



HAL
open science

Impact du fractionnement du traitement sur les propriétés radiosensibilisantes du bortézomib sur deux modèles de gliome malin humain xéno greffés

Marianne Labussière

► To cite this version:

Marianne Labussière. Impact du fractionnement du traitement sur les propriétés radiosensibilisantes du bortézomib sur deux modèles de gliome malin humain xéno greffés. Sciences pharmaceutiques. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2008. Français. NNT : 2008NAN10132 . tel-01777269

HAL Id: tel-01777269

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01777269>

Submitted on 24 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

NANCY UNIVERSITE
2008

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT "

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 23 octobre 2008

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
HENRI POINCARÉ - NANCY 1
Mention Pharmacologie

par Marianne LABUSSIÈRE

Née le 3 avril 1981

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies
Bioingénierie - Biomatériaux

Sujet :

**IMPACT DU FRACTIONNEMENT DU TRAITEMENT
SUR LES PROPRIETES RADIOSENSIBILISANTES DU BORTEZOMIB
SUR DEUX MODELES DE GLIOME MALIN HUMAIN XENOGREFFES**

MEMBRES DU JURY

Juges : Pr. Pascal CHASTAGNER (Directeur de Thèse)
Pr. Jean-Louis MERLIN

Rapporteurs : Pr. Philippe MAINGON
Dr. Didier FRAPPAZ

NANCY UNIVERSITE
2008

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT "

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 23 octobre 2008

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
HENRI POINCARÉ - NANCY 1
Mention Pharmacologie

par Marianne LABUSSIÈRE

Née le 3 avril 1981

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies
Bioingénierie - Biomatériaux

Sujet :

**IMPACT DU FRACTIONNEMENT DU TRAITEMENT
SUR LES PROPRIETES RADIOSENSIBILISANTES DU BORTEZOMIB
SUR DEUX MODELES DE GLIOME MALIN HUMAIN XENOGREFFES**

MEMBRES DU JURY

Juges : Pr. Pascal CHASTAGNER (Directeur de Thèse)
Pr. Jean-Louis MERLIN

Rapporteurs : Pr. Philippe MAINGON
Dr. Didier FRAPPAZ

Remerciements

A M. le Professeur Pascal CHASTAGNER,

Depuis mon passage en tant qu'externe dans votre service à l'Hôpital d'Enfants, vous me faites l'honneur de diriger mes travaux de recherche et de me faire partager votre passion pour la recherche préclinique en oncologie. Vous avez su m'encadrer tout en me laissant une grande liberté d'action et d'idées et vous m'avez également permis de m'investir dans la gestion du laboratoire. Sans compter, vous avez mis à ma disposition vos compétences scientifiques, médicales et pédagogiques et m'avez accordé votre confiance. Que ce soit pour moi l'occasion de vous remercier vivement pour tout ce que vous m'avez appris et de vous exprimer ma reconnaissance et mon profond respect.

A M. le Professeur Jean-Louis MERLIN,

Depuis le début de mes travaux de recherche à la Faculté de Médecine, vous m'avez toujours accueillie avec bienveillance au sein du Laboratoire de Recherche en Oncologie du Centre Alexis Vautrin, me permettant ainsi de profiter de l'expérience et des précieux conseils de votre équipe. Vous me faites aujourd'hui l'honneur de présider ce jury de thèse. Veuillez trouver ici mes sincères remerciements et l'expression de toute ma reconnaissance.

A M. le Professeur Philippe MAINGON,

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites de participer à ce jury et d'être rapporteur de cette thèse, et ce en dépit de vos nombreuses obligations. Veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements les plus vifs.

A M. le Docteur Didier FRAPPAZ,

Vous avez accepté de juger cette thèse et d'en être le rapporteur. Que ce soit pour moi l'occasion de vous remercier vivement et de vous exprimer toute ma reconnaissance.

A M. le Professeur François PLENAT,

Les travaux de recherche présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein de votre laboratoire à la Faculté de Médecine, ainsi que dans le service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques du CHRU que vous dirigez. Je vous remercie pour vos précieux conseils, notamment pour les études en immunohistochimie, ainsi que pour avoir mis à ma disposition le personnel et les compétences de votre service.

A M. le Docteur Luc TAILLANDIER,

Depuis mon arrivée au laboratoire, tu as suivi avec beaucoup d'attention mon parcours et nous avons toujours eu des discussions constructives autour de mes travaux. Avec beaucoup d'humanité et de gentillesse, tu as su me faire partager tes connaissances en neuro-onco-biologie. Trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance et de toute mon admiration. J'espère vraiment que nous poursuivrons cette "collaboration" si enrichissante.

A Sophie PINEL,

Tu as guidé mes premiers pas en recherche. Trouve ici l'expression de mes remerciements les plus sincères.

A Mme le Docteur Valérie BERNIER,

Vous avez toujours facilité ma venue dans le Département de Radiothérapie du Centre Alexis Vautrin. Trouvez ici l'expression de toute ma reconnaissance.

A Marie-Claire LANHERS,

J'espère avoir su répondre à toutes vos "questions"... Merci pour nos discussions si constructives... J'aurai toujours plaisir à travailler avec vous...

A Bernadette CUNIN, Dominique MENG et Claudine MAIRE,

Pendant ces cinq années passées en votre compagnie, j'ai souvent compté sur vous et vos compétences. Je ne peux que vous remercier pour votre disponibilité et votre efficacité. Un grand merci pour votre aide.

A Céline, Emile et Nassir,

Si discrets, et pourtant si indispensables à mes travaux... Un très grand merci !

A tous les membres du Service de Pathologies du CHU,

Je vous remercie pour votre accueil et vos conseils pour la réalisation des lames d'immunohistochimie. J'adresse également des remerciements particuliers à Mme Nathalie MONHOVEN du Service Commun de Biologie Moléculaire du CHU pour les expérimentations en RT-PCR quantitative.

A l'équipe de recherche du Centre Alexis Vautrin,

Je suis souvent venue vous poser des questions ou vous emprunter du matériel et vous avez toujours répondu présents. Merci en particulier à Mme le Pr. Lina BOLOTINE et Mme le Dr. Sophie MARCHAL qui avez mis à ma disposition votre matériel et vos compétences pour les expérimentations en fluorescence et en cytométrie en flux

A mes parents,

Vous m'avez toujours soutenue et encouragée dans tout ce que j'ai entrepris. Trouvez dans cette thèse l'expression de mes remerciements les plus sincères.

A Marc,

*Sans toi, je n'aurais pas fini cette thèse...
Avec tout mon amour...*

A Hélène, Etienne et Blandine, mes frères et sœurs,

Votre énergie et votre joie de vivre m'épatent autant qu'elles m'encouragent. Merci pour les réponses à mes questions "médicales", l'apprentissage de l'élevage des bovins et l'initiation aux différentes disciplines du droit !!! Je ne vous souhaite que le meilleur...

A Marion,

Merci de m'avoir soutenue et d'avoir suivi avec autant d'intérêt mes travaux de recherche. Je te remercie également pour les cours de bactériologie du samedi matin... Je te souhaite le meilleur des épanouissements dans ton nouvel horizon parisien, mais je ne doute pas qu'il sera riche !!! Avec toute mon amitié...

A Magali, Céline et Aurore,

Nous avons partagé les mêmes bancs à la fac et les mêmes fous rires... A votre bonne humeur et votre enthousiasme si communicatifs... Que notre amitié perdure malgré la distance...

A Raphaël,

Merci pour l'intérêt que tu portes à mon travail de recherche, et pour ta disponibilité, en dépit de tes multiples activités. Un immense merci pour ta participation à la rédaction de mes publications.

A Emilie, Natacha, Guillaume, Suzanne, Caroline, Camille et Philippe,

De plus ou moins près, vous avez tous contribué à cette thèse. Partager vos premiers pas en recherche a été un vrai plaisir !! Votre travail a toujours été impeccable et votre bonne humeur un recours précieux. Que votre route soit longue...

Aux équipes des pharmacies Lavigne à Foug et Nouvelle à Golbey,

Je vous remercie pour tout ce que vous m'avez appris lors de mon passage dans vos officines. J'ai beaucoup apprécié la chaleur de votre accueil et votre bonne humeur. Merci beaucoup !!

Aux associations qui ont financé mes travaux,

Ce travail de recherche a été réalisé grâce au précieux soutien financier de la Ligue contre le Cancer (Comités Lorrains), de l'Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française et de l'Association pour la Recherche sur le Cancer. Que cette thèse soit l'expression de mes plus sincères remerciements.

SOMMAIRE

Sommaire

Avant-propos	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre 1 : Les gliomes malins	3
I. Les tumeurs primitives du système nerveux central	3
A. Epidémiologie	3
1. Fréquence et mortalité	3
2. Facteurs de risques	4
B. Caractéristiques spécifiques des gliomes malins	4
C. Classification histologique des tumeurs gliales	5
D. Gliomagenèse	7
1. Altérations génétiques impliquées	7
2. L'hypothèse des cellules souches tumorales	9
II. Prise en charge thérapeutique des patients atteints de gliome malin	10
A. La chirurgie	10
B. La radiothérapie	10
C. La chimiothérapie	11
D. Prise en charge thérapeutique à la récurrence	12
E. Nouvelles approches chimiothérapeutiques	13

F. Traitements médicaux associés	16
III. Conclusions	17
Chapitre 2 : Les associations radio-chimiothérapie concomitantes	18
I. Introduction	18
II. Principales interactions entre la radiothérapie et les agents cytotoxiques	19
A. Coopération spatiale	19
B. Modification de l'incidence des lésions radio-induites	19
C. Réduction de la masse tumorale et réoxygénation	20
D. Toxicité sélective pour les cellules hypoxiques	20
E. Toxicité sélective selon les phases du cycle cellulaire	20
F. Coopération cytotocinétique	21
G. Action au niveau de la réparation de l'ADN	21
H. Conclusion : mesure de l'effet des associations radio-chimiothérapie concomitantes	22
III. Associations radio-chimiothérapie concomitantes dans le traitement des gliomes de haut grade	23
A. Généralités	23
B. Radio-chimiothérapie concomitante : molécules utilisées	24
1. Introduction	24
2. Nitroso-urées	26
3. Dérivés du platine	26
4. Epipodophyllotoxines	26
5. Topotécan	27
6. Cas particulier du témozolomide	27
7. Autres molécules	28
IV. Conclusions et perspectives	29

Chapitre 3 : Le système ubiquitine – protéasome	30
I. Les deux grandes voies de dégradation des protéines	30
A. Protéolyse spécifique et non spécifique	30
B. Dégradation des protéines par la voie lysosomale	30
C. Dégradation des protéines par le système ubiquitine–protéasome	32
II. Structure du protéasome	33
A. Structure générale du protéasome 26S (Figure 5)	33
B. Le protéasome 20S (Figure 6)	34
1. Les sous-unités α	34
2. Les sous-unités β	35
C. Les sous–unités régulatrices 19S (Figure 7)	36
III. L'ubiquitinylation des protéines	38
A. Généralités	38
1. L'ubiquitine	38
2. Les différents types d'ubiquitinylation des protéines	38
3. Les multiples rôles de l'ubiquitinylation des protéines	40
B. Cascade enzymatique de fixation de la chaîne d'ubiquitine	41
1. Enzymes d'activation E1s	42
2. Enzymes de conjugaison E2s	42
3. Ubiquitine-ligases E3s	42
<i>a. Les deux grands types de E3s</i>	43
<i>b. Mode de reconnaissance du substrat</i>	44
4. Enzymes d'élongation E4s	45
C. Régulation du processus d'ubiquitinylation	45
1. Régulation générale	45
2. Régulation par des protéines dites "ubiquitine-like"	46
3. Recyclage de l'ubiquitine et enzymes de déubiquitinylation	47
<i>a. Diversité des enzymes de déubiquitinylation (DUBs)</i>	47
<i>b. Fonctions biologiques des enzymes de déubiquitinylation</i>	47
D. Exceptions à la voie classique d'ubiquitinylation	48

