ce contexte, l'utilisation de modèles précliniques prédictifs devrait aider au développement de nouvelles thérapies ciblées.

En conséquence, la problématique que je me suis posée et à laquelle j'ai tenté de répondre au cours de mon projet est la suivante :

Peut-on prédire l'efficacité d'une thérapie ciblée sur le mélanome uvéal grâce à l'utilisation de modèles de xénogreffe ?

Objectifs

Dans le cadre de ce projet, l'utilisation des PDX comme modèles de cancers a pour objectifs :

- La détermination de différents ciblage moléculaires d'intérêt spécifique à chaque modèle de mélanome uvéal humain disponible dans la banque de xénogreffes.
- L'évaluation du bévacicumab comme agent anticancéreux sur des modèles de mélanomes uvéaux humains.
- La recherche d'une signature prédictive de réponse au bevacizumab.

Matériels et méthodes

1. Méthode de xénogreffe et suivi des modèles :

1.1. Xénogreffe

La souris est anesthésiée en administrant par voie intrapéritonéale un mélange de kétamine (50mg/kg) et de xylazine (10mg/kg) préparé quelques minutes avant l'utilisation. Après avoir constaté l'efficacité de l'anesthésique en testant les réflexes de la souris (pincement des pattes), on désinfecte le dos de l'animal en appliquant de la chlorexidine. À l'aide d'une pince et de ciseaux de chirurgie, on fait une courte incision de la peau de l'animal entre les deux omoplates. On tire légèrement sur le coussin adipeux afin de pouvoir le manipuler à l'extérieur de l'animal. Une fois ce coussin visible de l'extérieur, on y réalise une incision afin de pouvoir y glisser un petit morceau de tumeur préalablement découpé avec un scalpel sur la biopsie de patient. Lorsque le fragment de tumeur est logé dans le coussin adipeux, on réintroduit ce dernier sous la peau entre les omoplates de la souris. Il ne reste donc plus qu'à agraffer l'incision et à surveiller le réveil de la souris dans un milieu chaud pour éviter l'hypothermie.

Ce type d'intervention sur l'animal nécessite plusieurs prérequis. Tout d'abord les locaux doivent posséder une agrémentation. Cet agrément précise les espèces animales hébergées, le domaine d'activité et la nature des protocoles expérimentaux en usage. Il est délivré pour 5 ans. Les dossiers de "demande d'agrément d'un établissement d'expérimentation animale" sont traités par la direction départementale de protection des populations (DDPP). De plus, toute personne se livrant à des études sur des animaux doit être titulaire d'une autorisation nominative d'expérimenter (ou à défaut, ne pratiquer que sous la responsabilité d'une personne titulaire de cette autorisation). L'autorisation est valable 5 ans et est accordée pour des expérimentations et des espèces données. Je fus le seul membre de l'équipe à pouvoir déroger à cette règle car mon temps d'expérimentation (6 mois) était suffisamment court pour qu'un simple encadrement par un expert soit suffisant pour manipuler. Cet expert était en plus, membre du comité d'éthique de l'institut Curie.

Dans le domaine de l'expérimentation animale, la directive européenne n°2010/63/UE, révisant la directive n°86/609/CEE du Conseil du 24 novembre 1986 est applicable en France depuis le 1er janvier 2013. Ce dispositif réglementaire européen a été transposé en France depuis le 1 février 2013 par décret et par quatre arrêtés ministériels.

Il en résulte qu'à compter de cette date, toute expérimentation animale doit faire l'objet d'une déclaration officielle au ministère. Celui-ci est à présent en charge de définir les modalités d'agrément des établissements utilisant des animaux à des fins scientifiques, les modalités d'autorisation des projets et procédures utilisant des animaux à des fins scientifiques, les modalités d'acquisition et de validation des compétences des personnels travaillant au sein des établissements utilisant des animaux à des fins scientifiques et enfin les modalités de fourniture des établissements en animaux à des fins scientifiques.

1.2. Mesures et inclusions

Une fois la greffe effectuée, il y a une période pendant laquelle le fragment de tumeur ne grossit pas. La période entre la greffe et l'inclusion est appelée le temps de latence et est spécifique de chaque modèle tumoral. En effet, l'expérience nous a montré que certains modèles débutent leur croissance plus rapidement que d'autres. De même, une fois la croissance initiée, la vitesse de celle-ci est spécifique du modèle étudié. Pour caractériser la croissance tumorale d'un modèle, on cherche donc à définir le temps de latence et la vitesse de croissance du modèle. Il existe une formule mathématique simple qui permet d'approximer le volume de la tumeur grâce à la mesure de la longueur et de la largeur de celle-ci directement sur l'animal.

$$\text{Volume tumoral} = \text{Longueur} \times \text{Largeur} \times (\text{Largeur}/2)$$

Une souris xéno greffée est incluse dans une étude lorsque la tumeur a atteint un volume compris entre 62,5mm³ et 256mm³. La mesure s'effectue à l'aide d'un pied à coulisse de précision. La souris vigile doit être contentionnée le temps de la mesure de façon à ce que cette dernière soit reproductible.

Lorsqu'il y a suffisamment de souris éligibles pour l'inclusion, des groupes de souris randomisés et stratifiés sur la taille sont réalisés. De cette façon, on obtient des groupes homogènes et comparables statistiquement.

1.3. Traitements

Les traitements administrés aux souris sont soit des médicaments à usage humain, soit des produits appelés « futurs médicaments ». De manière empirique, il a été décidé que la dose initiale administrée à la souris (en mg/kg) correspond à trois fois la dose utilisée chez l'homme en raison d'un métabolisme plus rapide. Dans le cas des futurs médicaments, la dose initiale utilisée est choisie à la vue des résultats décrits dans la littérature.

En fonction des résultats de l'étude de toxicité, on détermine la dose optimale. On effectue alors des reconstitutions de thérapies anticancéreuses à usage humain puis on applique la dilution adéquate pour l'administration chez la souris. Le mode d'administration est respecté de façon à être le plus proche possible de la réalité clinique et minimiser les biais d'administrations.

1.4. Récupération des données

Deux fois par semaine, des mesures sont effectuées pour le poids de la souris (pesée) et pour le volume tumoral (pied à coulisse). Ces données sont répertoriées dans des matrices de calculs informatisés permettant de faire un archivage, un traitement de données (calcul des moyennes, écarts types, inhibition de la croissance tumoral (TGI), délai de la croissance tumoral (TGD etc) et des modélisations graphiques qui permettent d'apprécier l'évolution du poids moyen des souris par groupe (toxicité du traitement) et du volume tumoral par groupe (efficacité du traitement).

1.5. Prélèvements et sacrifices

Au moment de finir une étude et donc de sacrifier les souris, on effectue des prélèvements tumoraux, pulmonaires et hépatiques (recherche de métastases) qui seront ensuite analysés sous deux angles différents. L'analyse histologique par un médecin anatomopathologiste permet de réaliser une caractérisation cellulaire et architecturale de notre modèle. Ce type d'analyse nécessite de conserver le prélèvement préalablement fixé par un agent fixateur comme le paraformaldéhyde. Une analyse de biologie moléculaire permet de mettre en évidence le niveau d'expression génique en utilisant la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative (qPCR) mesurant la quantité d'ARN. Le niveau d'expression protéique est également étudié par western blots et puces protéiques en phase inverse (RPPA).

Ce type d'analyse implique une bonne conservation des protéines et de l'ARN qui sont des matériaux très sensibles (RNase, protéases, phosphatase, etc).

La conservation s'effectue par une première étape de congélation dans des cryotubes en azote liquide à -196°C , puis par une seconde étape de stockage de ces échantillons à -80°C . A cette température, la cinétique enzymatique est nulle et nos échantillons restent donc intacts.

La taille des tumeurs sur la souris nécessitant un sacrifice éthique est définie à 2000 mm^3 . Si la taille de la tumeur atteint cette valeur avant la fin de l'étude, l'animal est sacrifié et comptabilisé dans les décès.

En effet, on considère qu'au-dessus de cette taille les résultats d'efficacité ne sont pas satisfaisants et le seuil de souffrance tolérable chez l'animal est atteint. Le sacrifice des animaux est effectué soit par dislocation cervicale (méthode de sacrifice individuel employée pour sacrifier un petit nombre d'individus) soit par asphyxie dans une chambre à CO₂ (méthode de sacrifice collectif utilisée pour sacrifier un grand nombre d'individus simultanément).

2. Recherche de cibles thérapeutiques protéiques

2.1. Définitions

Une cible thérapeutique protéique correspond à une protéine dont le niveau d'expression est modifié spécifiquement dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales. La modification de ce niveau d'expression peut être à la base d'un mécanisme favorisant le développement de la maladie. Une fois cette différence mise en évidence et démontrée comme statistiquement significative, on peut tester différentes molécules capables de cibler cette protéine ou les mécanismes de régulation de l'expression de celle-ci chez la souris. Lors de mes travaux, le niveau d'expression protéique a été évalué grâce à la méthode RPPA et par western blot.

2.2. Broyage des échantillons tumoraux

Nous avons réalisé le broyage et la lyse de nos échantillons tumoraux provenant de 17 modèles de mélanomes uvéaux pour permettre leur exploitation en RPPA et en western blot. Le matériel utilisé a été le « Tissue Lyser de Qiagen ».

Les échantillons ont donc préalablement été sortis du congélateur (-80°C) afin d'être décongelés à température ambiante. Les échantillons ont d'abord été pesés dans des tubes eppendorf de 2mL.

Le tampon Laemmli 1X (de lyse) a été préparé à partir de 50 mM Tris pH=6,8 ; 2% SDS ; 5% glycérol ; 2 mM DTT à 1M ; 2,5 mM EDTA ; eau QSP volume souhaité. Les inhibiteurs de phosphatases et inhibiteurs de protéase sont à ajouter au dernier moment. À température ambiante, on met deux fois plus d'inhibiteurs. Deux mM d'Orthovanadate de sodium (inhibiteur de phosphatases) et 10mM de Sodium Fluoride (inhibiteur de protéases) ont donc été ajoutés.

Les échantillons ont été mis dans le tampon de lyse à raison de 10 mg de tumeur pour 100 μ L de tampon. Deux billes en inox sont insérées dans les tubes eppendorf avant de refermer ces derniers et de les fixer sur la machine de broyage. La machine a été programmée pour broyer 2 fois 2 minutes à 30Hz. Les tubes ont ensuite été bouillis pendant 10 minutes à +100°C avant la centrifugation 15 minutes à 13000 tours par minutes à 20°C. Le fond du tube correspondait à un culot de débris dans lequel on retrouvait les billes. Au-dessus on observait notre phase de lysat protéique. Enfin, en surface, se trouvait la fraction lipidique. Le lysat protéique a été récupéré dans un nouveau tube en évitant les lipides. Ce lysat a été centrifugé à 13000 tours par minute pendant 5 minutes à 20°C afin de récupérer un lysat protéique purifié.

Dix μ L de chaque échantillon ont été prélevés pour mesurer la Densité Optique (DO) et déterminer la concentration des protéines avec le Kit commercial « BCA reducing agents compatible, Pierce ». Les dilutions nécessaires ont été réalisées dans le Laemmli 1X afin d'obtenir une concentration protéique globale identique dans chaque tube. La concentration protéique finale des tubes a été fixée à 1mg/ml.

2.3. Western blot

L'analyse protéique par western blot a été réalisée sur nos 17 modèles de mélanomes uvéaux à partir des échantillons issus du broyage.

2.3.1. Migration électrophorétique gel d'acrylamide (Bio-Rad TGX 4-15%)

Un litre de tampon de migration 1X (running buffer 1X) a été préparé en diluant 100 mL de Running buffer 10X dans 900 mL d'eau pure. Les gels d'acrylamide ont ensuite été rincés à la pissette d'eau. Les peignes ont été retirés et les puits rincés à l'eau. Les gels ont été installés dans une cuve contenant les électrodes (4gels par cuve). Cette cuve a ensuite été remplie de running buffer 1X préalablement préparé. Dix μ L des échantillons rapportés à la même concentration protéique ont été déposés au fond des différents puits. Sur les 15 puits, 13 sont occupés par les échantillons protéiques, un par le ladder qui permettra de connaître le poids des protéines en fonction de leur distance de migration.

Enfin, le dernier puits est occupé par un contrôle positif. Celui-ci contient un lysat protéique d'une lignée cellulaire connue pour surexprimer la protéine d'intérêt. Tous les puits de chaque gel doivent être occupés pour éviter l'effet de bord et permettre une migration droite. Pour chaque protéine testée, quatre gels ont été utilisés. Les puits libres du quatrième gel ont donc été remplis par du tampon Laemmli 1X. Les électrodes sont ensuite branchées au générateur et au couvercle de la cuve.

La migration a été faite à 30 mV à température ambiante jusqu'à ce que les échantillons soient rentrés dans le gel, puis le voltage a été augmenté à 120 mV pour accélérer la migration. La migration dure environ 1h30.

2.3.2. Transfert semi sec avec système Bio-Rad®

Une fois sorties de la cuve, les plaques de plastiques qui protègent les gels, ont été cassées avec un levier. Les trois bords des gels ainsi que les puits ont ensuite été coupés. Après avoir trempé les gels dans le tampon de migration, ils ont été disposés sur des membranes de nitrocellulose commerciales déjà préparées. On pouvait disposer deux gels par membrane et transférer sur deux membranes dans la même machine. La machine de transfert Bio-Rad® pouvait donc transférer les protéines de quatre gels différents répartis sur deux membranes à la fois et le tout en 7 minutes.

2.3.3. Coloration aspécifique des protéines au MemCode

Après le transfert, les membranes ont été récupérées et immergées dans du MemCode pendant 10 minutes sous agitation pour effectuer le marquage aspécifique des protéines. Au bout de 10 minutes, trois lavages successifs à l'eau pure ont été effectués. A ce stade, on voyait apparaître les protéines sur les membranes. Ces dernières ont alors été rincées avec du TBS/0,1%Tween pendant 5 minutes pour enlever l'acidité du MemCode.

2.3.4. Saturation des membranes

Le tampon de saturation a été préparé avec du TBS/0,1%Tween et 5% de BSA. Les membranes ont été immergées dans le tampon de saturation pendant 1h à température ambiante sous agitation. Cette étape a été réalisée dans le but d'éliminer le bruit de fond dû aux liaisons aspécifiques entre la membrane et l'anticorps primaire.

2.3.5. Fixation de l'anticorps primaire

L'anticorps primaire spécifique de la protéine étudiée a été dilué jusqu'à obtention de sa concentration optimale dans du tampon de saturation.

Chaque membrane a ensuite été immergée dans 5mL de solution d'anticorps primaire pendant 2h sous agitation à température ambiante. Ensuite, les membranes ont subi quatre lavages consécutifs de 5 minutes avec du TBS/0,1%Tween.

2.3.6. Fixation de l'anticorps secondaire

L'anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire et couplé à l'HRP (enzyme de révélation) a été dilué au 1/1000^{ème} dans du tampon de saturation (20 µL d'anticorps primaire

dans 20 mL de BSA pour quatre membranes). Chaque membrane a ensuite été immergée dans 5mL de solution d'anticorps secondaire pendant 45 minutes sous agitation à température ambiante. Ensuite, les membranes ont subi quatre lavages de 5 minutes consécutifs avec du TBS/0,1%Tween.

2.3.7. Révélation

Pour cette étape, on a utilisé une caméra LAS 3000. Les membranes ont été déposées sur la plaque d'une caméra CCD afin de prendre une image en méthode EPI (exposition 1/30 second). L'image a ensuite été enregistrée pour être traitée ultérieurement. Ensuite, une solution d'amplification de la chemiluminescence (ECL) a été préparé avec 4,2 mL de Super signal® West Pico Stable Peroxide Solution et de 4,2 mL de Super signal® West Pico Luminol/Enhancer Solution. Deux mL de la solution d'ECL ont été déposés sur chaque membrane directement sur la plaque afin de prendre des images en méthode chemiluminescence (exposition 1 minute et 5 minutes).

2.3.8. Quantification du signal

La quantification du signal a été réalisée grâce au logiciel « Multigauge » qui peut évaluer l'intensité de la coloration de zones sélectionnées sur une photographie. En sélectionnant les zones où la protéine d'intérêt s'est accumulée, il est possible de quantifier l'intensité de la coloration de ces zones. Cette intensité est proportionnelle à la concentration de la protéine étudiée. Grâce à cette technique, on a comparé les données obtenues à partir de nos échantillons à un contrôle positif. Ainsi on a pu déterminer les modèles surexprimant les protéines étudiées. C'est grâce à cette méthode que le profil d'expression protéique de différents modèles de xénogreffes peut être analysé par Western blot. Ces analyses sont nécessaires pour être comparées aux résultats obtenus par la méthode RPPA car cette dernière est beaucoup plus récente et nous propose moins de recul quant à la fiabilité de ses résultats. De plus la méthode RPPA nécessite une plateforme de biologie moléculaire spécialisée et une main d'œuvre qualifiée et disponible tandis que le western blot présente moins de contrainte de réalisation et peut être effectué par notre équipe.

Grâce à l'analyse de l'expression protéique, il sera possible de stratifier nos différents modèles et d'orienter nos choix sur les thérapies à tester.

2.4. Puces protéiques en phase inverse (RPPA)

La RPPA (Reverse Phase Protein Array) est une technologie qui permet d'étudier les protéines et leur état d'activation dans des échantillons biologiques (tissus, cellules) en haut

débit. Les protéines étudiées forment des voies de signalisation cellulaires qui contrôlent le comportement des cellules et sont fréquemment altérées dans les cellules tumorales. La RPPA est une technologie de puces protéiques permettant d'allier le haut débit à une faible consommation de matériel biologique. Grâce à un robot, les protéines extraites de tissus ou de cellules sont déposées sur une lame de microscope (puce). Les protéines d'intérêt sont ensuite étudiées à l'aide d'anticorps très spécifiques. Robuste et quantitative, elle permet de déposer seulement 1ng d'extrait protéique, et d'analyser jusqu'à un millier d'échantillons simultanément sur la même puce. Cette gamme d'anticorps couvre la plupart des voies de signalisation cellulaire. Grâce à cette méthode, on a fait analyser le profil d'expression protéique des différents modèles de xéno greffes de mélanomes uvéaux à partir des échantillons broyés que l'on a réalisés. Les manipulations RPPA ont été réalisées sur la plateforme de biologie moléculaire à l'hôpital St Louis et les résultats nous ont été envoyés sous forme de données brutes. Les études qui seront effectuées à partir de ces données nous permettront de rechercher des variations du niveau d'expression protéique de plusieurs protéines d'intérêts. Les résultats ont ensuite subi un traitement statistique réalisé par l'entreprise Genosplice afin de pouvoir être interprétés. L'objectif de cette analyse protéique à grande échelle est d'orienter nos choix quant aux protéines relevantes à analyser par le biais d'autres techniques.

3. Evaluation *in vivo* du bevacizumab

3.1. Contexte de l'étude

L'équipe de recherche dans laquelle je travaillais a dû faire face à des contraintes de timing imposées par certains commanditaires. On a été forcé de démarrer des études de toxicité avant d'avoir obtenu les résultats de nos recherches de cibles moléculaires à haut potentiel. La suite des expériences va donc porter sur l'évaluation du bévacizumab comme solution thérapeutique ciblée pour lutter contre le mélanome de l'uvéa. Le bévacizumab est un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF-A lui-même impliqué dans le mécanisme de l'angiogenèse.

Ce médicament a donc pour objectif principal de réduire la néovascularisation tumorale afin de priver la tumeur de certains éléments nécessaires à son développement et qui sont en partie acheminés par le sang.

Ce traitement n'a pas la prétention d'être spécifique à la pathologie d'intérêt mais nos connaissances déjà avancées sur celui-ci en font un bon modèle pour la mise au point d'un protocole de recherche visant à établir une signature minimum prédictive de réponse au traitement.

3.2. Études de toxicité

Les animaux utilisés sont hébergés en animalerie EOPS dépendante d'un comité d'éthique animale qui évalue et autorise toutes les expériences réalisées sur des animaux. L'étude de toxicité du bevacizumab a été réalisée sur des souris non greffées. Les souris sont identifiées par un système de numérotation aux oreilles afin d'être suivies tout au long de l'étude. Elles ont ensuite été réparties dans deux cages. Une cage correspondant au groupe contrôle (solvant NaCl 0,9%) et l'autre au groupe traité (bevacizumab). Chaque groupe était composé de 10 souris. Une solution de bevacizumab injectable avec une concentration de 3 mg/ml a été préparée à partir d'un flacon pour usage humain concentré à 25 mg/ml. Le solvant utilisé pour la dilution a été le NaCl 0,9%. Une injection intrapéritonéale de bevacizumab à 30 mg/kg une fois par semaine et pendant une durée de 7 semaines a été effectuée sur le groupe traité. Le choix de la posologie testée a été fait à partir des pratiques cliniques⁴⁷⁹. La dose utilisée chez l'homme ramenée au poids de l'individu est conventionnellement triplée chez la souris (car le métabolisme murin est plus actif). Le critère principal de toxicité est la perte de poids. Un produit est considéré comme toxique s'il est responsable d'une perte de poids supérieure ou égale à 20% du poids initial de l'animal. Des mesures du poids de toutes les souris ont donc été effectuées à l'aide d'une balance de précision deux fois par semaines et reportées dans une matrice de calcul Excel. Cette matrice a permis de faire des courbes décrivant l'évolution du poids moyen des souris d'un même groupe, rapporté à leur poids moyen initial. Ce rapport de poids a été comparé entre les souris du groupe contrôle et les souris du groupe traité. À la fin de l'étude, toutes les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale.

3.3. Études d'efficacité

Plusieurs modèles sont générés par xénogreffe à partir de différentes tumeurs provenant de la banque de xénogreffes de l'institut Curie. Pour l'étude d'efficacité, quatre modèles disponibles ont été choisis pour ce projet : MP34, MP41, MP46 et le MP55.