IV. Dégradation des protéines poly-ubiquitinylées par le protéasome	49
A. Adressage des protéines à dégrader au protéasome	49
1. Composants du système d'ubiquitylation	49
2. Chaperones et protéines de choc thermique	50
3. L'exemple de la protéine CHIP	51
B. Mécanisme général de la dégradation des substrats polyubiquitinylés	52
1. Reconnaissance de l'ubiquitine	52
2. Fixation du substrat	53
3. Déubiquitylation	53
4. Destructuration et translocation	53
5. Protéolyse	54
C. Exceptions à la voie classique de la dégradation par le protéasome	54
V. Implication du système ubiquitine-protéasome dans les processus cellulaires physiologiques	55
A. Dégradation associée au reticulum endoplasmique	56
B. Dégradation protéasomique et réponse immunitaire	58
C. Dégradation protéasomique et cycle cellulaire	59
D. Implication du système ubiquitine-protéasome dans l'apoptose	61
VI. Système ubiquitine - protéasome et pathologies humaines	62
A. Cancer	62
1. Généralités	62
2. Non-dégradation de protéines oncogéniques	63
3. Accélération de la dégradation de p27	64
4. p53, MDM2, E6 et cancers	66
5. Surexpression de l'EGFR	67
B. Maladies neuro-dégénératives	67
1. Généralités	67
2. Cas particulier de la maladie de Parkinson	68
C. Mucoviscidose	69
D. Syndrome de Liddle	69

E. Syndrome d'Angelman	70
VII. Conclusions	71
Chapitre 4 : Développement préclinique et clinique du bortézomib	72
I. Généralités	72
A. Classification des inhibiteurs de protéasome	72
B. Nouvelle génération d'inhibiteurs et modulateurs de l'activité du protéasome	75
C. Conséquences majeures de l'inhibition du protéasome	76
1. Introduction	76
2. Inhibiteurs de protéasome et induction de l'apoptose	77
3. Inhibiteurs de protéasome et réponse au choc thermique	77
4. Inhibiteurs de protéasome et spécificité tumorale	78
<i>a. Constatations précliniques et cliniques</i>	78
<i>b. Hypothèses proposées</i>	79
II. Principaux résultats des études précliniques concernant le bortézomib	81
A. Généralités	81
B. Tolérance du bortézomib	81
1. Etudes de pharmacologie de sécurité	81
2. Etudes de toxicologie	81
C. Activité antitumorale du bortézomib administré seul	82
D. Activité antitumorale du bortézomib administré en association	84
E. Conclusion des études précliniques	86
III. Développement clinique du bortézomib dans le traitement des tumeurs solides	87
A. Etudes de phase I	87
B. Etudes de phase II	89

1. Etudes de phase II du bortézomib administré seul	89
2. Etudes de phase II du bortézomib administré en association	90
C. Conclusions des essais cliniques dans le traitement des tumeurs solides	92
IV. Données cliniques	92
A. Schéma thérapeutique	92
B. Pharmacodynamie et pharmacocinétique	92
C. Effets indésirables	93
D. Résistance au bortézomib	94
E. Conclusion des études cliniques	94
VI. Mécanismes d'action du bortézomib	95
A. Induction de l'apoptose	95
1. Augmentation de l'activité pro-apoptotique de p53	95
2. Accumulation des molécules inhibitrices du cycle p21 et p27	95
3. Accumulation des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2	96
4. Activation des SAPK (<i>Stress-Activated Protein Kinase</i>)	96
5. Suppression des effets anti-apoptotiques de NF-κB	96
6. Stress du reticulum endoplasmique	97
B. Propriétés antiangiogéniques	97
C. Autres mécanismes d'action proposés	98
1. Effet sur la réparation de l'ADN	98
2. Effet sur le microenvironnement tumoral	98
VII. Inhibition du protéasome et radiosensibilisation	99
A. Etudes précliniques	99
B. Etudes cliniques	101
C. Mécanismes de radiosensibilisation	102
1. Généralités	102
2. Le facteur de transcription NF-κB	103
a. <i>Structure</i>	103

<i>b. Activation de NF-κB</i>	105
<i>c. NF-κB et réponse à la radiothérapie</i>	106

VIII. Conclusions	107
--------------------------	------------

TRAVAIL EXPERIMENTAL

Chapitre 5 : Objectifs	108
Chapitre 6 : Matériel et méthodes	110
I. Xénogreffes hétérotopiques de gliomes malins	110
A. Les souris <i>nude</i>	110
B. La xénogreffe tumorale	110
1. Procédure microchirurgicale	111
2. Suivi des tumeurs	111
II. Traitements et prélèvements tumoraux	112
A. Groupes de traitement	112
B. La radiothérapie	113
C. Le bortézomib	113
D. Les prélèvements	114
E. Extraction et dosage des protéines totales	114
III. Distribution des cellules dans le cycle cellulaire	115
A. Dissociation des tumeurs	115
B. Marquage à l'iodure de propidium et analyse en cytométrie en flux	116
IV. Détection immunohistochimique de la caspase-3 clivée et de l'antigène de prolifération Ki-67	116
A. Préparation des échantillons	116
B. Hybridation avec les anticorps	117
C. Révélation	117
V. Evaluation de l'activité chymotrypsine-like du protéasome	118

VI. Expression des formes actives de p65 et de p50	118
A. Principe	118
B. Fixation de p65 ou de p50 à sa séquence consensus	119
C. Liaison aux anticorps	119
D. Réaction colorimétrique	119
VII. Expression des gènes cibles de NF-κB par RT-PCR quantitative	120
A. Extraction des ARN totaux	120
1. Procédure d'extraction des ARN totaux	120
2. Vérification de la qualité et quantification des ARN extraits	121
B. Transcription inverse (RT)	121
1. Traitement des échantillons à la DNase	121
2. Transcription inverse (RT)	121
C. Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (PCRq)	122
1. Principe	122
2. Réalisation de la réaction	123
<i>a. Choix des amorces</i>	<i>123</i>
<i>b. Préparation des échantillons et réalisation de la PCRq</i>	<i>124</i>
<i>c. Purification de l'ADNc</i>	<i>124</i>
VIII. Analyse d'expression des protéines ubiquitinylées par western blot	125
A. Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide	125
B. Transfert sur membrane	127
C. Marquage par des anticorps	128
D. Révélation	129
IX. Analyses statistiques	129

Chapitre 7 : Résultats	130
I. Etudes de radiopotentialisation	130
A. Effets des traitements sur la croissance tumorale	130
B. Effets des traitements sur la survie des souris xénotransplantées	135
1. Courbes de Kaplan-Meier	135
2. Délais et retards de croissance tumorale	138
II. Effets cellulaires des traitements	140
A. Effets des traitements sur la prolifération cellulaire	140
1. Effets des traitements sur l'indice de prolifération	140
2. Effets des traitements sur la distribution dans le cycle cellulaire et la prolifération	145
<i>a. Distribution dans le cycle cellulaire</i>	<i>145</i>
<i>b. Calcul de l'indice de prolifération</i>	<i>147</i>
B. Effets des traitements sur l'indice apoptotique	150
III. Effets des traitements sur l'activité chymotrypsine-like du protéasome	155
A. Effets du bortézomib sur l'activité chymotrypsine-like du protéasome	155
1. Etude d'injections uniques	155
<i>a. Effets du bortézomib sur l'activité chymotrypsine-like du protéasome</i>	<i>155</i>
<i>b. Effets du bortézomib sur l'expression des protéines ubiquitinylées</i>	<i>157</i>
2. Etude d'injections répétées	158
<i>a. Effets du bortézomib sur l'activité chymotrypsine-like du protéasome</i>	<i>158</i>
<i>b. Effets du bortézomib sur l'expression des protéines ubiquitinylées</i>	<i>159</i>
B. Effets de la radiothérapie, associée ou non au bortézomib, sur l'activité chymotrypsine-like du protéasome	161
1. Effets de la radiothérapie sur l'activité chymotrypsine-like du protéasome	161
2. Effets du bortézomib sur l'activité chymotrypsine-like du protéasome radio-induite	162
IV. Effets des traitements sur l'activation du facteur de transcription NF-κB	164
A. Expression basale des sous-unités p65 et p50 de NF- κ B	164

B. Effets de la radiothérapie fractionnée ou non sur l'activation de NF- κ B	165
1. Expression des formes actives de p65 et p50	165
2. Effets de la radiothérapie sur l'expression des gènes cibles de NF- κ B (lignée TCG3)	168
C. Effets de l'association concomitante BTZ + RT sur l'activation de NF- κ B	170
1. Expression des formes actives de p65 et p50	170
2. Effets du bortézomib sur l'expression radio-induite des gènes cibles de NF- κ B (lignée TCG3)	173
V. Bilan de l'ensemble des résultats	176
Chapitre 8 : Discussion	178
I. Choix du modèle et des conditions de traitement	178
II. Effets du bortézomib <i>in vivo</i>	181
A. Absence d'efficacité antitumorale	181
B. Effets biologiques du bortézomib	184
III. Intérêt du bortézomib comme agent radiosensibilisant	189
A. Impact négatif du fractionnement sur les propriétés radiosensibilisantes du bortézomib	189
B. Réponses des tumeurs à la radiothérapie	195
1. Impact du fractionnement de la radiothérapie sur le volume tumoral	195
2. Activité chymotrypsine-like du protéasome en tant que cible de la radiothérapie	197
3. Place de NF- κ B dans la réponse à la radiothérapie	199
<i>a. Activation constitutive et cible pertinente dans le cadre des gliomes malins</i>	199
<i>b. NF-κB et radiothérapie</i>	201
4. Effets cellulaires de la radiothérapie	203

IV. Conclusions	206
Chapitre 9 : Conclusions et perspectives	208
Références bibliographiques	211

AVANT-PROPOS

Avant-propos

Depuis de nombreuses années, les découvertes et les innovations thérapeutiques se sont enrichies en mettant le patient au centre du processus de la recherche : c'est le concept de recherche translationnelle ou recherche de transfert. La recherche translationnelle, chaînon manquant entre recherche fondamentale et recherche clinique, doit assurer le lien entre une recherche fondamentale essentielle à tout progrès, et une recherche clinique, se préoccupant du patient dans sa réalité complexe d'être humain, en développant les applications médicales des connaissances les plus récentes. Ce type de recherche doit nécessairement se développer à proximité du patient, afin de permettre un flux bidirectionnel continu entre cliniciens et chercheurs. En oncologie, la recherche translationnelle a notamment pour objectif de :

- (i) tester la pertinence d'une hypothèse biologique pour le diagnostic, le pronostic, le traitement, la prévention ou l'analyse du risque de cancer,
- (ii) déterminer les bases biologiques d'une observation faite en clinique ou dans une population.

Ceci a pour conséquences d'améliorer le dialogue entre cliniciens et fundamentalistes, afin d'une part d'orienter la recherche fondamentale vers des problèmes pertinents au regard de la clinique, et d'autre part, de permettre aux cliniciens un accès efficace aux avancées les plus récemment acquises dans les laboratoires.

C'est dans ce contexte qu'a été effectuée l'étude rapportée dans ce mémoire. Les expérimentations ont en effet été réalisées au sein de l'EA 4001 "Radiopotentialisation : de la préclinique à la clinique" à la Faculté de Médecine de Nancy, dont la thématique de recherche

consiste à évaluer la possibilité d'obtenir une radiopotentialisation grâce à de nouveaux agents médicamenteux sur des modèles de xénogreffes de tumeurs d'origine humaine.

Au cours de notre étude, nous nous sommes intéressés à un type particulier de tumeurs cérébrales, les gliomes malins, dans le traitement duquel les associations radiothérapie-chimiothérapie concomitantes constituent depuis peu un standard thérapeutique post-chirurgical. En dépit de progrès très importants réalisés en neurochirurgie et en neuro-imagerie, le pronostic des patients atteints de gliome malin reste très péjoratif, avec une survie médiane atteignant seulement 15 mois. De nouveaux traitements ou une amélioration des thérapeutiques existantes sont donc nécessaires.

Les inhibiteurs de protéasome constituent une classe de médicaments anticancéreux récemment développée. Ces agents, classiquement décrits comme des inducteurs d'apoptose, ont démontré un potentiel cytotoxique intéressant sur de nombreuses lignées de cellules tumorales *in vitro*, dont les gliomes malins. En outre, ces molécules présentent des propriétés radiosensibilisantes démontrées aussi bien *in vitro* que *in vivo* sur divers modèles tumoraux. Aucune étude n'a été menée jusqu'à présent sur des modèles *in vivo* de gliome de haut grade.

Dans ce cadre, nos objectifs ont été d'évaluer l'intérêt d'un inhibiteur de protéasome, le bortézomib (Velcade®), en tant qu'agent radiosensibilisant sur deux modèles de gliome malin humain xénogreffés chez la souris *nude*. L'intégration de ce projet dans un contexte de recherche translationnelle nous a conduit à comparer l'effet des traitements en utilisant des schémas modelés sur la clinique (à la fois pour la chimiothérapie et pour la radiothérapie) avec des schémas plus classiquement utilisés dans les études précliniques. Nous avons ainsi été amenés à préciser les mécanismes moléculaires et cellulaires gouvernant les réponses à la radiothérapie et à la chimiothérapie administrés en évaluant l'impact du fractionnement "clinique" des traitements.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Les gliomes malins

Chapitre 1 : Les gliomes malins

I. Les tumeurs primitives du système nerveux central

A. Epidémiologie

1. Fréquence et mortalité

Les tumeurs primitives du système nerveux central sont des tumeurs rares qui sont estimées à 2% de l'ensemble des cancers de l'adulte et à 23% des cancers de l'enfant. Le recensement national de ces tumeurs chez l'adulte est en cours de mise en place à l'échelon français sous l'égide de l'Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française, de la Société Française de Neurochirurgie et de la Société Française de Neuropathologie. Classiquement, ces tumeurs incluent l'ensemble des gliomes, les méningiomes, les neurinomes, les lymphomes et les tumeurs embryonnaires (1).

L'incidence globale de l'ensemble des tumeurs primitives du système nerveux central (bénignes et malignes) est de 15,8 cas pour 100 000 habitants par an en France, similaire à celle retrouvée dans les pays industrialisés (1).

Les gliomes constituent un groupe hétérogène de tumeurs regroupant plus de 50% des tumeurs cérébrales primitives et sont principalement représentés par les tumeurs astrocytaires (notamment astrocytomes anaplasiques et glioblastomes), oligodendrocytaires et mixtes. Leur incidence spécifique est de l'ordre de 7,0 cas pour 100 000 habitants par an. Il existe une légère prédominance masculine. Tous gliomes confondus, le pic d'incidence se situe entre 50 et 65 ans. Toutefois, l'incidence des tumeurs gliales augmente très nettement avec l'âge :

ainsi, de 1,8 / 100 000 habitants par an entre 20 et 29 ans, l'incidence passe à 18,6 / 100 000 habitants par an entre 70 et 79 ans. Des études ont montré une incidence stable des gliomes dans tous les groupes d'âge, sauf pour les patients de plus de 85 ans où l'augmentation de l'incidence est avérée. Parmi les gliomes, les glioblastomes sont les plus fréquents avec une incidence de 5,3 pour 100 000 habitants par an (2, 3).

Les tumeurs cérébrales primitives représentent 2% de la mortalité par cancer et sont la seconde cause de mortalité tumorale chez les enfants de moins de 15 ans après les leucémies. En dépit des progrès réalisés en imagerie, en neurochirurgie ainsi que dans les approches thérapeutiques, le pronostic des patients atteints de tumeurs cérébrales primitives reste très péjoratif : dans le cas des formes les plus graves (glioblastome), la survie médiane n'excède pas 15 mois et moins de 3% des patients sont toujours vivants 5 ans après le diagnostic (4).

2. Facteurs de risques

Il a été démontré qu'une irradiation cérébrale, notamment réalisée dans l'enfance exposait au risque de tumeur cérébrale secondaire (irradiation prophylactique de l'encéphale dans le cadre des leucémies aiguës lymphoblastiques, par exemple). Indépendamment de ces situations spécifiques, aucun facteur professionnel ou d'environnement n'a démontré son implication dans le développement des tumeurs cérébrales, même si des agents chimiques comme les pesticides organochlorés sont soupçonnés d'intervenir dans la genèse de ces tumeurs (5, 6). Par ailleurs, certains syndromes génétiques sont associés à un risque accru de développement de tumeurs cérébrales. C'est notamment le cas des neurofibromatoses de type I et II, de la sclérose tubéreuse, des syndromes de Turcot et de Li-Fraumeni (5, 6).

B. Caractéristiques spécifiques des gliomes malins

Les tumeurs gliales présentent des caractéristiques originales qui rendent leur traitement difficile. Tout d'abord, elles affectent un organe hautement fragile, le cerveau, doté d'un environnement immunologique privilégié et muni d'une barrière hémato-cérébrale qui le rend peu accessible aux agents administrés par voie générale. En outre, les tumeurs gliales présentent une très grande capacité à infiltrer le tissu cérébral avoisinant, souvent sur de très

grandes distances (jusqu'à plusieurs centimètres). Par ailleurs, il s'agit de tumeurs particulièrement agressives et résistantes à la radiothérapie et à la chimiothérapie (2). Paradoxalement, ces tumeurs qui acquièrent un phénotype d'une extrême malignité restent en règle générale confinées au système nerveux et ne métastasent pratiquement jamais en dehors du névraxe (7).

C. Classification histologique des tumeurs gliales

La classification histologique des gliomes est un des problèmes importants en neuro-oncologie. La classification d'un gliome engage le pronostic des patients et participe de façon décisive aux choix thérapeutiques. Or, les échantillons analysés ne sont pas forcément représentatifs en raison de l'hétérogénéité tumorale qui risque de conduire à des erreurs de classification, notamment lors de l'analyse de biopsies stéréotaxiques. La classification de l'OMS établie en 2000, mise à jour en 2007, est la classification internationale de référence et repose sur des critères purement histologiques (Tableau I). Les tumeurs astrocytaires sont gradées de I à IV en fonction du degré de malignité clinique (malignité croissante de I à IV) et de l'aspect différencié et/ou anaplasique de la tumeur. Les tumeurs oligodendrogiales sont divisées en oligodendrogliomes (grade II) et en oligodendrogliomes anaplasiques (grade III). Lorsque les tumeurs sont composées d'une association évidente de deux types de cellules néoplasiques ressemblant morphologiquement aux cellules tumorales des oligodendrogliomes et des astrocytomes, elles sont divisées en oligo-astrocytomes (grade II) et en oligo-astrocytomes anaplasiques (grade III) (8, 9).

Tableau I : Classification histologique des tumeurs gliales selon l'OMS (2007) (8, 9).

Type histologique	Différenciation	Densité cellulaire	Atypies nucléaires	Activité mitotique	Nécrose	Prolifération vasculaire
Astrocytomes diffus (grade II)	haut degré de différenciation	modérée	occasionnelles	absente ou 1 mitose	absente	absente
Tumeurs astrocytaires	Astrocytomes anaplasiques (grade III)	augmentée diffusément ou focalement	présentes	présente	absente	absente
	Glioblastomes (grade IV)	élevée	marquées	marquée	présente	présente
Tumeurs oligodendrogiales	Oligodendrogliomes (grade II)	bien différencié	possiblement marquées	absente ou mitoses occasionnelles	absente ou peu conséquente	non proéminente
	Oligodendrogliomes anaplasiques (grade III)	Anaplasie focale ou diffuse	éventuellement marquées	éventuellement forte	possible	possible
Tumeurs oligo-astrocytaires	Oligo-astrocytomes (grade II)	faible ou modérée	-	absente ou faible	absente	absente
	Oligo-astrocytomes anaplasiques (grade III)	éventuellement forte	éventuellement présentes	éventuellement forte	possible	possible

La classification morphologique actuelle des gliomes selon l'OMS est peu satisfaisante. Par ailleurs, la classification de l'OMS est peu satisfaisante, la reproductibilité entre les observateurs étant faible. En outre, des tumeurs présentant une morphologie commune peuvent être génétiquement différentes et peuvent avoir des évolutions différentes, en dépit de facteurs histo-pronostiques similaires (2, 10). Ceci est bien démontré en comparant à histologie égale le comportement cellulaire et les caractéristiques en biologie moléculaire des gliomes malins des adultes et des enfants (11). Il existe d'autres classifications comme celle de l'hôpital Sainte-Anne qui associe au diagnostic purement histologique les données de la clinique et de l'imagerie (12). Ainsi, certains auteurs proposent d'intégrer dans les classifications les données de biologie moléculaire (13). Actuellement, aucun marqueur biologique n'est clairement validé en clinique à l'échelon individuel pour les patients atteints de tumeurs cérébrales. Houillier, et coll. (14) ont évalué l'impact pronostique de différents marqueurs (perte d'hétérozygotie sur les chromosomes 1p, 9p, 10q et 19q, amplification de l'EGFR¹, expression de p53) sur une série de 220 patients atteints de glioblastome primaire. Les résultats montrent qu'il est difficile, pour les glioblastomes, de définir des marqueurs biologiques de bon ou de mauvais pronostic et que les meilleurs facteurs prédictifs du pronostic sont l'âge et l'indice de Karnofsky. Cependant, la valeur pronostique de différents marqueurs biologiques (statut MGMT² pour les glioblastomes ou statut 1p19q pour les oligodendrogliomes par exemple) est en cours d'évaluation. Un certain nombre d'études cliniques, comme l'étude EORTC CATNON actuellement en cours, intègre ce type de données afin d'augmenter l'homogénéité des populations étudiées (15, 16).

D. Gliomagenèse

1. Altérations génétiques impliquées

La gliomagenèse fait intervenir des altérations moléculaires telles que des amplifications, des mutations, des réarrangements ou des délétions chromosomiques. Ces altérations touchent différents proto-oncogènes (*EGFR*, *PDGFR*, *MDM2*) et gènes suppresseurs de tumeur (*P16*, *P53*, *Rb*, *PTEN*). La perte d'hétérozygotie du chromosome 10 est l'altération génétique la plus fréquemment observée, survenant dans 60 à 80% des cas de glioblastomes. L'amplification du

¹ *Epidermal Growth Factor Receptor*

² *O6-MethylGuanine-DNA MethylTransferase*

récepteur à l'EGF³ survient dans environ 40% des glioblastomes, cette amplification étant prédictive d'une mauvaise survie pour certains groupes de patients (2, 17, 18).

Il semble que le développement de la tumeur et la progression d'une lésion de bas grade vers un gliome de haut grade fassent intervenir des combinaisons particulières d'altérations moléculaires (Figure 1). Ces profils particuliers présenteraient un intérêt pronostique, comme c'est le cas pour les pertes d'hétérozygotie en 1p/19q pour les oligodendrogliomes plus chimiosensibles (2, 19).