Des mesures du volume tumoral et du poids de toutes les souris ont été effectuées deux fois par semaines à partir de la date de greffe. L'étude commence avec l'inclusion des souris lorsque le volume tumoral a atteint une taille comprise entre $62,5\text{mm}^3$ et 256mm^3 . À partir de ce moment-là, pour chaque modèle, les souris ont été réparties en deux groupes. Un groupe contrôle (rituximab correspondant à un contrôle isotypique) de 10 souris et un groupe traité (bevacizumab) de 10 souris ont été formés. Les groupes de souris ont été randomisés au sein de chaque modèle et stratifiés sur la taille des tumeurs. L'étude a donc été réalisée sur huit groupes de souris xénogreffées avec 10 souris par groupe. Les souris sont identifiées par un système de numérotation aux oreilles afin d'être suivies tout au long de l'étude. Les administrations intrapéritonéales de rituximab et de bévacizumab ont été débutées au jour d'inclusion. La posologie utilisée pour le rituximab et le bévacizumab a été de 30 mg/kg une fois par semaine. Cette posologie a été démontrée non toxique et administrée pendant la durée nécessaire au groupe contrôle de chaque modèle pour que leurs tumeurs atteignent la taille éthique. Les mesures sont effectuées deux fois par semaines pendant la période d'administration des produits. Les résultats de ces mesures ont ensuite été reportés dans une matrice de calcul Excel. Cette matrice a permis de faire des courbes décrivant l'évolution du poids moyen des souris et de la taille moyenne de leurs tumeurs en fonction des groupes auxquels elles appartenaient. Ces données ont été rapportées aux données relevées au jour d'inclusion.

À la fin de l'étude, les souris ont été sacrifiées individuellement par dislocation cervicale. Au sacrifice, on a réalisé des prélèvements des tumeurs primaires du groupe contrôle et du groupe traité afin de pouvoir réaliser des comparaisons cellulaires et moléculaires de ces prélèvements. À partir des données d'efficacité du bevacizumab sur nos différents modèles et de la comparaison du niveau d'expression génique pour différents gènes des groupes contrôles, on a pu rechercher des marqueurs prédictifs positifs et négatifs. La comparaison du niveau d'expression génique entre les groupes contrôles et les groupes traités nous a permis d'observer l'influence du traitement sur l'expression de certains gènes. Des prélèvements hépatiques et pulmonaires ont également été effectués pour la recherche de métastases et le cas échéant, ont permis leur caractérisation sur le plan histologique et moléculaire.

4. Recherche de marqueurs prédictifs

On a cherché à mettre en évidence une signature minimale prédictive de bonne ou de mauvaise réponse au bevacizumab grâce à l'utilisation des modèles MP34, MP41, MP46 et MP55.

Cette signature sera déterminée à partir de la comparaison du niveau d'expression génique moyen des souris des groupes contrôles de nos différents modèles en tenant compte des résultats de l'étude d'efficacité réalisée sur ces mêmes modèles. En effet, il convient de catégoriser les modèles à partir de la comparaison de deux paramètres différents possédant chacun deux sous-groupes. Le premier paramètre concerne la sensibilité au traitement. Les modèles peuvent alors être sensibles ou résistants au traitement. Le second paramètre concerne le niveau d'expression génique. Le gène d'intérêt peut être surexprimé ou non sur les modèles étudiés. Une fois ces deux paramètres identifiés, l'interprétation des résultats permettra de déduire les marqueurs prédictifs recherchés.

Les prélèvements réalisés au sacrifice de l'étude d'efficacité ont donc été décongelés afin d'en extraire l'ARN. L'extraction et l'analyse ARN par qPCR a permis de faire la quantification du niveau d'expression génique de plusieurs gènes d'intérêt en cancérologie (voir tableau annexe 6). Cette quantification a été réalisée dans une plateforme de biologie moléculaire à l'institut Curie. Une fois l'analyse de l'expression génique des modèles effectuée, les données brutes nous ont été fournies. À partir de ces données brutes on a réalisé des graphiques boxplots et histogrammes pour faciliter la lecture et l'interprétation des résultats.

Résultats

1. Caractérisation des modèles

1.1. RPPA

La technique de RPPA a donné des résultats indiquant les protéines surexprimées en fonction des modèles étudiés. Il s'agit plus précisément d'une étude comparative du niveau d'expression des protéines d'intérêts entre les différents modèles. Ainsi les résultats obtenus sont relatifs des modèles étudiés. En utilisant cette méthode, on a cherché à déterminer parmi nos modèles, ceux qui exprimaient le plus les protéines étudiées par rapport aux autres.

La liste des protéines étudiées en utilisant cette méthode est disponible dans l'annexe 5. Le tableau 1 ci-après nous expose les résultats obtenus à partir de cette méthode.

Modèles	MM26	MM33	MP34	MP38	MP41	MP42	MP47	MM52	MM66	MM74	MM80
Protéines surexprimées	Bcl-xL	NF- κB	PI3K	Notch	JAK	Bcl-xL	Bcl-xL	Bcl-xL	NF- κB	Bcl-xL	JAK
	PARP	TGF- β	MAPK	NF-κB	Src		JAK		TGF- β	JAK	
	Src	PARP	FAK	Bcl-xL			AR		PI3K	AR	
	AR	Src	JAK	MAPK					PARP		
			Src	JAK					Met		
			AR	Src							

Tableau 1: récapitulatif des résultats RPPA

Ce tableau présente les protéines triées par modèle qui ont montré une surexpression relative à l'ensemble des modèles étudiés.

On observe que seulement onze des dix-sept modèles étudiés présentent une surexpression relative d'au moins une des protéines étudiées. Il faut garder à l'esprit que nos travaux sont inscrits dans une démarche tournée vers la recherche et le développement de futurs médicaments ou de nouvelles autorisation de mise sur le marché (AMM) pour des médicaments déjà présents sur le marché. Après l'analyse des résultats de ce tableau, on décide donc de s'intéresser principalement aux protéines retrouvées surexprimées dans plusieurs modèles. Ces protéines constituent des cibles candidates parmi lesquelles on retrouve notamment la protéine Bcl-xL et les protéines des voies PI3K/AKT/mTOR et MAPK.

1.2. Western blot

On sait que la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) est une protéine qui est fortement exprimée par tous nos modèles. Afin de mettre en évidence la capacité de la technique à présenter les protéines cellulaires sur les membranes étudiées, on a réalisé le marquage de l'expression de la protéine GAPDH pour chacun de nos modèles sur les membranes de nitrocellulose. Dans le cas où le western blot ne met pas cette protéine en évidence, on peut invalider la technique et on doit alors chercher à améliorer notre protocole ou changer de technique. On a utilisé les lignés cellulaires BT20 et NIH3T3 comme contrôles positifs.

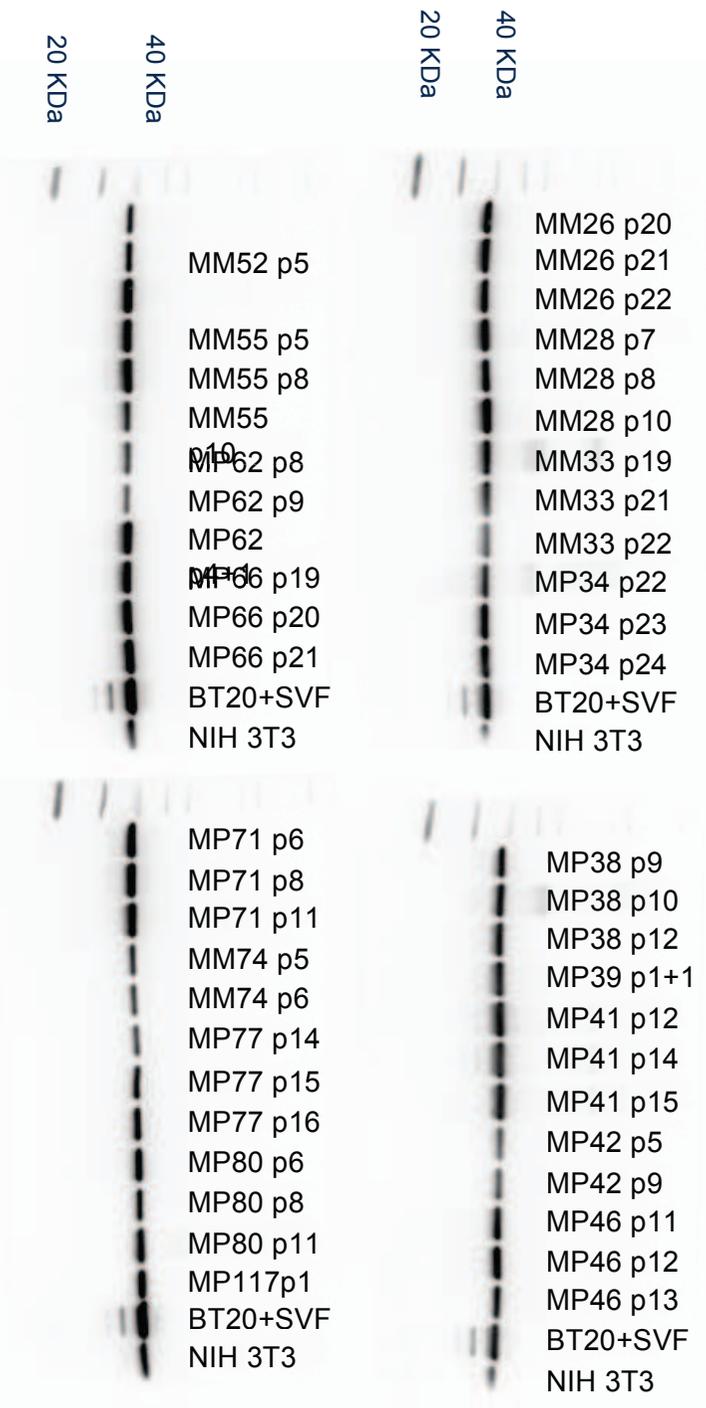


Figure 16: Mise en évidence de l'expression de la protéine GAPDH

La protéine GAPDH est une protéine qui possède un poids moléculaire de 38 KDa. D'après la figure 18 ci-dessus, GAPDH est retrouvée comme attendue dans tous nos modèles. On peut donc conclure que la migration sur gels et le transfert des protéines sur les membranes se sont correctement déroulés. Une fois la présence des protéines cellulaires sur les membranes confirmée, on a cherché à mettre en évidence différentes protéines d'intérêts telle que Bcl-XL comme proposé dans l'exemple ci-dessous. Une fois de plus, les lignés cellulaires BT20 et NIH3T3 ont été utilisées comme contrôles positifs.