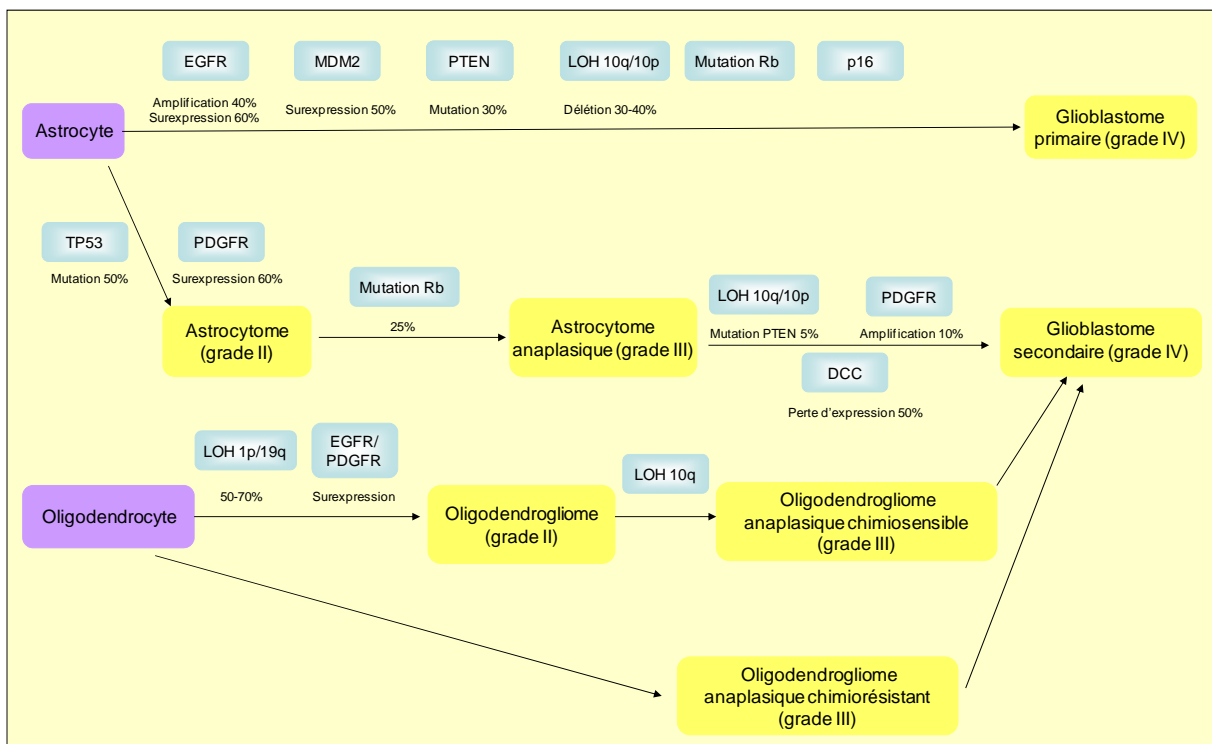


Figure 1 : Anomalies génétiques impliquées dans le développement des tumeurs gliales. DCC : Deleted in Colon Cancer, EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor, LOH : Loss Of Heterozygosity, MDM : Mouse Double Minute, PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor Receptor, PTEN : Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome 10, Rb : Retinoblastoma protein. Adapté d'après Lefranc, et coll. (20)

³ PDGFR : Platelet Derived Growth Factor Receptor ; MDM2 : Mouse Double Minute 2 ; Rb : Retinoblastoma protein ; PTEN : Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome 10 ; EGF : Epidermal Growth Factor.

2. L'hypothèse des cellules souches tumorales

Afin d'améliorer la connaissance des gliomes et de proposer des thérapeutiques nouvelles, il est indispensable d'identifier l'origine cellulaire de cette pathologie. La transformation néoplasique des cellules gliales pleinement différenciées est le mécanisme communément accepté de la gliomagénèse. Toutefois, cette hypothèse n'a jamais été véritablement vérifiée et le concept de dédifférenciation des cellules gliales matures ne permet pas d'expliquer l'origine de certains types de gliomes comme les oligoastrocytomes mixtes (21).

Des études récentes ont montré que tous les tissus adultes possèdent leur propre réservoir de cellules souches, capables aussi bien de s'auto-renouveler que d'entrer dans les voies de différenciation. De plus en plus d'arguments suggèrent que les tumeurs contiennent également leurs propres cellules souches (22). L'identification d'une sous-population de cellules tumorales cérébrales possédant des propriétés tumorigéniques renforce l'hypothèse des cellules souches cancéreuses à l'origine des tumeurs solides (21, 23). Ces cellules, mises en évidence à la fois chez des enfants et des adultes, sont caractérisées par un certain nombre de marqueurs comme la protéine CD133 (marqueur également des cellules souches neurales normales) (24-26). Les cellules tumorales possédant ce marqueur présentent des capacités illimitées d'auto-renouvellement ainsi que la propriété d'initier une progression tumorale lorsqu'elles sont implantées chez l'animal avec les mêmes caractéristiques d'hétérogénéité tumorale (27, 28). Par ailleurs, au niveau clinique, Zeppernick, et coll. ont étudié le niveau d'expression du marqueur CD133 sur 95 prélèvements de gliome de grades différents. Leurs résultats montrent que la proportion des cellules CD133 positives est corrélée aussi bien à la survie sans progression qu'à la survie globale, indépendamment du grade de la tumeur, de l'étendue de la résection chirurgicale et de l'âge du patient. Pour les gliomes de grade II et III, la proportion des cellules CD133 positives est un facteur de risque indépendant de progression maligne (29). Enfin, les cellules tumorales dites "souches" seraient capables d'échapper aux effets cytotoxiques de la radiothérapie et de la chimiothérapie et seraient responsables, au moins pour partie, des récurrences (30-36).

II. Prise en charge thérapeutique des patients atteints de gliome malin

Les modalités de prise en charge thérapeutique des gliomes malins dépendent à la fois de l'état général du patient (âge, index de Karnofsky, co-morbidités associées) et de l'imagerie (topographie, volume, caractéristiques radiologiques de la lésion) qui conditionnent l'opérabilité théorique. La prise en charge thérapeutique des gliomes malins associe actuellement chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie.

A. La chirurgie

Lorsqu'elle est possible, la chirurgie occupe une place prépondérante dans le traitement des gliomes. Elle est réalisée chez environ 75% des patients et doit être la plus complète possible. Non seulement, elle permet d'établir un diagnostic anatomopathologique mais elle assure une amélioration de la qualité de vie du patient par la levée du syndrome compressif. Néanmoins, en dépit des progrès réalisés en neurochirurgie, l'exérèse reste le plus souvent sub-totale. En effet, les gliomes récidivent quasi systématiquement après chirurgie, notamment en raison des cellules tumorales qui envahissent le parenchyme cérébral normal, à distance de la lésion primitive. Si l'exérèse est impossible, une biopsie est réalisée afin de poser le diagnostic histologique (37).

B. La radiothérapie

La radiothérapie externe conventionnelle est le traitement post-opératoire standard des gliomes de haut grade. Les modalités classiques d'irradiation consistent en une dose totale de 54 à 60 Gy, délivrée à raison de 1,8 à 2 Gy par fraction par jour, 5 jours par semaine pendant 6 semaines. Le volume tumoral moyen est défini par la prise de contraste en IRM, ou en cas d'exérèse complète aux bords de la cavité opératoire, avec une marge de sécurité de 2 cm dans les 3 dimensions de l'espace (37, 38). La radiothérapie permet une amélioration significative de la survie des patients (2, 39). Toutefois, la tolérance du tissu cérébral normal empêche l'utilisation de fortes doses susceptibles d'être curatives, et la radiothérapie est responsable de séquelles graves (démences, déficits intellectuels, neuropathies...), notamment chez l'enfant (39).

D'autres modalités d'irradiation (curiethérapie, radiothérapie hyperfractionnée) ont également été évaluées mais ne constituent pas actuellement des standards thérapeutiques (38).

C. La chimiothérapie

La chimiothérapie a longtemps occupé une place mal définie dans le traitement des gliomes malins. En effet, la barrière hémato-encéphalique (BHE) est généralement considérée comme un obstacle majeur à l'action de la chimiothérapie. Cependant, les altérations du parenchyme cérébral en situation tumorale génèrent une hyperperméabilité vasculaire et la constitution d'œdème. Ceci témoigne d'un dysfonctionnement localisé de la BHE, ici appelée barrière hémato-tumorale, et suggère le passage de nombreux agents utilisés en chimiothérapie anticancéreuse (40). La chimiothérapie dans le cadre des tumeurs cérébrales n'est pas curative mais l'objectif de ce traitement est principalement de contrôler la croissance de la tumeur et de maintenir une qualité de vie correcte aussi longtemps que possible (37).

Historiquement administrée en tant que thérapie adjuvante, les bénéfices obtenus en termes de survie grâce à la chimiothérapie restent modestes. Les molécules utilisées en première ligne appartenaient à la famille des nitrosourées. En deuxième ligne, le témozolomide, les sels de platine et la procarbazine pouvaient être prescrits (41). Depuis 2005, le témozolomide a obtenu une AMM européenne dans le traitement des glioblastomes nouvellement diagnostiqués en association concomitante à la radiothérapie. Cette même molécule est ensuite administrée de façon adjuvante en monothérapie (42). La survie médiane des patients suivant ce schéma de traitement est d'environ 16 mois (43).

Pour les patients atteints d'astrocytome anaplasique, la radiothérapie reste le traitement de référence (38). Néanmoins, des schémas associant radiothérapie et témozolomide en situation concomitante et/ou adjuvante peuvent être proposés pour certains patients (étude EORTC CATNON) (15).

Pour les tumeurs à composante oligodendrogliale (oligodendrogliomes et oligoastrocytomes anaplasiques), deux options thérapeutiques sont possibles après le geste chirurgical. La

première repose sur une radiothérapie adjuvante suivie d'une chimiothérapie soit de type PCV (procarbazine, lomustine et vincristine) soit par témozolomide. L'autre option thérapeutique est inverse avec une chimiothérapie première de type PCV ou témozolomide, suivie immédiatement ou de façon différée par la radiothérapie (38, 44).

D. Prise en charge thérapeutique à la récurrence

Dans le cas des glioblastomes et des astrocytomes anaplasiques récidivants, il n'existe aucun traitement standard unanimement reconnu. L'inclusion de patients dans des essais cliniques est recommandée. Plusieurs options thérapeutiques peuvent être envisagées :

- une réintervention chirurgicale ;
- une chimiothérapie systémique (témozolomide, nitrosourées) ou locale (carmustine en implants, Gliadel[®]) ;
- une ré-irradiation, dans certains cas particuliers, selon des modalités diverses (curiethérapie...)
- les soins palliatifs sans traitement oncologique spécifique (38).

Dans le cas des oligodendrogliomes et oligoastrocytomes anaplasiques, tumeurs plus chimiosensibles, l'attitude thérapeutique dépend du traitement de première intention. Une chimiothérapie de deuxième ligne par témozolomide ou par PCV (selon le schéma choisi en première ligne) peut être proposée (38, 44).

E. Nouvelles approches chimiothérapeutiques

La faible efficacité des thérapeutiques conventionnelles dans le traitement des gliomes de haut grade a justifié le développement de nouvelles approches thérapeutiques plus ciblées sur les caractéristiques biologiques et moléculaires de ces tumeurs (Tableau II).

Un des principaux axes de recherche concerne la surexpression du récepteur à l'EGF et l'activation des voies de transduction qui en découlent, notamment PI3K/Akt, et Ras/Raf/MAPK. Les agents anti-angiogéniques, également en cours d'investigation devraient probablement trouver leur place dans l'arsenal thérapeutique puisque le degré de malignité et la croissance des tumeurs gliales sont dépendants de leur néovascularisation. Les résultats des essais cliniques, menés presque toujours sur les glioblastomes en récurrence, ont été généralement décevants. La complexité des interactions entre les différentes voies d'activation limite l'efficacité d'un agent utilisé seul. La combinaison de ces nouvelles molécules entre elles ou avec la radiothérapie ou la chimiothérapie conventionnelle sera probablement nécessaire pour mettre en évidence un intérêt thérapeutique réel. Des efforts de recherche doivent également être réalisés afin de définir des marqueurs biologiques ou moléculaires précoces d'efficacité qui faciliteront la sélection des combinaisons optimales (45).

Tableau II : Essais cliniques mettant en œuvre des agents de thérapie ciblée dans les gliomes de haut grade (46, 47).

Cible	Agent	Phase	Type histologique	Réponses	PFS-6	Références
<i>Facteurs de croissance</i>						
VEGF	Bevacizumab + irinotécan	II	GM récurrent	RC + RP 63%	GBM 43% AA 61%	Vredenburgh, et coll. 2007
	Bevacizumab + témozolomide		GBM récurrent	PR 37,5% - MS 37,5%	<i>nd</i>	Maron, et coll. 2008
	Bevacizumab + erlotinib	II	GBM récurrent	Réponse radiographique 48%	24%	Sathornsumetee, et coll. 2008
	Aflibercept	II	GBM récurrent	GBM : RP 34% - MS 50% AA : RC 14% - RP 36% - MS 13%	<i>nd</i>	De Groot, et coll. 2008
<i>Récepteurs des facteurs de croissance</i>						
EGFR	Gefinitib	II	GBM récurrent (1 ^{ère} rechute)	Pas de réponse radiographique	17%	Rich, et coll. 2004
	Gefitinib + RCh	I	GM récurrent	<i>nd</i>	<i>nd</i>	Schwer, et coll. 2008
	Erlotinib (± témozolomide)	I/II	GM récurrent	RP 14%	11%	Prados, et coll. 2006
	Erlotinib + sirolimus	II	GBM récurrent	MS 33%	<i>nd</i>	Friedman, et coll. 2008
	Erlotinib	I/II	GM récurrent	RP 6-25%	10-20%	Vogelbaum, et coll. 2004 Raizer, et coll. 2004
	Erlotinib + RT	I	GBM nouvellement diagnostiqué	TTP 26 sem	<i>nd</i>	Krishnan, et coll. 2006
	Cetuximab	II	GBM récurrent	<i>nd</i>	<i>nd</i>	Sadones, et coll. 2006
VEGFR	Valatinib (± témozolomide ou lomustine)	I/II	GBM récurrent	RP 4% - MS 66% - TTP 12 à 16 sem		Conrad, et coll. 2004. Reardon, et coll. 2004
	Valatanib + imatinib + hydroxyurée	I	GM récurrent	RP 22% - MS 51%	27%	Kirkpatrick, et coll. 2008
PDGFR	Imatinib mesylate	II	GM récurrent	<i>nd</i>	GBM 12% AA 9%	Wen, et coll. 2006
	Imatinib mesylate + hydroxyurée	II	GBM récurrent	<i>nd</i>	GBM 3% AA 10%	Reardon, et coll. 2005
<i>Effecteurs intracellulaires</i>						
RAS (farnésyltransférase)	Tipifarnib	I/II	GBM récurrent	<i>nd</i>	GBM 12% AA 9%	Cloughesy, et coll. 2006
	Lonafarnib (+ témozolomide)	I	GBM récurrent	RP 27%	33%	Gilbert, et coll. 2006

RAF (+VEGFR-2)	Sorafenib (+ erlotinib, tipifarnib ou temsirolimus)	I/II	GM récurrent	<i>nd</i>	<i>nd</i>	-
AKT	Perifosine	II	GM récurrent	<i>nd</i>	<i>nd</i>	-
mTOR	Rapamycine	I	GBM récurrent	Réponse radiographique 13%	<i>nd</i>	Cloughesy, et coll. 2008
	Sirolimus (+ géfitinib)	I	GM récurrent	RP 6% - MS 38%	<i>nd</i>	Reardon, et coll. 2006
	Temsirolimus	I/II	GBM récurrent	Réponse radiographique 5-36%	2,5-7,8%	Galanis, et coll. 2005. Chang, et coll. 2006
	Temsirolimus (+ erlotinib)	I/II	GM récurrent	<i>nd</i>	<i>nd</i>	-
	Everolimus (+AEE788)	I	GBM récurrent	<i>nd</i>	<i>nd</i>	-
PKC- β	Enzastaurin	II	GM récurrent	GBM : RP 22% + MS 5% AA : RP 24% + MS 13%		Fine, et coll. 2005
	Enzastaurin vs. lomustine	III	GM récurrent	<i>nd</i>	<i>nd</i>	-
<i>Inhibiteurs de multiples kinases</i>						
EGFR, VEGFR	AEE788	I	GBM récurrent	<i>nd</i>	<i>nd</i>	-
	Vandetanib (ZD6474)	I/II	GM récurrent + gliomes de bas grade en progression	<i>nd</i>	<i>nd</i>	-
EGFR, HER2/neu	Lapatinib	II	GBM récurrent	<i>nd</i>	<i>nd</i>	-
	Lapatinib (+pazopanib, inhibiteur du VEGF)	I/II	GM récurrent	<i>nd</i>	<i>nd</i>	-
PDGFR/VEGFR	Sunitinib (SU11248)	I/II	GBM récurrent	<i>nd</i>	<i>nd</i>	-
FLT-3, PDGFR, c- KIT	Tandutinib (MLN518)	I/II	GBM récurrent	<i>nd</i>	<i>nd</i>	-
	Sunitinib	II	GM récurrent	MS 22%	<i>nd</i>	Chaskis, et coll. 2008
<i>Divers</i>						
Proteasome	Bortezomib	I/II	GM récurrent	<i>nd</i>	<i>nd</i>	Phuphanich, et coll. 2006
Intégrines	Cilengitide	I	GM récurrent	RC 4% - RP 6% - MS 8%	<i>nd</i>	Nabors, et coll. 2004
Src	Dasatinib	II	GBM récurrent	<i>nd</i>	<i>nd</i>	-

Fuseau mitotique	Sapogilone	II	GBM récurent	MS 33%	<i>nd</i>	Stupp, et coll. 2008
	Sapogilone	II	GM récurent	MS 60%	<i>nd</i>	Silvani, et coll. 2008
HDAC	Vorinostat + témozolomide	I	GM récurent	<i>nd</i>	<i>nd</i>	-
	Vorinostat	II	GBM récurent	<i>nd</i>	<i>nd</i>	-
	Depsipeptide	I/II	GM récurent	<i>nd</i>	<i>nd</i>	-
	Acide valproïque (+RT/témozolomide)	II	MG nouvellement diagnostiqué	<i>nd</i>	<i>nd</i>	-

RC : Réponse Complète ; RP : Réponse Partielle ; MS : Maladie Stable ; nd : non disponible ; GM : Gliome Malin ; GBM : Glioblastome ; RT : RadioThérapie ; RCh : RadioChirurgie ; VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor ; VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor ; mTOR : Mammalian Target Of Rapamycin ; PKC- β : Protein Kinase C β ; HER2/neu : Human Epidermal growth factor Receptor 2 ; FLT-3 : FMS Like Tyrosine kinase 3 ; Src : SaRComa protein kinase ; HDAC : Histone DeAcetylase .

F. Traitements médicaux associés

Un certain nombre de traitements peuvent être associés aux moyens thérapeutiques cités ci-dessus. Ils sont à visée symptomatologique et/ou préventive : il s'agit notamment de traitements anti-épileptiques, anti-oedémateux, antalgiques, anti-émétiques et anti-coagulants (38). Ces traitements peuvent avoir un effet sur la pharmacocinétique des agents anticancéreux, comme cela est bien décrit dans le cas des anti-épileptiques et de l'irinotécan (48).

III. Conclusions

La survie médiane des patients atteints des formes les plus graves de gliome malin est seulement de l'ordre de 15 mois. La recherche dans le domaine s'intéresse notamment au développement des connaissances fondamentales concernant la gliomagenèse, avec une attention particulière pour les cellules souches tumorales. En outre, une amélioration de la classification des tumeurs cérébrales est nécessaire afin d'améliorer la prise en charge thérapeutique. L'intégration des données de biologie moléculaire constituera certainement un apport fondamental et permettront de mieux définir quels groupes de patients sont susceptibles de bénéficier de thérapies plus ciblées. Enfin, de nouveaux schémas de traitement ainsi que de nouveaux agents de chimiothérapie (notamment les molécules de thérapie dite ciblée) sont en cours d'évaluation tant au niveau préclinique que clinique. La combinaison de ces thérapies ciblées entre elles et/ou avec des traitements anticancéreux conventionnels (chimiothérapie et radiothérapie) apparaît comme une stratégie prometteuse.

Chapitre 2 : Les associations radio-chimiothérapie concomitantes

Chapitre 2 : Les associations radio-chimiothérapie concomitantes

I. Introduction

Les associations de radiothérapie et de chimiothérapie sont largement utilisées dans le traitement des cancers. Parmi ces associations, l'administration concomitante des deux modalités thérapeutiques est une option de plus en plus utilisée.

Le but des associations radio-chimiothérapiques concomitantes est de tirer bénéfice du potentiel curatif des deux modalités sans majorer la toxicité au-delà du seuil où le traitement devient intolérable. Classiquement, la radiothérapie cible la tumeur en épargnant, autant que faire se peut, le tissu sain environnant (contrôle loco-régional). La chimiothérapie vise en plus la stérilisation des micrométastases à distance. En outre, chaque modalité est susceptible d'interférer avec l'autre. En particulier, la chimiothérapie, soit en réduisant le volume tumoral, soit en affectant la progression du cycle cellulaire ou la réparation des lésions radio-induites de l'ADN, a souvent pour effet une amélioration du contrôle local (49).

Plusieurs médicaments anticancéreux occupent déjà une place privilégiée dans les associations radio-chimiothérapiques, en raison des résultats obtenus en clinique. Il s'agit du 5-fluorouracile, des sels de platine, des inhibiteurs des topoisomérases I et II.

L'association concomitante de la radiothérapie et de la chimiothérapie a permis l'amélioration du contrôle local et du taux de survie globale dans un certain nombre de tumeurs solides. Les associations radio-chimiothérapie concomitantes trouvent également un intérêt dans la préservation d'organes, par exemple le larynx ou le canal anal. Une autre possibilité est de

réduire le stade de la maladie pour permettre une chirurgie plus complète. Les effets secondaires de ce type d'association sont considérés comme acceptables en regard de leur efficacité. Toutefois, l'association à la radiothérapie des chimiothérapies dites ciblées, *a priori* moins toxiques, constitue une nouvelle voie de recherche particulièrement intéressante (49).

II. Principales interactions entre la radiothérapie et les agents cytotoxiques

Il existe différents types théoriques d'interaction entre radiothérapie et chimiothérapie. Le "résultat" thérapeutique de ce type d'association provient généralement de l'intrication des effets des deux modalités à plusieurs niveaux.

A. Coopération spatiale

La coopération spatiale repose sur le principe que la radiothérapie est destinée au contrôle local de la progression tumorale, alors que la chimiothérapie vise à éradiquer les cellules métastatiques disséminées dans l'organisme. Chacun des deux agents est censé agir indépendamment l'un de l'autre au niveau de l'organisme entier. Dans ce cas, l'association n'est envisageable que si les toxicités de deux thérapeutiques sont indépendantes et ne risquent pas de conduire à une réduction de dose de l'un des deux traitements, ce qui pourrait en atténuer l'efficacité (50, 51).

B. Modification de l'incidence des lésions radio-induites

Il s'agit d'une interaction dite "stérique", car elle résulte de l'intrication des actions des radiations ionisantes et de certains agents anticancéreux au niveau de l'ADN. Cette interaction est la conséquence de la conversion, par le médicament, des cassures simple-brin induites par les radiations en cassure double-brin, en raison de la survenue, à proximité de la première cassure radio-induite, d'une seconde cassure chimio-induite. Il faut souligner le fait que les régions de l'ADN les plus actives en termes de transcription sont aussi les plus sensibles aux radiations et aux médicaments anticancéreux, ce qui explique que l'accumulation, dans un volume restreint, d'un nombre important de lésions focalisées, provoque une létalité

importante. Ceci a particulièrement été mis en évidence pour les associations des sels de platine avec la radiothérapie (49, 51, 52).

C. Réduction de la masse tumorale et réoxygénation

Les cellules hypoxiques sont nettement moins sensibles aux radiations ionisantes, les cellules hypoxiques étant 2 à 3 fois moins sensibles à la radiothérapie que les cellules en normoxie (52). La chimiothérapie, en réduisant la masse tumorale et donc la pression interstitielle des fluides, peut permettre d'améliorer l'apport sanguin à la tumeur et ainsi entraîner une réoxygénation, source d'une meilleure radiosensibilité des cellules tumorales. La radiothérapie peut également améliorer la réponse cellulaire aux agents chimiques en réduisant la masse tumorale et en augmentant l'apport sanguin, ce qui favorise l'accès de la tumeur aux agents chimiques (50).

D. Toxicité sélective pour les cellules hypoxiques

L'hypoxie tumorale constitue un facteur de radiorésistance majeur et constant. Ainsi, l'administration simultanée de molécules susceptibles de réduire l'hypoxie (érythropoïétine recombinante humaine, tirapazamine) est susceptible de potentialiser l'effet antitumoral de la radiothérapie (49, 52, 53).