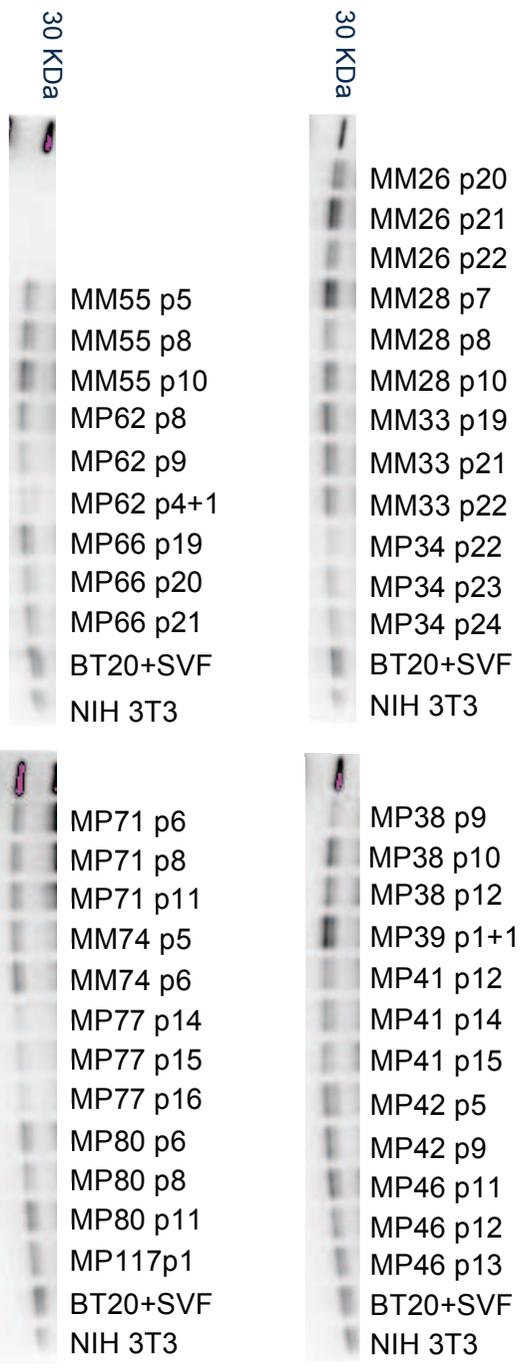


Figure 17: Mise en évidence de la protéine Bcl-XL par western blot

La protéine Bcl-XL est une protéine qui possède un poids moléculaire de 30 KDa. D'après la figure 19 ci-dessus, Bcl-XL est retrouvée chez tous nos modèles dans des proportions différentes. Les résultats des analyses western blot ont ensuite été traités par le logiciel Multigaue permettant de faire une évaluation semi quantitative du niveau d'expression des protéines étudiées. Les résultats sont présentés dans la figure 20 ci-dessous.

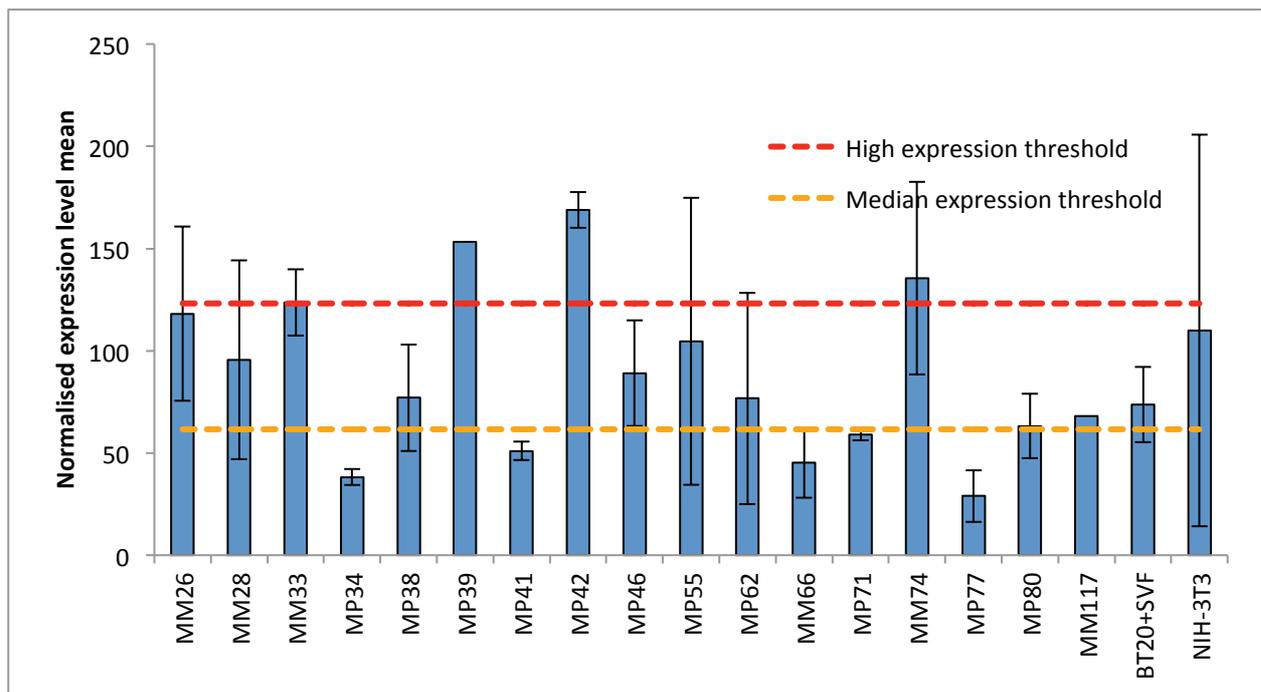


Figure 18: Résultat de l'analyse Multigauge pour la protéine Bcl-xL

Seuls les modèles présentant un niveau d'expression relatif notable de la protéine Bcl-xL sont affichés dans la figure 20 ci-dessus. D'après cette dernière, la quantité de Bcl-xL est considérée comme élevée chez les modèles dont l'histogramme dépasse un seuil relatif représenté par le tiers supérieur des différents niveaux d'expression protéique. On observe que les modèles MM26, MM33, MP39, MP42 et MM74 ont un niveau élevé d'expression de Bcl-xL.

En utilisant la même procédure, on a réalisé des western blot pour plusieurs protéines d'intérêts et comparé les résultats de ces derniers à ceux obtenus par la méthode RPPA pour les mêmes protéines. On a ainsi pu confronter les résultats des deux techniques de manière à avoir une probabilité maximum d'obtenir des résultats les plus proches possibles de la réalité. En effet pour des raisons budgétaires liés aux expériences *in vivo* qui découlent de ces résultats, on devait sélectionner les protéines présentant le meilleur potentiel de cible thérapeutique et ainsi pouvoir tester un nombre réduit de futurs médicaments. Le tableau 2 ci-après nous montre les protéines retrouvées surexprimées selon l'une ou l'autre des techniques puis expose les résultats finaux tenant compte des deux techniques simultanément.

Modèles	MM26	MM33	MP34	MP38	MP39	MP42	MP47	MM52	MP55	MP62	MM66	MM74
Résultats RPPA	Bcl-xL		MAPK, PI3K	MAPK, Bcl-xL		Bcl-xL	Bcl-xL	Bcl-xL			PI3K	Bcl-xL,
Résultats WB	Bcl-xL	MAPK, PI3K, Bcl-xL	PI3K		MAPK, Bcl-xL	MAPK, Bcl-xL			MAPK	MAPK		MAPK, PI3K, Bcl-xL
Résultats finaux	Bcl-xL		PI3K			Bcl-xL						Bcl-xL

Tableau 2: Comparaison des résultats RPPA et western blot

Les résultats finaux montrent que la protéine Bcl-xL est retrouvée surexprimée dans plusieurs modèles et à partir des deux techniques. On retrouve également une surexpression des protéines PI3K et MAPK à partir de l'une ou l'autre des techniques d'analyse.

2. Évaluation du bévacizumab sur les modèles de mélanomes uvéaux

2.1. Étude de toxicité du bévacizumab

À partir des relevés du poids des souris de chaque groupe, on a pu faire les moyennes des poids relatifs par groupe. Les courbes de la figure 22 ci-dessous expriment chacune l'évolution du poids moyen relatif des souris d'un groupe donné.

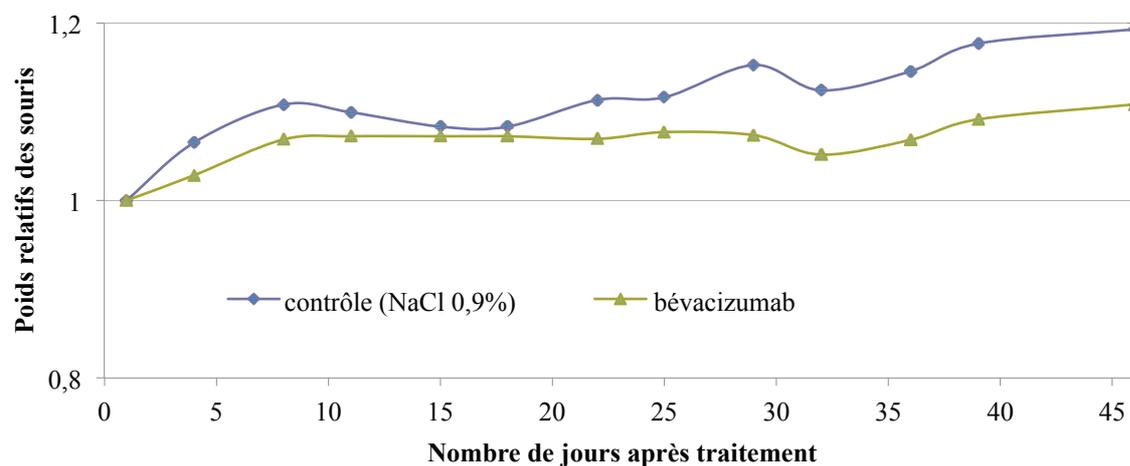


Figure 22: Effet du bévacizumab sur le poids moyen des souris par groupe.

On observe que le poids moyen relatif des souris du groupe contrôle tend vers une augmentation. En effet, arrivé au terme de 45 jours d'étude, les souris du groupe contrôle montrent une augmentation de leur poids avoisinant les 20% du poids initial. En prenant la perte de poids comme critère de toxicité d'une molécule, on peut conclure de cette expérience que le solvant (NaCl 0,9%) utilisé pour préparer le bévacizumab n'est pas toxique.

D'après la courbe représentant l'évolution du poids moyen relatif des souris traitées, on observe que celui-ci tend également vers une légère augmentation. Ce résultat indique que le bévacizumab n'est pas toxique lorsqu'il est utilisé dans les conditions expérimentales décrites dans le matériel et méthodes. Après avoir prouvé que le bévacizumab n'était pas toxique dans nos conditions expérimentales, on a cherché à démontrer son efficacité antitumorale sur plusieurs de nos modèles de xénogreffes.

2.2. Étude d'efficacité du bévacizumab

La figure 23 ci-dessous représente les résultats de l'étude d'efficacité réalisée sur quatre modèles murins issues de quatre tumeurs provenant chacune d'un patient différent.