E. Toxicité sélective selon les phases du cycle cellulaire

La sensibilité aux radiations ionisantes varient selon les différentes phases du cycle cellulaire : la phase la plus radiosensible est représentée par la fin de la phase G2 et par la phase M alors que les cellules en phase S sont les plus radiorésistantes. Si on utilise de façon concomitante à la radiothérapie un agent chimique dont la cytotoxicité est prédominante en phase S, on peut espérer une action plus efficace sur l'ensemble des cellules engagées dans le cycle cellulaire (50).

F. Coopération cytotocinétique

La radiorésistance de la phase S constitue un facteur d'échec dans les tumeurs à croissance rapide. Dans le cas de la coopération cytotocinétique, l'une des modalités bloque les cellules dans une phase du cycle cellulaire qui est celle où l'autre modalité est la plus cytotoxique. Cette interaction peut se concevoir dans les deux sens, les radiations bloquant les cellules en phase G2, qui est celle où certains anticancéreux ont leur activité maximale ; ou bien l'anticancéreux bloquant les cellules en phase M, qui est celle où l'activité des radiations est maximale (50, 51). Ces mécanismes sont décrits pour des molécules comme les taxanes, la gemcitabine et l'étoposide (52).

G. Action au niveau de la réparation de l'ADN

L'ADN est la cible privilégiée de la radiothérapie. Les lésions radio-induites de l'ADN sont prises en charge par les systèmes de réparation et demeurent subléthales. L'adjonction concomitante d'un agent anticancéreux peut entraîner l'inhibition ou l'empêchement de ces réparations et convertir ainsi des lésions subléthales en lésions léthales. L'inhibition de la réparation de l'ADN peut être causée par une interaction "métabolique" entre radio- et chimiothérapie, et résulter d'une privation, par le médicament anticancéreux, des nucléotides nécessaires à la réparation des lésions radio-induites de l'ADN, en particulier la thymidine. Par ailleurs, des effets d'encombrement stérique (notamment la présence d'adduits) peuvent gêner la réparation des lésions radio-induites (50, 51). Ce effet a été rapporté pour de nombreuses molécules anticancéreuses, comme la doxorubicine, le 5-fluorouracile, les analogues nucléosidiques ou encore le cisplatine (52).

H. Conclusion : mesure de l'effet des associations radio-chimiothérapie concomitantes

Les combinaisons entre radio- et chimiothérapie peuvent produire différents types d'effets (Figure 2, Tableau III), qui sont le résultat direct des multiples modes d'interaction entre les deux modalités.

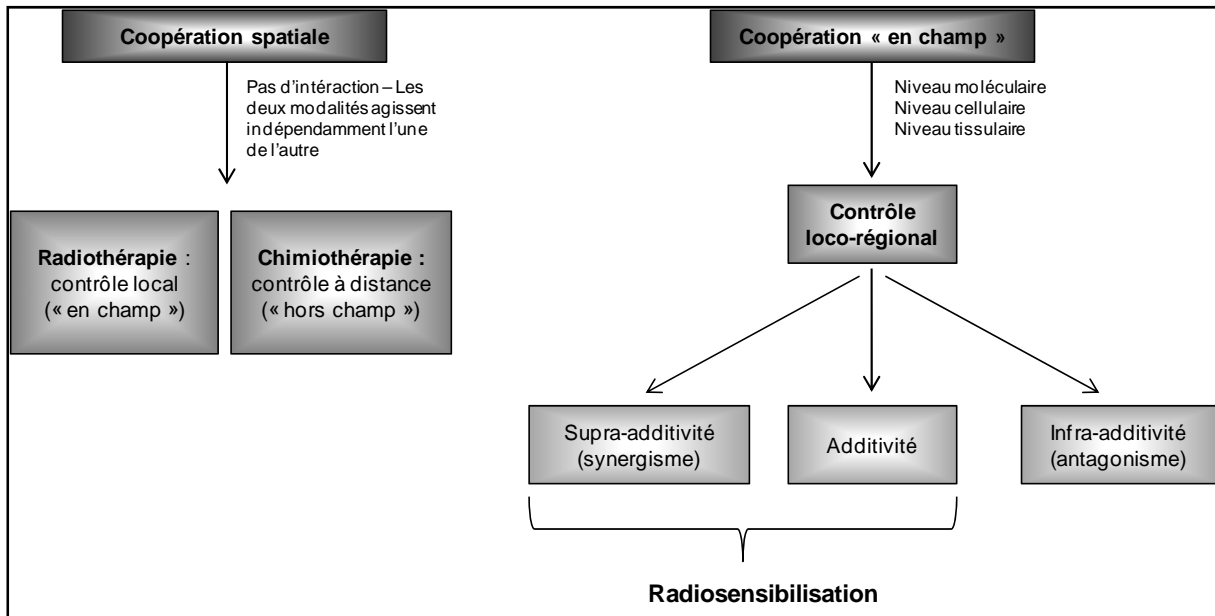


Figure 2 : Les deux types de coopération entre radiothérapie et chimiothérapie. Les deux mécanismes contribuent généralement à l'effet final observé. *Adapté d'après Seiwert, et coll. (52)*

Tableau III : Les différents types d'interaction entre chimiothérapie et radiations ionisantes
Adapté d'après Hennequin, et coll. (54).

Antagonisme	L'association des deux agents aboutit à un effet moindre que celui de l'agent le moins efficace utilisé isolément.
Inhibition	L'association des deux agents résulte en un effet moindre que celui de l'agent le plus efficace utilisé isolément.
Effet infra-additif	L'effet de l'association est inférieur à la somme des effets cumulés de chaque modalité mais supérieur à l'effet de chacune des modalités étudiées séparément.
Effet additif	L'effet de l'association est égal à la somme des effets cumulés de chaque modalité utilisée séparément.
Effet supra-additif ou synergique	L'effet de l'association est supérieur à la somme des effets cumulés de chaque modalité.

La radiopotentialisation peut se définir comme la présence d'une synergie d'action entre les radiations ionisantes et l'agent chimique alors que ce dernier n'a pas d'activité cytotoxique propre (54).

III. Associations radio-chimiothérapie concomitantes dans le traitement des gliomes de haut grade

A. Généralités

Les bénéfices apportés par la radiothérapie dans la survie des patients atteints de glioblastome sont connus depuis la fin des années 1970. Plusieurs études de phase III ont démontré que la radiothérapie focalisée en post-opératoire permettait d'augmenter la médiane de survie, faisant de cette approche un standard thérapeutique. De nombreuses études ont ensuite cherché à augmenter l'efficacité de l'irradiation en modifiant les modalités d'administration (radiothérapie hypo- ou hyperfractionnée, irradiation accélérée...). Aucune stratégie ne s'est cependant révélée supérieure au protocole standard : irradiation focalisée de 60 Gy en 5 fractions de 2 Gy par semaine pendant 6 semaines. L'association concomitante d'une molécule anticancéreuse à ce schéma de radiothérapie a également été largement étudiée.

B. Radio-chimiothérapie concomitante : molécules utilisées

1. Introduction

Plusieurs molécules ont été testées de façon concomitante à l'irradiation cérébrale. Leur sélection s'est effectué en fonction de leur action cytotoxique reconnue dans les gliomes de haut grade (nitroso-urées, dérivés du platine, témozolomide) et en fonction de leurs propriétés radiosensibilisantes (dérivés du platine, épipodophyllotoxine, témozolomide). Le tableau IV regroupe les principaux essais thérapeutiques mettant en œuvre ces associations.

Tableau IV : Résultats des études de traitement des gliomes de haut grade de l'adulte par radiothérapie et chimiothérapie (46, 55).

Etudes	Histologie	Traitement	Médiane de survie (mois)
Kiu, et coll. 1995	GBM et AA	RT + BCNU et cisplatine cct	16,0
Levin, et coll. 1995	GBM	RT + carboplatine cct suivie de 6 cycles PCV	13,7
Stewart, et coll. 1997	GBM et AA	RT + cisplatine et mitomycine C cct	Essai fermé pour toxicité
Prados, et coll. 1998	GBM et AA	RT + hydroxyurée cct	GBM : 14,0 et AA : 74,0
Brandes, et coll. 1998	GBM primo-traitement	RT + carboplatine et téniposide cct suivi 3 cycles BCNU	12,5
Lederman, et coll. 1998	GBM récidive	Radio-chirurgie + taxol	15,0
Anders, et coll. 1998	GBM et AA	RT + ACNU et Ara-C cct	13,0
Fazeny-Dörner, et coll. 2003	GBM	RT + dacarbazine et fotémustine cct	14,5
Beauchesne, et coll. 2003	GBM et AA	RT + étoposide cct	12,5
Ozkan, et coll. 2004	GBM et AA	RT + fotémustine cct	11,0
Lanzetta, et coll 2003.	GBM primo-traitement	RT + TMZ concomitant + 6 cycles TMZ	15,7
Stupp, et coll. 2002	GBM primo-traitement	RT + TMZ concomitant + 6 cycles TMZ	16,0
Stupp, et coll. 2005	GBM primo-traitement	RT seule vs RT + TMZ concomitant + 6 cycles TMZ	12,1 vs 14,6
Butowski, et coll. 2005	GBM primo-traitement	RT + TMZ + cRa concomitant	14,2
Athanassiou, et coll. 2005	GBM primo-traitement	RT seule vs RT + TMZ concomitant + 6 cycles TMZ	7,7 vs 13,4
Brown, et coll. 2008	GBM primo-traitement	RT + TMZ + erlotinib + 6 cycles TMZ	15,0
Grossman, et coll. 2008	GBM primo-traitement	RT + TMZ + talampanel + 6 cycles TMZ	17,9
Combs, et coll. 2008	GBM primo-traitement	RT + TMZ + cetuximab + 6 cycles TMZ	Survie globale 87% à 12 mois
Ryken, et coll. 2008	GBM et AA primo-traitement	RT + TMZ+ Gliadel® +6 cycles TMZ	Survie globale 72% à 12 mois

GBM : glioblastome ; AA : astrocytome anaplasique ; BCNU : carmustine ; cct : concomitant ; PCV : procarbazine ; ACNU : 1-(4-amino-2-méthyl-5-pyrimidinyl)-méthyl-(2-chloroéthyl)-3-nitrosourea ; Ara-C : aracytine-C ; cRa : acide *cis* rétinolique ; talampanel : inhibiteur du récepteur de l'AMPA (*α*-amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate) ; TMZ : témozolomide.

2. Nitroso-urées

Les nitroso-urées font partie des drogues les plus étudiées dans la prise en charge des gliomes de haut grade, notamment en administration concomitante avec la radiothérapie. Si leur tolérance thérapeutique est bonne, le bénéfice apporté reste discutable. Une étude de phase III a évalué l'irradiation cérébrale à la délivrance *in situ* de BCNU (polymères de BCNU implantés chirurgicalement), *versus* polymères de placebo. Les résultats sont intéressants mais d'interprétation difficile. Toutes histologies confondues, la médiane de survie est statistiquement augmentée pour le groupe recevant du BCNU. En revanche, aucun bénéfice n'est obtenu pour les patients atteints de glioblastome (55, 56).

3. Dérivés du platine

L'intérêt pour les dérivés du platine comme radiosensibilisant découle d'études précliniques où un effet additif avec les radiations ionisantes a été démontré. Le mécanisme d'interaction est probablement multifactoriel. Ainsi le carboplatine augmenterait le taux d'aberrations chromosomiques radio-induites, diminuerait les mécanismes de réparation des lésions de l'ADN et bloquerait les cellules dans une phase du cycle où elles sont radiosensibles (57). Ces résultats ont servi de base à plusieurs études cliniques (phases I et II) menées sur les gliomes de haut grade, aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant. Il s'agit en général d'études non randomisées, portant généralement sur de faibles effectifs, et donc difficile à analyser. La tolérance semble relativement acceptable concernant le carboplatine, cependant aucun bénéfice clair ne se dégage de ces travaux (55).

4. Epipodophyllotoxines

Les épipodophyllotoxines (étoposide, téniposide) sont peu utilisées dans la prise en charge des gliomes malins. Quelques études ont montré leur action cytotoxique sur les gliomes mais généralement en association dans le cadre d'une polychimiothérapie (action synergique avec les dérivés du platine) (58). Toutefois, des données expérimentales suggèrent que ces agents possèdent également une action radiosensibilisante responsable d'un effet supra-additif sur

des lignées cellulaires de gliomes (59). La faisabilité des associations concomitantes radiothérapie-épipodophyllotoxines a été démontrée au cours d'études pilote (55).

5. Topotécan

Le topotécan appartient à la classe des agents intercalants dérivés de la camptothécine. Ces molécules inhibent l'action de la topoisomérase I, enzyme impliquée dans la torsion et la détorsion de la double hélice d'ADN et provoquent ainsi des coupures simple brin qui sont converties en lésions double brin au moment de la réplication de l'ADN. Les propriétés radiosensibilisantes du topotécan ont été largement démontrées sur divers modèles de xénogreffes (rhabdomyosarcomes, gliomes de haut grade, carcinome pulmonaire à petites cellules) (60, 61). L'intérêt du topotécan en temps qu'agent radiosensibilisant a été évalué chez des enfants atteints de gliomes de haut grade mais les résultats de cette étude clinique se sont révélés décevants par rapport aux données précliniques (62). Des résultats cliniques similaires ont également été rapportés par d'autres investigateurs (63).

6. Cas particulier du témozolomide

Le témozolomide est à l'heure actuelle l'agent le plus étudié dans le cadre des associations radio-chimiothérapie concomitantes dans le traitement des gliomes malins. Il est indiqué en association concomitante avec la radiothérapie puis en monothérapie adjuvante chez des patients atteints de glioblastome nouvellement diagnostiqués (43). Le témozolomide est un agent alkylant qui génère un adduit alkyl sur les bases guanidiques et entraîne la mort cellulaire par l'intermédiaire du système de réparation des mésappariements (MMR : *Mutations in the DNA Mismatch Repair*). Dans un premier temps, l'alkylation induit une erreur d'appariement. En conséquence, lors des réplifications suivantes, le système MMR est activé de manière répétitive, ce qui déclenche l'apoptose. Cette dernière étape est encore mal connue : le système MMR serait à l'origine de cassures simple brin qui activeraient la voie de signalisation menant à l'apoptose (55). Toutefois, les patients ne peuvent bénéficier pleinement du bénéfice apporté par le témozolomide que s'ils sont porteurs d'une caractéristique épigénétique particulière, la méthylation du promoteur du gène de la MGMT (*O6-MethylGuanine-DNA MethylTransferase*), enzyme impliquée dans la réparation de

l'ADN. La méthylation du promoteur provoque l'inactivation de la MGMT et favorise l'efficacité cytotoxique des agents alkylants, dont le témozolomide. Ainsi, des études montrent que seuls les patients atteints de glioblastomes présentant une méthylation du promoteur du gène de la MGMT (environ 50% des cas) bénéficient du traitement associant témozolomide et radiothérapie (64, 65).

7. Autres molécules

D'autres molécules ont également été évaluées en association concomitante avec la radiothérapie dans la prise en charge des gliomes malins. C'est le cas de du paclitaxel, du 5-FU, du tamoxifène et de l'ifosfamide. Aucun bénéfice clair, en terme de survie n'a pu être mis en évidence (55).

En outre, un certain nombre d'essais cliniques associant de façon concomitante thérapies ciblées et radiothérapie sont en cours. Les bases rationnelles de ces associations reposent soit sur l'activation d'une voie impliquée dans la radiosensibilité tumorale, soit sur l'inhibition d'une voie participant à la radiorésistance (comme l'inhibition de l'EGFR et de la signalisation en aval) (66).

IV. Conclusions et perspectives

Les associations radio-chimiothérapie concomitantes sont depuis longtemps reconnues comme des stratégies thérapeutiques d'intérêt dans le traitement des tumeurs cérébrales de haut grade. L'administration concomitante de témozolomide avec l'irradiation cérébrale constitue une avancée importante dans la prise en charge des patients atteints de gliome de haut grade, plus parce qu'il s'agit de la première molécule obtenant une AMM en association concomitante avec la radiothérapie dans ce type de pathologie, que par une amélioration significative de la survie. En effet, les bénéfices en termes de survie restent modestes et environ la moitié des patients présentent une résistance au témozolomide, ce qui limite l'efficacité du traitement. Le développement des connaissances biologiques concernant les gliomes malins, et notamment une meilleure compréhension des paramètres impliqués dans la réponse à la radiothérapie, devrait permettre de définir de nouvelles cibles thérapeutiques pouvant présenter un intérêt en termes de radiosensibilisation.

Chapitre 3 : Le système ubiquitine-protéasome

Chapitre 3 : Le système ubiquitine – protéasome

I. Les deux grandes voies de dégradation des protéines

A. Protéolyse spécifique et non spécifique

Les protéines, comme tous les composants macromoléculaires de la cellule, sont maintenues dans un état d'équilibre dynamique, résultat de la différence entre la synthèse et la dégradation protéolytique. Au cours de la protéolyse, les liaisons peptidiques entre les acides aminés sont hydrolysées et les acides aminés sont libérés. Ces réactions sont catalysées par un groupe hétérogène d'enzymes appelées protéases et conduisent à la libération d'énergie (67). Alors que la synthèse de protéines *de novo* est un processus relativement lent, la protéolyse est un phénomène rapide qui permet, en permanence, l'adaptation de la cellule aux modifications de l'environnement (68, 69). Schématiquement, la dégradation des protéines peut être non spécifique, en suivant la voie lysosomale, ou spécifique en empruntant la voie ubiquitine-protéasome.

B. Dégradation des protéines par la voie lysosomale

Les protéases localisées au niveau lysosomal assurent principalement la dégradation de protéines extracellulaires *via* les processus de pinocytose et de phagocytose, ainsi que *via* l'endocytose¹ des complexes ligand-récepteur. Par ailleurs, les lysosomes prennent également

¹ L'endocytose correspond à la capture de matériel particulaire (phagocytose) ou soluble (pinocytose) par une cellule, par invagination de la membrane plasmique et internalisation de ce matériel par une vésicule formée de membrane plasmique 70. *Stenesh J. Dictionary of biochemistry and molecular biology. New York: John Wiley & sons; 1989.*

en charge les phénomènes de protéolyse qui ont lieu lors de l'autophagie (macro et microautophagie) (Figure 3) (67, 71).

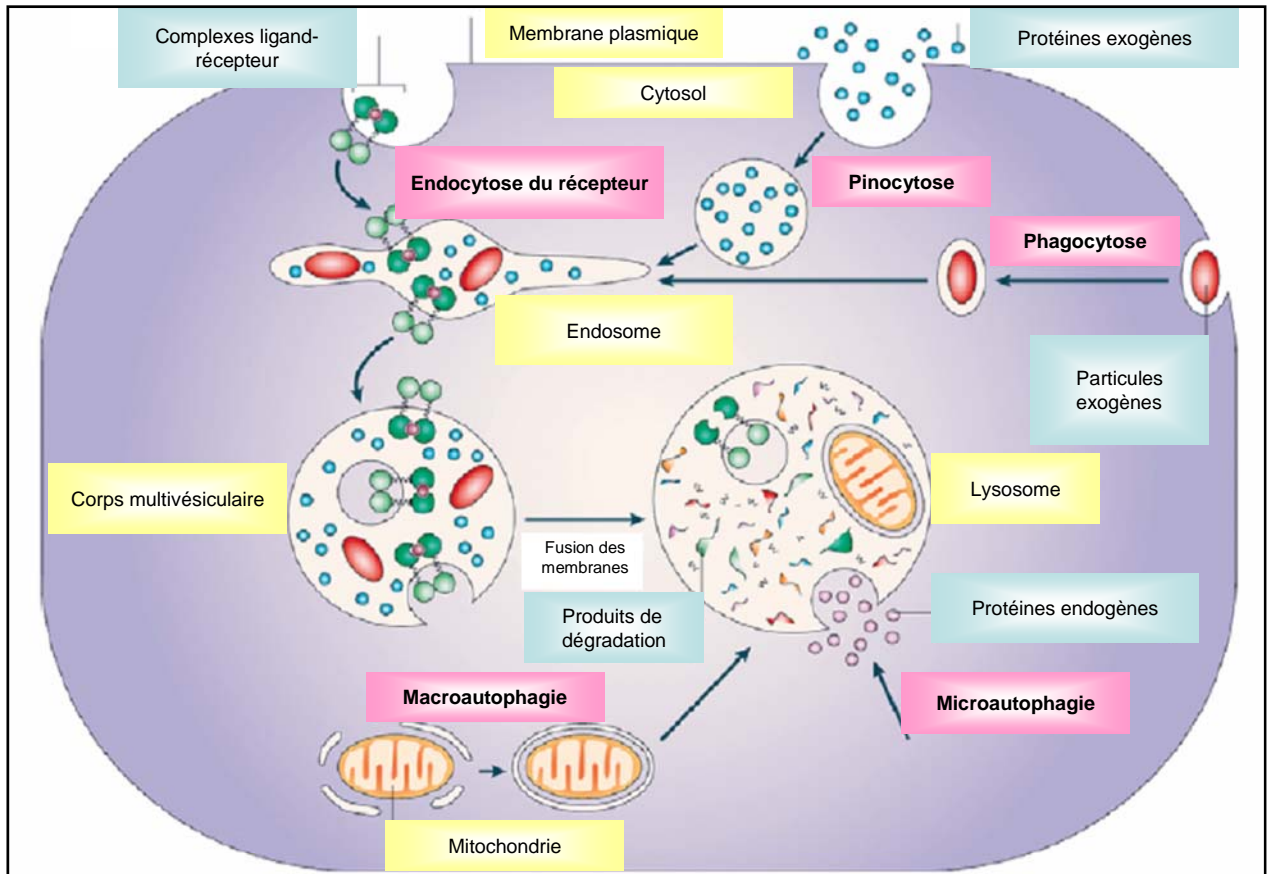


Figure 3 : Les 4 processus conduisant à une dégradation lysosomale. Adapté d'après Ciechanover (72).

La protéolyse médiée par les lysosomes n'est pas spécifique et toutes les protéines empruntant cette voie sont dégradées à la même vitesse par un mécanisme simple. Par exemple, les protéines extracellulaires, les facteurs de croissance, sont reconnues par leurs récepteurs propres puis l'ensemble ligand-récepteur est internalisé *via* la formation d'une vésicule d'endocytose. Les vésicules d'endocytose fusionnent entre elles (formation des corps multivésiculaires), puis avec les lysosomes où les protéines sont dégradées (67).

C. Dégradation des protéines par le système ubiquitine-protéasome

L'élimination de la très grande majorité des protéines intracellulaires (environ 80%) est réalisée par le système ubiquitine-protéasome. Il s'agit d'un processus hautement spécifique et étroitement régulé dont la découverte remonte au début des années 1980. La protéolyse réalisée par le système ubiquitine-protéasome assure la dégradation de protéines à durée de vie très variables, allant de quelques minutes (p53) à plusieurs jours (actine, myosine), voire plusieurs années (crystalline) (67, 73, 74). Ce mécanisme, indispensable à la survie cellulaire, est dépendant de l'ATP et se déroule en deux étapes : dans un premier temps, les protéines substrats sont "marquées" pour la dégradation par l'addition covalente de chaînes d'ubiquitine par une cascade enzymatique spécialisée. Dans un second temps, ces protéines porteuses de chaînes d'ubiquitine sont reconnues par le protéasome 26S et hydrolysées (75) (Figure 4).