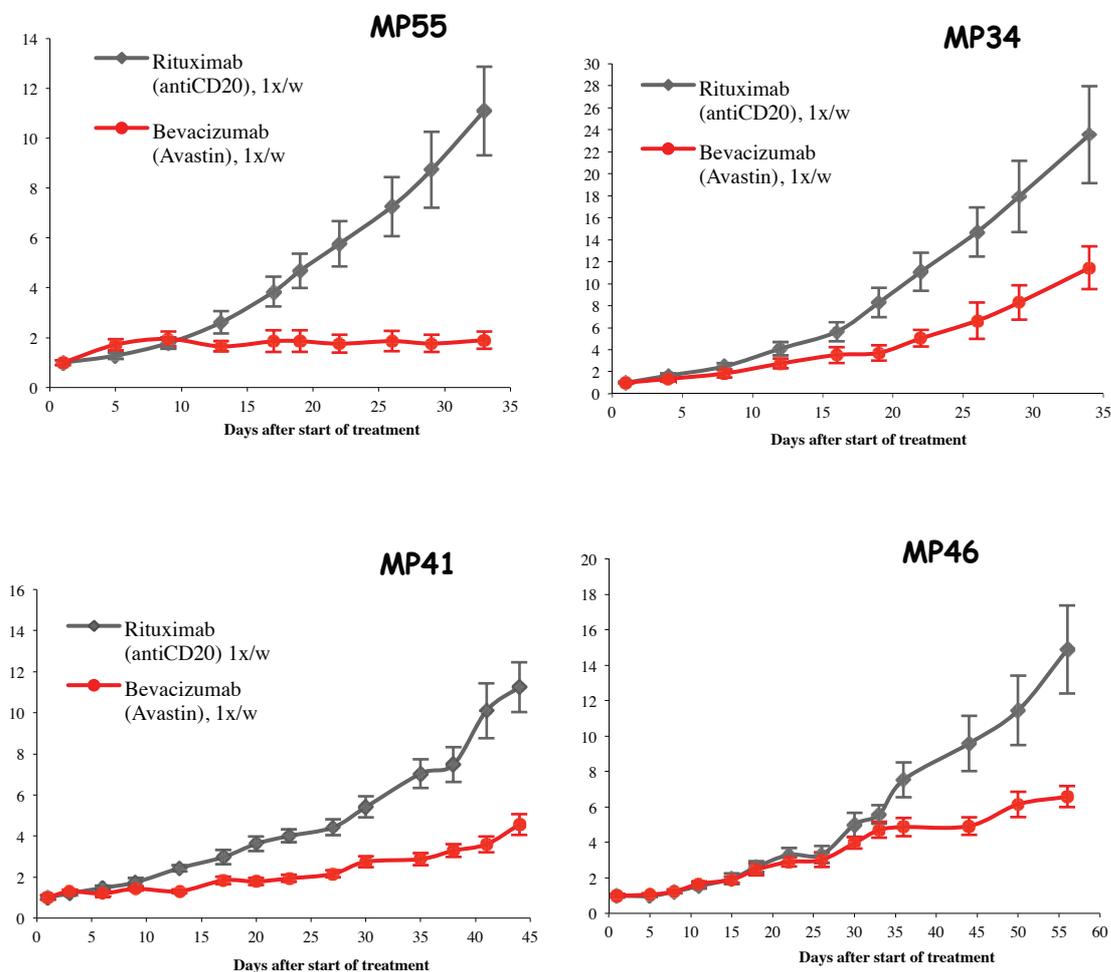


Figure 19: Effet du bévacizumab sur l'inhibition de la croissance tumorale des modèles MP34, MP41, MP46 et MP55.

Les courbes décrivant l'évolution du volume tumoral relatif (RTV) de nos différents modèles sont comparées à celles décrivant les RTV de leur contrôle respectif.

Ces comparaisons montrent que tous les groupes traités ont une croissance tumorale plus faible que les groupes non traités. On peut dès à présent dire que le bévacizumab a une activité bénéfique prouvée *in vivo* dans la lutte contre les mélanomes uvéaux testés. Cependant il existe des variations de l'efficacité de la réponse au traitement. Cette variation est visible lorsque l'on compare la différence de croissance tumorale (traités *versus* contrôles) selon les modèles observés. En effet, on remarque une croissance tumorale ralentie par rapport à celle des contrôles chez les modèles MP34, MP41 et MP46 alors qu'elle est pratiquement inhibée chez le modèle MP55. On peut donc classer nos modèles en fonction de leur niveau d'inhibition de croissance tumorale pour une même dose de bévacizumab. Grâce à cette classification on distingue les modèles qui semblent être de réponses intermédiaires (MP34, MP41, MP46) et le modèle qui semble être un bon répondeur est le MP55.

Pour formaliser ces observations on décide d'utiliser une formule mathématique décrivant la réponse au bévacizumab : $R = [(Vf/Vi)^{ind}/m(Vf/Vi)^{control}] - 1$

Avec R = Réponse au bévacizumab ; Vf = Volume final ; Vi = Volume initial ; m = moyenne ; ind = données individuelles du groupe traité

À partir de cette formule :

- R compris entre 0 et -0,5 indique que le modèle est un mauvais répondeur.
- R compris entre -0,5 et -0,8 indique que le modèle est un répondeur intermédiaire.
- R compris entre -0,8 et -1 indique que le modèle est un bon répondeur.

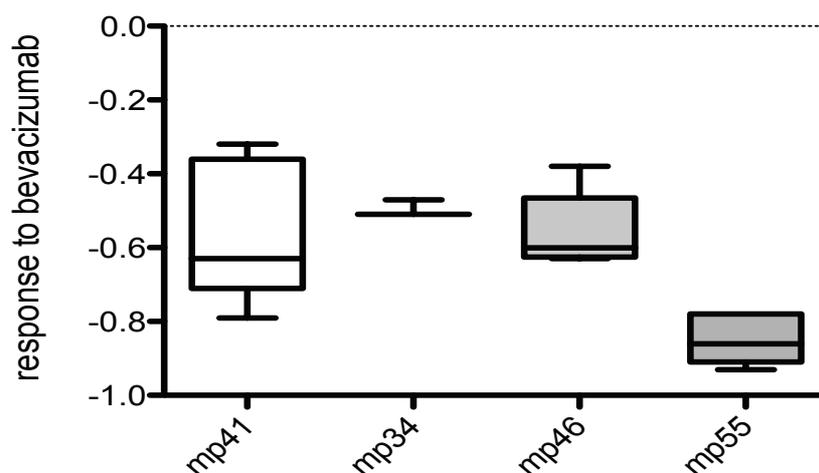


Figure 20: Quantification de la réponse au bévacizumab par modèle.

La figure 24 ci-dessus confirme les observations faites à partir des courbes de croissances tumorales et classe le modèle MP55 dans la catégorie des bons réponders au bevacizumab et le MP34, MP41, MP46 dans les modèles de réponses intermédiaires au bevacizumab.

3. Recherche de marqueurs prédictifs

Les résultats bruts de l'analyse du niveau d'expression d'une soixantaine de gènes d'intérêts par qPCR sur ARN nous ont été fournis par la plateforme de biologie moléculaire de l'institut Curie. Les données se présentaient sous la forme de variables qualitatives telles que le nom du modèles et le statut du modèle (traité, contrôle) mais aussi sous la forme de variables quantitatives telles que les valeurs chiffrées relatives du niveau d'expression génique pour chaque gène étudié.

Les graphiques boxplots sont les plus indiqués pour interpréter les résultats des variations de variables quantitatives en fonction des variations de variables qualitatives.

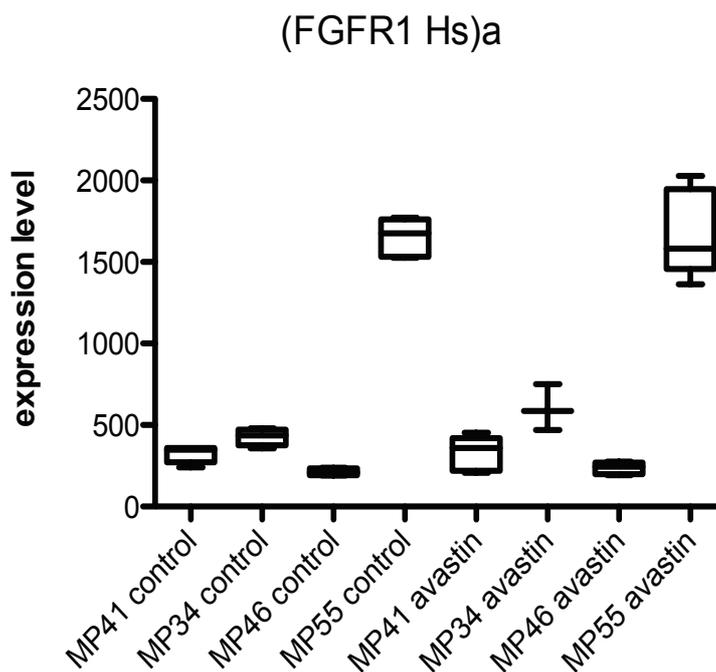


Figure 25: Boxplots du niveau d'expression génique FGFR1.

La figure 25 ci-dessus correspond aux boxplots représentant le niveau d'expression du gène fibroblast growth factor receptor 1 (*FGFR1*) humain dans les différents modèles étudiés en fonction de leur statut traité/contrôle.

À partir de cette figure, on peut comparer le niveau d'expression du gène *FGFR1* humain du modèle MP55 considéré comme un bon répondeur avec le niveau d'expression du même gène chez les modèles MP34, MP41 et MP46 considérés comme des modèles de réponses intermédiaires. Ici, les modèles de réponses intermédiaires ont une expression relative homogène et faible du gène étudié. En revanche, le modèle bon répondeur montre une expression relative élevée de ce même gène. Dans le but de trouver une signature minimum prédictive de réponse au traitement, on a cherché parmi tous les gènes testés à sélectionner ceux qui avaient d'une part un niveau d'expression homogène parmi les modèles de réponses intermédiaires et d'autre part un niveau d'expression différent entre le modèle bon répondeur et les modèles de réponses intermédiaires à l'image de *FGFR1* humain.

Une fois les gènes possédant ces deux critères repérés grâce aux boxplots, on a procédé à un affinage de notre sélection de gènes candidats à la signature prédictive.

On a alors réalisé des représentations histogrammes du niveau d'expression des gènes précédemment sélectionnés dans lesquelles les niveaux d'expression génique des modèles de réponses intermédiaires sont confondus et moyennés pour simplifier la lecture et l'interprétation. En utilisant cette méthode, on lisse les différences d'expression génique entre les modèles de réponses intermédiaires. La sélection s'effectue alors au niveau des écarts types. En effet, pour que ce raisonnement soit valable il faut que la moyenne des expressions géniques des modèles de réponses intermédiaires soit approximativement homogène. On a donc choisi d'utiliser l'écart type comme paramètre statistique de dispersion pour nous informer sur l'écart à la moyenne de nos données. L'histogramme représentant le niveau d'expression génique des trois modèles de réponses intermédiaires doit montrer un écart type relativement faible pour que le gène étudié soit sélectionné. Cette étape représente donc un nouveau niveau de sélection de gènes d'intérêts.

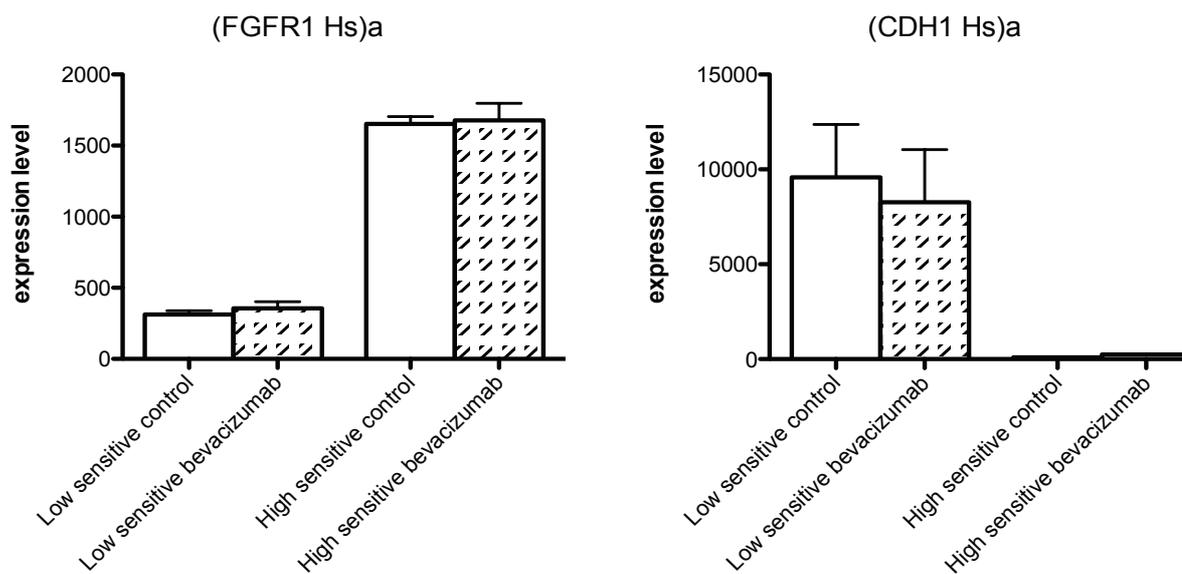


Figure 21: Histogrammes du niveau d'expression des gènes *FGFR1 Hs* et *CDH1 Hs*

On peut observer sur les boxplots de la figure 26 ci-dessus que *FGFR1* humain est plus exprimé chez le modèle bon répondeur que chez les modèles de réponses intermédiaires. On observe également que l'écart type des histogrammes des modèles de réponses intermédiaires est faible. Sur la base de ces résultats on peut dire que le gène *FGFR1* humain atteint le dernier niveau de sélection des gènes candidats à la signature prédictive.

Ce dernier niveau de sélection correspond à la confrontation des données brutes des gènes présélectionnés à une analyse statistique rigoureuse cherchant à montrer des différences significatives, avec une p-value la plus faible possible, entre le niveau d'expression génique des modèles de réponses intermédiaires et celui du modèle bon répondeur. En fonction de l'orientation de cette différence d'expression génique entre les modèles et du niveau de réponse de ces modèles, on pourrait déterminer les marqueurs prédictifs positifs et négatifs de réponse au bévacizumab et ainsi proposer une première signature minimum prédictive pour ce traitement dans ce cancer.

D'après le raisonnement décrit ci-dessus, la figure 26 montre que le gène *FGFR1* humain est un bon candidat comme marqueur prédictif positif de réponse au bévacizumab. En revanche, cette même figure montre que le gène *CDH1* humain est moins exprimé chez le modèle bon répondeur que chez les modèles de réponses intermédiaires.

L'écart type de la moyenne des niveaux d'expression de ce gène parmi les modèles de réponses intermédiaires est plus important que pour le gène *FGFR1* humain et pourrait fausser l'interprétation des résultats. L'analyse statistique nous informera par la suite de la significativité de ce résultat. À cette étape on peut dire que *CDHI* humain est un candidat potentiel comme marqueur prédictif négatif de réponse au bévacizumab.

À partir de l'observation et de l'interprétation des histogrammes on a pu isoler des candidats :

- marqueurs prédictifs positifs : *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, Angiopoïétine 2, *CDK6*, *ESR1*, *RET*.

- marqueurs prédictifs négatifs : *VEGFA*, *DLL4*, *PLK1*, *AURKA*, *PUMA*, *Bcl-xL*, *CDH1*, *CXCR4*, *CXCL12*, *PGF*.

Ces résultats sont actuellement en cours de traitement dans le service de biostatistiques de l'institut Curie. Seule l'application d'une méthode rigoureuse de biostatistiques sur les données des gènes que nous avons isolés pourra fournir une première signature minimum prédictive de réponse au bévacizumab. Cette signature prédictive devra ensuite être testée sur éventail de modèles le plus large possible pour être validée *in vivo*.

Discussion

Nos raisonnements sur la recherche de cibles thérapeutiques moléculaires nous ont conduits à analyser l'expression de plusieurs protéines d'intérêts en cancérologie en utilisant des modèles de xénogreffes murins de mélanomes uvéaux. Cette analyse nous a montré que certaines protéines sont surexprimées dans plusieurs modèles. La protéine *Bcl-xL* est l'exemple le plus caractéristique d'entre elles car elle est retrouvée surexprimée dans plusieurs modèles et à partir de deux méthodes différentes d'analyse de l'expression protéique. La protéine *Bcl-xL* est une protéine qui intervient dans le mécanisme de la voie intrinsèque de l'apoptose en inhibant l'activité de la protéine *Bax*. Cette dernière ne peut plus agir sur la membrane mitochondriale pour permettre la fuite du cytochrome *C*⁴⁸. Dans ce cas de figure, les caspases 3 restent alors inactivées et la cellule n'entre donc pas en apoptose. Lorsque l'expression de *Bcl-xL* est augmentée, on observe par conséquent une inhibition de la voie intrinsèque de l'apoptose. L'expérience de caractérisation des modèles de xénogreffes nous a montré que certains mélanomes uvéaux utilisent au moins ce mécanisme pour échapper à l'apoptose et ainsi proliférer sans auto-destruction des cellules anormales²¹. Nous avons donc des raisons de penser qu'il serait intéressant d'évaluer la pertinence thérapeutique de thérapies ciblées dirigées contre la protéine *Bcl-xL* sur les modèles isolés par l'expérience.

De plus, les protéines des voies PI3K/AKT/mTOR et MAPK ont également montré une surexpression chez certains modèles. Ces deux voies ont déjà été décrites comme étant impliquées dans des mécanismes de prolifération cellulaire et notamment au sein du mélanome uvéal. L'expérience de caractérisation protéique nous a permis de confirmer ces éléments sur nos modèles de xéno greffes et d'envisager de futures expériences testant la pertinence thérapeutique de thérapie ciblées dirigées plus ou moins spécifiquement contre des protéines indispensables au bon fonctionnement de ces deux voies.

Durant la phase d'étude de faisabilité de ces futurs projets scientifiques, il faudra prendre en compte un certain nombre de paramètres comme par exemple la disponibilité des produits (qu'ils soient sur le marché ou non) tels que les anti-MEK pour la voie MAPK ou l'évérolimus pour la voie PI3K²². En effet, la qualité de la gestion logistique et de la planification des événements dans le temps en fonction de budgets prédéfinis, bien que non scientifique, doit avoir une place de choix dans les priorités des chercheurs. Un bon niveau d'organisation permet d'obtenir des conditions d'expérimentales optimales desquelles dépend la fiabilité des résultats à venir.

L'étude de toxicité a montré que le bévécizumab n'est pas toxique dans nos conditions expérimentales d'utilisation et a validé l'intérêt de réaliser une étude d'efficacité pour ce même médicament. Cette dernière a montré une variabilité selon les modèles. En analysant cette variabilité on peut classer les modèles dans deux catégories de sensibilités différentes au bévécizumab. La mise en évidence des différences d'expression génique selon les modèles des deux catégories établies nous permet de rechercher des marqueurs prédictifs positifs et négatifs de réponse au bévécizumab. La validation d'une signature minimale prédictive serait un outil efficace pour orienter les pratiques cliniques quant au choix du traitement à administrer. Il faut alors imaginer la puissance d'un tel outil si chaque traitement thérapeutique ciblé possédait une signature prédictive spécifique validée dans les différents cancers. En ce qui concerne le bévécizumab, la recherche de la signature prédictive de réponse au traitement génère des données qui permettent également l'approfondissement de la compréhension de l'activité de cette molécule. Bien qu'elle soit déjà largement utilisée dans différents cancers tels que le cancer colorectal métastatique, le cancer du sein métastatique, le cancer bronchique non à petite cellules ou encore le cancer du rein²³, il reste encore des zones d'ombre sur son mécanisme d'action. En effet, aujourd'hui on sait que le bévécizumab est un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF-A et fait donc partie de la famille des antiangiogéniques.

La néoangiogenèse est un mécanisme utilisé par de nombreux cancers afin de vasculariser les tumeurs et leur permettre de bénéficier de tous les éléments apportés par le sang nécessaire à leur développement (oxygène, nutriments, etc). On comprend alors la raison pour laquelle ce médicament est relativement efficace sur les tumeurs très vascularisées comme les cancers du rein. La néoangiogenèse est également utilisée par le cancer comme un mécanisme de dissémination métastatique en utilisant le sang comme véhicule. En effet, une fois la tumeur au contact de la circulation sanguine, il lui est plus aisé de réaliser une intravasation qui participera largement à la colonisation d'organes secondaires. Dans le cas du mélanome uvéal, des métastases hépatiques et pulmonaires sont retrouvées dans la grande majorité des cas de décès dus au cancer²⁴. L'utilisation du bévacizumab et l'augmentation de ses performances sont donc un enjeu majeur dans la lutte contre le mélanome uvéal. Les données d'expression géniques générées pour les différents modèles ont donc permis la comparaison de ce niveau d'expression pour les groupes sensibles par rapport aux groupes moins sensibles. L'objectif de cette comparaison est donc de déterminer et de valider une signature minimum prédictive de réponse au bévacizumab. En approfondissant la réflexion, on peut s'interroger sur le résultat de la comparaison du niveau d'expression génique du groupe traité par rapport à un groupe contrôle au sein d'un même modèle.

Ce résultat traduirait directement l'activité moléculaire du médicament pour un gène et un modèle donné et serait un moyen efficace d'approfondir nos connaissances à ce sujet. En analysant sous cet angle l'ensemble des gènes d'intérêts connus en cancérologie, on pourrait quasiment cartographier l'activité du médicament étudié.

Lors des réunions de concertations pluridisciplinaires consacrées à la recherche au cas par cas d'un traitement anticancéreux pertinent, le pharmacien ou le médecin biologiste pourrait ajouter à sa conclusion portant sur les résultats de la batterie de tests biologiques un raisonnement tripartite tenant compte de la cartographie génomique de la tumeur, de la cartographie de l'activité moléculaire d'un produit candidat au traitement et enfin de la signature prédictive de ce produit dans l'indication recherchée. On atteindrait par le biais de cette méthode, un niveau de personnalisation et de précision thérapeutique encore inégalé.

Perspectives

La caractérisation de nos modèles pourrait être améliorée grâce à des analyses d'immunohistochimie qui permettraient de connaître la localisation des protéines surexprimées. Ceci représenterait un moyen d'améliorer nos connaissances sur les tumeurs à notre disposition et pourrait orienter notre réflexion sur d'éventuelles thérapies. L'efficacité antitumorale du bévacizumab n'est pas identique chez tous nos modèles. Après l'analyse des résultats de la recherche de marqueurs prédictifs, on a pu dégager des marqueurs prédictifs positifs et d'autres négatifs. Les marqueurs prédictifs de mauvaises réponses au bévacizumab pourraient être des cibles à inhiber à l'aide de thérapies ciblées utilisées en association avec le bévacizumab. Ces expériences auraient pour objectif d'améliorer la réponse au traitement en potentialisant les effets du bévacizumab. Le sens de variation du niveau d'expression des gènes des modèles mauvais répondeurs par rapport à celui des bons répondeurs en situation de traitement peut également être un élément à prendre en compte dans la recherche des mécanismes de résistance au traitement. Enfin, l'établissement d'une cartographie moléculaire de l'activité des médicaments grâce à la méthode décrite pourrait être un enjeu majeur pour améliorer l'efficacité de la prise en charge thérapeutique des patients.

Les PDX représentent un outil puissant pour la recherche de nouvelles thérapies ciblées. Leur caractérisation moléculaire ainsi que les résultats des études d'efficacité pourraient permettre de valider des signatures prédictives de réponse à différentes thérapies. Dans le cas où les traitements dirigés par les marqueurs prédictifs sont reconnus comme étant d'une efficacité supérieure à celle des traitements actuels (essai clinique en cours avec l'étude SHIVA à l'institut Curie Paris), les PDX pourraient se placer à l'avant garde de la recherche de ces marqueurs.

Annexe 1 : chimiothérapies cytotoxiques

action direct: agents alkylants	moutardes azotés	<i>cyclophosphamide</i>
		<i>ifosfamide</i>
		<i>melfhalan</i>
		<i>oxaphosphorine</i>
		<i>chlorambucil</i>
	sels de platines	<i>cisplatine</i>
		<i>carboplatine</i>
		<i>oxaliplatine</i>
	nitroso-urées	<i>carmustine</i>
		<i>lomustine</i>
		<i>fotémustine</i>
		<i>streptozocine</i>
	éthylène-imine	<i>thiotépa</i>

	sulfonyle-urée		<i>busulfan</i>
	agents méthylants		<i>témozolomide</i>
			<i>procarbazine</i>
			<i>dacarbazine</i>
action indirect: agents intercallants	inhibiteurs topoisomérase 1		<i>topotécan</i>
			<i>irinotécan</i>
	inhibiteur topoisomérase 2	intercallants non permanents	<i>étoposide</i>
			<i>téniposide</i>
		anthracycline	<i>daunorubicine</i>
			<i>doxorubicine</i>
			<i>épirubicine</i>
		anthracénédione	<i>mitoxanthrone</i>

antimétabolite	antiprimidiques	<i>5-fluorouracile</i>
		<i>capécitabine</i>
		<i>gemcitabine</i>
		<i>cytarabine</i>
	antipuriques	<i>azacytidine</i>
		<i>6-mercaptopurine</i>
		<i>thioguanine</i>
		<i>fludarabine</i>
	antifoliques	<i>pentostatine</i>
		<i>méthotrexate</i>
<i>ralitrexed</i>		
poison du fuseau mitotique	taxanes	<i>permétrexed</i>
		<i>docétaxel</i>
		<i>paclitaxel</i>
	alcaloïdes de la pervenche	<i>cabazitaxel</i>
		<i>vincristine</i>
		<i>vinblastine</i>
		<i>vindésine</i>
		<i>vinflunine</i>
	apparenté aux taxanes	<i>vinorelbine</i>
	apparenté aux alcaloïdes de la pervenche	<i>épothilone</i>
		<i>halichondrine</i>

Annexe 2 : Hormonothérapies

Cancer du sein	antiœstrogènes		<i>tamoxifène</i>
			<i>fulvestrant</i>
	antiaromatases	inhibiteurs stéroïdiens	<i>exemestane</i>
		inhibiteurs non stéroïdiens	<i>anastrozole</i>
			<i>létrozole</i>
progestatifs		<i>acétate de médroxyprogestérone</i>	
Cancer de la prostate			<i>acétate de mégestrole</i>
	analogue de la LH-RH		<i>triptoréline</i>
			<i>leproréline</i>
			<i>buséréline</i>
			<i>goséréline</i>
	antagoniste de la LH-RH		<i>dégarélix</i>
	androgènes stéroïdiens		<i>acétate de cyprotérone</i>
	androgènes non stéroïdiens		<i>nilutamide</i>
			<i>flutamide</i>
			<i>bicalutamide</i>
			<i>enzalutamide</i>
	inhibiteurs de la stéroïdogénèse		<i>kétoconazol</i>
			<i>abiratérone</i>
oestrogènes		<i>diéthylstilbestrol</i>	
		<i>estramustine phosphate</i>	

Annexe 3 : Thérapies ciblées

Thérapies ciblées	anticorps monoclonaux	anti-VEGF		<i>bévacizumab</i>	
		anti-VEGFR		<i>ramucirumab</i>	
		anti-EGFR		<i>cétuximab</i>	
				<i>panitumumab</i>	
		anti-HER2		<i>trastuzumab</i>	
				<i>pertuzumab</i>	
		anti-CTLA4		<i>ipilimumab</i>	
	anti-CD20		<i>rituximab</i>		
	inhibiteurs tyrosines kinase	inhibiteurs de récepteurs membranaires	inhibiteur dirigés contre HER		<i>géfitinib</i>
					<i>erlotinib</i>
					<i>lapatinib</i>
			inhibiteurs dirigés contre VEGFR		<i>sunitinib</i>
					<i>sorafénib</i>

Annexe 4 : Immunothérapies

cytokines	<i>interféron alpha 2a (IFNα)</i>
	<i>interféron alpha 2b (IFNα)</i>
	<i>interleukine 2 (IL2)</i>
immunothérapie endovésicale	<i>BCG intra-vésical</i>

Annexe 5 : Protéines étudiées par les techniques de western blot et RPPA

Cytoskeleton	Wnt / Notch pathways	Protein kinase C	MAPK pathways	Transcription factors	DNA damage	Cell cycle	Survival-Apoptosis	NF-kB pathway	Src family	PI3K pathway	Adaptors / signalling	Receptor tyr kinases
Actin	b-catenin	P-PKC	ERK1/2	Stat1 / P-Stat1	p53	Cdk1	Bcl-xL	p65	Src	PTEN	P-Shc	EGFR
Paxillin	GSK3-b	P-PKC d	P-ERK1/2	Stat3	P-p53	Cdk2	Bcl-2	NFk_B	P-Src	P-PTEN	IRS1	P-EGFR
Pak1	Dvl3	P-PKC q	JNK	P-Stat3	PARP	Cdk4	Caspase-3	P-p65	Lck	P-PDK1	NCK1	Her2
P-Pak1	CKI	PKC1	P-JNK	Stat6	P-H2A	PBK	FOXO3a	NFk-B	Lyn	Akt	CASK	P-Her2
Pak4	CKIa	PKCe	P-p38	CREB		PLK1		IKKa	Yes	P-Akt	Caveolin-1	Met
VASP	CKId	PKCi	MKK4	TCF4		Aurora-A		IRAK1		Akt1	Caveolin-2	P-Met
CK18	CKIe	P-PKC	MEK1/2			p15				Akt2	Smad2	
Vimentin	Numb	P-PKC (pan)	P-MEK1/2			INK4B				Stathmin	SRPK1	
E-cadherin	b-catenin	P-PKC d	Rsk1			p19				S6	PLCg1	
Integrin-b_4	GSK3-b	P-PKC q	Hsp27			Skp1				P-S6	P-PLCg1	
FAK		PKC1	P-Hsp27			p27				eIF4E		
P-FAK		P-PKC				Kip1				p70S6K		
Cofilin						Histone-H3				P-p70S6K		
						Rb						
						P-Rb						

Annexe 6 : Gènes testés en qPCR pour la recherche de marqueurs prédictifs

Angiogenesis	Pi3k/Akt pathway	MAPK pathway	Tumor growth	Cell cycle	Apoptose	Hormones receptor	Cellular cohesion	EMT	Insuline pathway	Autophagy	Other
(FGFR1 Hs)a	(PTEN Hs)a	FGFR1 Hs)a	(EGFR Hs)a	(PLK1 Hs)a	(Bcl2 Hs)a	(ERBB2 Hs)a	(VIM Hs)a	(CLDN1 Hs)a	IGFR1 Hs)a	(BECN1 Hs)a	(SRC Hs)a
(ANGPT2 Mm)a		(FGFR2 Hs)a	(DLL4 Hs)a	(AURKA Hs)a	(PUMA Hs)a	(ESR1 Hs)a	(CDH1 Hs)a		(IRS2 Hs)a	(CXCL12 Mm)a	(PGF Hs)a
(TIES Mm)a		(FGFR3 Hs)a	(DLL4 Mm)a	(MAP1LC3B+B2 Hs)a	(Bcl-XL Hs)a	(AR Hs)a	(DDR2 Hs)a			(CXCR4 Hs)a	MCL1L Hs)a
(FGFR2 Hs)a		(PDGFRA Hs)a	(MET Mm)a	(CDK4 Hs)a	(MDM2 Hs)a	(PGR Hs)a	(PECAM1 Hs)a			(CXCR4 Mm)a	(ALK Hs)a
(FGFR3 Hs)a		(EGFR Hs)a	(HGF Mm)a	(CDK6 Hs)a			(PECAM1 Mm)a				(KIT Hs)a
(PDGFRA Hs)a			(HGF Hs)a				(ZO1 Hs)a				(RET Hs)a
(HIF1A Hs)a			(MET Hs)a				(OCLN Hs)a				(INPP4B Hs)a
(VEGFR1 Mm)a			(MKi67 Hs)a								(GABARAPL2 Hs)a

(VEGFR2 Hs)a												(STAT3 Hs)a
(VEGFR2 Mm)a												(MCL1S Hs)a
(ANGPT1 Mm)a												
(VEGFA Mm)												
(VEGFA Hs)a												

Bibliographie

- 1 Leininger, D. <http://dr-leininger.fr/loeil-et-la-vision/anatomie-de-loeil>, <<http://dr-leininger.fr/loeil-et-la-vision/anatomie-de-loeil>> (2014).
- 2 H SARAUX, C. L., H OFFRET, G RENARD.
- 3 Zeng, Q. *et al.* Evaluation of genotoxic effects caused by extracts of chlorinated drinking water using a combination of three different bioassays. *Journal of hazardous materials* **296**, 23-29, doi:10.1016/j.jhazmat.2015.04.047 (2015).
- 4 Trenkle, T., Hakim, S. G., Jacobsen, H. C. & Sieg, P. Differential Gene Expression of the Proto-oncogene VAV3 and the Transcript Variant VAV3.1 in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer research* **35**, 2593-2600 (2015).
- 5 Weinberg, R. A. *The biology of cancer*. (Garland Science, 2007).
- 6 Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M. & Baradaran, B. Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* **16**, 2129-2144 (2015).
- 7 O'Donnell, A. H. *et al.* Methylation Abnormalities in Mammary Carcinoma: The Methylation Suicide Hypothesis. *Journal of cancer therapy* **5**, 1311-1324, doi:10.4236/jct.2014.514131 (2014).
- 8 David, S. S., O'Shea, V. L. & Kundu, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* **447**, 941-950, doi:10.1038/nature05978 (2007).
- 9 Budman, J. & Chu, G. Assays for nonhomologous end joining in extracts. *Methods in enzymology* **408**, 430-444, doi:10.1016/S0076-6879(06)08027-X (2006).
- 10 Budman, J. & Chu, G. Processing of DNA for nonhomologous end-joining by cell-free extract. *The EMBO journal* **24**, 849-860, doi:10.1038/sj.emboj.7600563 (2005).
- 11 Glitza, I. C. & Davies, M. A. Genotyping of cutaneous melanoma. *Chinese clinical oncology* **3**, 27, doi:10.3978/j.issn.2304-3865.2014.03.01 (2014).
- 12 Das, P. M. & Singal, R. DNA methylation and cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **22**, 4632-4642, doi:10.1200/JCO.2004.07.151 (2004).
- 13 Greider, C. W. & Blackburn, E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* **43**, 405-413 (1985).
- 14 Huang, D. S. *et al.* Recurrent TERT promoter mutations identified in a large-scale study of multiple tumour types are associated with increased TERT expression and telomerase activation. *European journal of cancer* **51**, 969-976, doi:10.1016/j.ejca.2015.03.010 (2015).
- 15 Speidel, D. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends in cell biology* **20**, 14-24, doi:10.1016/j.tcb.2009.10.002 (2010).
- 16 Naumov, G. N., Akslen, L. A. & Folkman, J. Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell cycle* **5**, 1779-1787 (2006).
- 17 Weis, S. M. & Cheresch, D. A. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nature medicine* **17**, 1359-1370, doi:10.1038/nm.2537 (2011).
- 18 Micalizzi, D. S., Farabaugh, S. M. & Ford, H. L. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **15**, 117-134, doi:10.1007/s10911-010-9178-9 (2010).
- 19 Kessenbrock, K., Plaks, V. & Werb, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* **141**, 52-67, doi:10.1016/j.cell.2010.03.015 (2010).
- 20 Rundhaug, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine* **9**, 267-285 (2005).
- 21 Friedl, P. & Wolf, K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *The Journal of cell biology* **188**, 11-19, doi:10.1083/jcb.200909003 (2010).

- 22 Gao, D., Vahdat, L. T., Wong, S., Chang, J. C. & Mittal, V. Microenvironmental regulation of epithelial-mesenchymal transitions in cancer. *Cancer research* **72**, 4883-4889, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1223 (2012).
- 23 Cheng, Y. *et al.* Cancer-associated fibroblasts are associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma after surgery. *International journal of clinical and experimental medicine* **8**, 1896-1903 (2015).
- 24 Nasser, M. W., Elbaz, M., Ahirwar, D. K. & Ganju, R. K. Conditioning solid tumor microenvironment through inflammatory chemokines and S100 family proteins. *Cancer letters*, doi:10.1016/j.canlet.2015.05.002 (2015).
- 25 Zhang, Y., Wen, J., Zhou, L. & Qin, L. Utilizing a high-throughput microfluidic platform to study hypoxia-driven mesenchymal-mode cell migration. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, doi:10.1039/c5ib00059a (2015).
- 26 Labiano, S., Palazon, A. & Melero, I. Immune Response Regulation in the Tumor Microenvironment by Hypoxia. *Seminars in oncology* **42**, 378-386, doi:10.1053/j.seminoncol.2015.02.009 (2015).
- 27 Kobayashi, N. C. & Noronha, S. M. Cancer stem cells: a new approach to tumor development. *Revista da Associacao Medica Brasileira* **61**, 86-93, doi:10.1590/1806-9282.61.01.086 (2015).
- 28 Trédaniel, J. *Les médicaments des cancers une approche pratique des médicaments à notre disposition.* (Éd. Eska, 2012).
- 29 Bosque-Freeman, L. *Cancérologie, onco-hématologie module 10.* (Vernazobres-Gregó, 2008).
- 30 Mariani, P. *et al.* Surgical management of liver metastases from uveal melanoma: 16 years' experience at the Institut Curie. *Eur J Surg Oncol* **35**, 1192-1197, doi:10.1016/j.ejso.2009.02.016 (2009).
- 31 Diener-West, M. *et al.* Development of metastatic disease after enrollment in the COMS trials for treatment of choroidal melanoma: Collaborative Ocular Melanoma Study Group Report No. 26. *Arch Ophthalmol* **123**, 1639-1643, doi:10.1001/archophth.123.12.1639 (2005).
- 32 Dorval, T., Dendale, R. & Desjardins, L. [Ocular melanoma]. *Rev Prat* **54**, 2093-2101 (2004).
- 33 Augsburger, J. J., Correa, Z. M. & Shaikh, A. H. Effectiveness of treatments for metastatic uveal melanoma. *Am J Ophthalmol* **148**, 119-127, doi:10.1016/j.ajo.2009.01.023 (2009).
- 34 Pollock, P. M. *et al.* High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* **33**, 19-20, doi:10.1038/ng1054 (2003).
- 35 Kilic, E. *et al.* The RAS-BRAF kinase pathway is not involved in uveal melanoma. *Melanoma Res* **14**, 203-205 (2004).
- 36 Janssen, C. S. *et al.* The T1799A point mutation is present in posterior uveal melanoma. *Br J Cancer* **99**, 1673-1677, doi:10.1038/sj.bjc.6604731 (2008).
- 37 Van Raamsdonk, C. D., Fitch, K. R., Fuchs, H., de Angelis, M. H. & Barsh, G. S. Effects of G-protein mutations on skin color. *Nat Genet* **36**, 961-968, doi:10.1038/ng1412 (2004).
- 38 Van Raamsdonk, C. D. *et al.* Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* **457**, 599-602, doi:10.1038/nature07586 (2009).
- 39 Van Raamsdonk, C. D. *et al.* Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med* **363**, 2191-2199, doi:10.1056/NEJMoa1000584 (2010).
- 40 Laurent, C. *et al.* Patient-derived xenografts recapitulate molecular features of human uveal melanomas. *Mol Oncol* **7**, 625-636, doi:10.1016/j.molonc.2013.02.004 (2013).
- 41 Harbour, J. W. *et al.* Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science* **330**, 1410-1413, doi:10.1126/science.1194472 (2010).
- 42 Furney, S. J. *et al.* SF3B1 mutations are associated with alternative splicing in uveal melanoma. *Cancer Discov* **3**, 1122-1129, doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0330 (2013).
- 43 Patel, M. *et al.* Therapeutic implications of the emerging molecular biology of uveal melanoma. *Clin Cancer Res* **17**, 2087-2100, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-3169 (2011).
- 44 Papastefanou, V. P. *et al.* Metabolic activity of primary uveal melanoma on PET/CT scan and its relationship with monosomy 3 and other prognostic factors. *The British journal of ophthalmology* **98**, 1659-1665, doi:10.1136/bjophthalmol-2014-305304 (2014).

- 45 Decaudin, D. Genomic and gene expression features involved in oncogenesis of uveal melanomas. (2011).
- 46 Bosma, G. C., Custer, R. P. & Bosma, M. J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* **301**, 527-530 (1983).
- 47 Zhao, M. *et al.* A Phase II study of bevacizumab in combination with trastuzumab and docetaxel in HER2 positive metastatic breast cancer. *Invest New Drugs*, doi:10.1007/s10637-014-0122-5 (2014).
- 48 Lindqvist, L. M., Heinlein, M., Huang, D. C. & Vaux, D. L. Prosurvival Bcl-2 family members affect autophagy only indirectly, by inhibiting Bax and Bak. *Proc Natl Acad Sci U S A*, doi:10.1073/pnas.1406425111 (2014).

SERMENT

En présence de mes maîtres et de mes condisciples, **je jure** :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

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

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

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si je manque à mes engagement

Résumé

Après avoir rappelé certains éléments clefs de la cancérologie fondamentale et les principes de l'oncologie médicale, cette thèse développe une étude s'intéressant au mélanome uvéal et à la mise au point d'une méthode thérapeutique innovante destinée à optimiser les performances des traitements de cette pathologie. En effet, en raison du risque très élevé de métastases hépatiques (50% des patients), le pronostic des patients atteints de mélanome uvéal (MU) reste défavorable. Afin d'améliorer leur devenir, de nouvelles thérapies sont donc nécessaires. Cependant, à cause de l'incidence très faible de la maladie, il n'est pas possible de multiplier les essais cliniques pour tester l'ensemble des nouveaux traitements (ciblés), seuls ou en combinaison. L'utilisation de modèles précliniques qui reproduisent les caractéristiques moléculaires et les voies de signalisation impliquées dans le MU est donc absolument requise. L'une des catégories principales de modèles précliniques de cancers est représentée par les xénogreffes obtenues à partir d'échantillons de tumeurs humaines directement transplantés sur souris immunodéficientes. Ces modèles reproduisent l'hétérogénéité des cancers humains.

Au cours de ce travail de thèse, j'ai cherché à caractériser des modèles de mélanome uvéal par leurs niveaux d'expression protéique au sein du Laboratoire d'Investigation Préclinique de l'institut Curie de Paris. Cette caractérisation moléculaire a été effectuée en utilisant le western blot et les puces protéiques en phase inverse. Elle m'a permis de mettre en évidence la surexpression de certaines protéines d'intérêt dans certains modèles. Les voies de signalisation dont ces protéines font parties sont désormais des cibles potentielles pour de futures études précliniques. La réalisation d'une étude de toxicité du bévacizumab a montré que ce médicament n'est pas toxique lorsqu'il est utilisé à la dose de 30 mg/kg une fois par semaine. Dans les mêmes conditions, une étude d'efficacité de ce médicament sur quatre modèles de xénogreffes dérivées de patients différents de mélanomes uvéaux a montré une variabilité de la réponse au traitement. L'analyse de l'expression génique de ces modèles traités *versus* non traités et sensibles *versus* peu sensibles m'a permis d'isoler certains marqueurs prédictifs de bonne ou de mauvaise réponse au bévacizumab. La perspective de cette étude est donc de valider une signature prédictive de réponse au bévacizumab dans le cas du mélanome uvéal.

Mots clefs : mélanome uvéal, xénogreffes dérivées de patients, biomarqueurs prédictifs, cancérologie, recherche translationnelle, thérapies ciblées anticancéreuses.