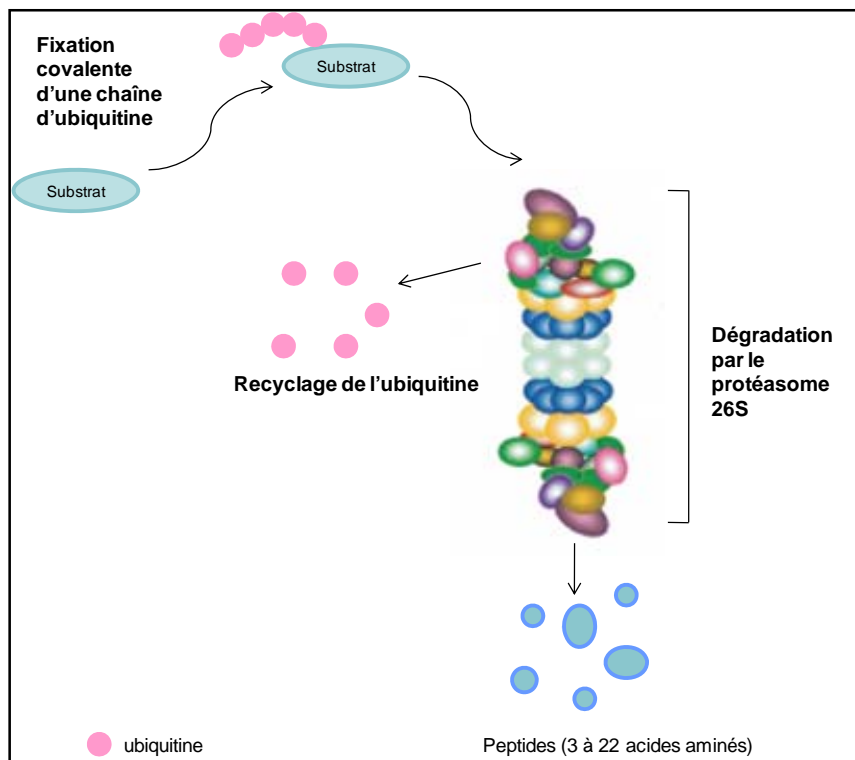


Figure 4 : Mécanisme simplifié de la dégradation des substrats protéiques par le système ubiquitine-protéasome. Adapté d'après Wang, et coll. (76)

On estime qu'une cellule contient en moyenne 1 million de protéasomes et elle puisse produire, via la dégradation protéolytique, jusqu'à 10^6 peptides par seconde (77, 78). Les fonctions du système ubiquitine-protéasome se répartissent en deux catégories :

- la régulation de la majorité des processus biologiques intracellulaires (division, différenciation, mort...) en assurant la dégradation séquentielle et organisée de protéines clés, comme les facteurs de transcription et les cyclines ;

- l'élimination des protéines anormales ou surnuméraires : le protéasome joue dans ce cas le rôle de " poubelle " de la cellule, en dégradant les protéines défectueuses, porteuses de mutations ou mal structurées (67, 79).

II. Structure du protéasome

A. Structure générale du protéasome 26S (Figure 5)

Le protéasome 26S est un complexe d'environ 2,5 MDa localisé aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme. Dans les cellules de Mammifères, les protéasomes sont principalement concentrés au niveau des centrosomes. En outre, un signal de localisation nucléaire permet aux protéasomes de pénétrer dans le noyau des cellules (en particulier après l'induction d'un stress) où ils s'accumulent de façon focale (80). Schématiquement, le protéasome est une particule en forme de cylindre creux et est composé de deux sous-complexes majeurs, le protéasome 20S et deux sous-unités 19S, qui s'assemblent en présence d'ATP.

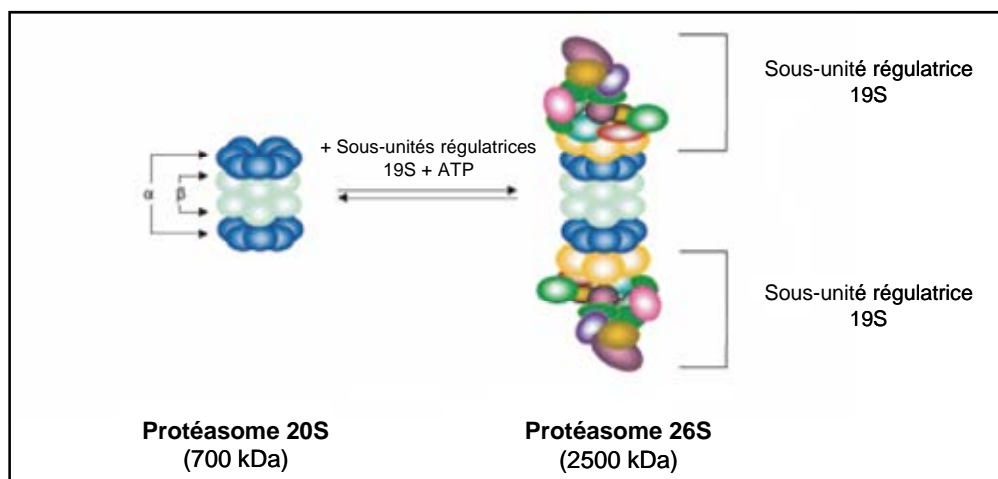


Figure 5 : Structure du protéasome 26S. Adapté d'après Wang, et coll. (76)

B. Le protéasome 20S (Figure 6)

Le protéasome 20S représente environ 1% de la totalité des protéines cellulaires (73). Il est constitué par l'empilement de 4 anneaux, identiques deux à deux :

- les deux anneaux centraux sont identiques et sont formés chacun par sept sous-unités différentes de type β . Ils définissent une cavité interne qui renferme les sites actifs protéolytiques ;
- les deux anneaux extérieurs sont composés eux aussi de sept sous-unités différentes, dites de type α . (67, 81, 82).

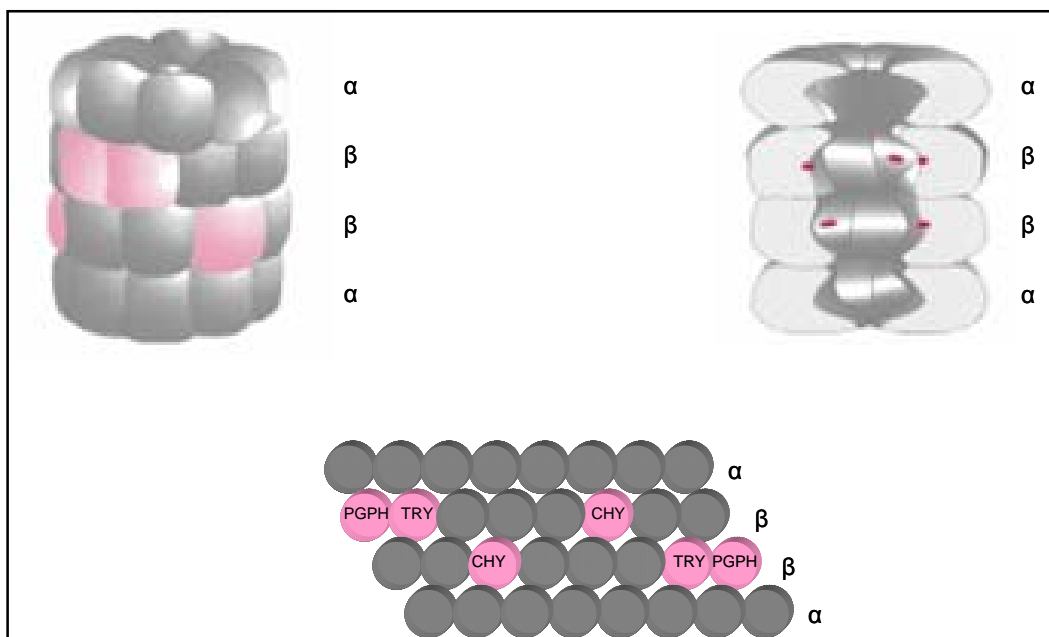


Figure 6 : Structure du protéasome 20S. Disposition des sous-unités protéolytiques (en rose) au sein de la structure du protéasome 20S. *Adapté d'après Rechsteiner, et coll. (83).*

1. Les sous-unités α

Les extrémités NH_2 -terminales des sous-unités α obstruent, à l'état basal, les orifices d'entrée dans la chambre catalytique et protègent les protéines cellulaires d'une destruction incontrôlée par le protéasome. Ils permettent l'association du protéasome 20S avec des complexes

régulateurs (sous-unités 19S), et contrôlent l'entrée des substrats dans la chambre de catalyse (67, 84).

2. Les sous-unités β

Chez les Eucaryotes, trois des sept sous-unités β ($\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$) possèdent des sites actifs protéolytiques, ce qui conduit à un total des six sites protéolytiques par protéasome (67). Le protéasome possède trois types d'activités enzymatiques différentes, désignées par leur homologie de clivage avec des enzymes bien caractérisées. On distingue ainsi une activité "caspase-like" (ou *post-glutamyl peptide hydrolyzing*) portée par la sous-unité $\beta 1$, une activité "chymotrypsine-like" située au niveau de la sous-unité $\beta 2$ et une activité "trypsine-like" localisée sur la sous-unité $\beta 5$. Toutes les sous-unités catalytiques possèdent un résidu thréonine N-terminal qui joue le rôle (de façon atypique pour des protéases) d'accepteur nucléophile pour la réaction d'hydrolyse peptidique (84, 85). Les activités enzymatiques du protéasome assurent le clivage des ponts peptidiques après les acides aminés acides (acide aspartique, acide glutamique) pour l'activité caspase-like, basiques (arginine, lysine, histidine,...) pour l'activité chymotrypsine-like, et hydrophobes (leucine, phénylalanine, tyrosine, tryptophane,...) pour l'activité trypsine-like. Chez la Levure, il a été montré que l'activité chymotrypsine-like est quantitativement et qualitativement la plus importante et que le blocage des sites caspase-like et trypsine-like n'a que des effets mineurs sur les capacités de dégradation du protéasome. En outre, c'est l'utilisation des inhibiteurs spécifiques de l'activité chymotrypsine-like qui a permis de découvrir les multiples rôles biologiques du protéasome (69, 85-88). Néanmoins, le fait que les activités trypsine-like et caspase-like aient été conservées au cours de l'évolution et soient toujours présentes chez les eucaryotes supérieurs suggèrent que ces deux activités possèdent un rôle non négligeable. Actuellement, l'activité chymotrypsine-like du protéasome semble avoir perdu son rôle prépondérant et des études sont en cours afin de déterminer la part des trois activités du protéasome dans la dégradation protéolytique (89).

Si la structure et l'organisation tri-dimensionnelle des trois types de sites actifs sont désormais bien connues et permettent de déduire *in vitro* les préférences de clivage de chacun de ces sites, la réalité biologique *in vivo* apparaît nettement plus complexe. En effet, ces préférences

de clivage ne sont pas absolues : la coupure d'un pont peptidique à l'intérieur d'un substrat semble dépendre autant de la qualité des résidus immédiatement voisins du site de clivage que de leurs interactions avec des résidus plus lointains du site actif (jusqu'à 8 acides aminés de part et d'autre). Il existe également des effets allostériques entre les 6 sous-unités actives du protéasome ; les trois sites actifs ne fonctionnent pas indépendamment les uns des autres, et il semble que presque chaque acide aminé peut servir de site de clivage pour chacune des 3 activités enzymatiques. Toutes ces caractéristiques procurent au protéasome une grande flexibilité vis-à-vis des substrats à cliver et assurent, quel que soit "l'encombrement" de la chambre protéolytique, la dégradation des protéines cibles (67, 90).

La concentration de plusieurs activités protéasiques dans un nanocompartiment permet la dégradation efficace et rapide des substrats et évite la production de fragments peptidiques trop longs qui pourraient conserver une activité biologique et interférer avec la physiologie cellulaire (81, 91).

C. Les sous-unités régulatrices 19S (Figure 7)

Bien que les protéasomes 20S purifiés soient capables d'hydrolyser des peptides de courte taille, ils ne peuvent pas dégrader des protéines poly-ubiquitinylées, pour lesquelles la présence des sous-unités régulatrices 19S est indispensable (67). En se liant aux deux extrémités du protéasome 20S pour former le protéasome 26S, les complexes 19S permettent l'activation de la partie catalytique (81).

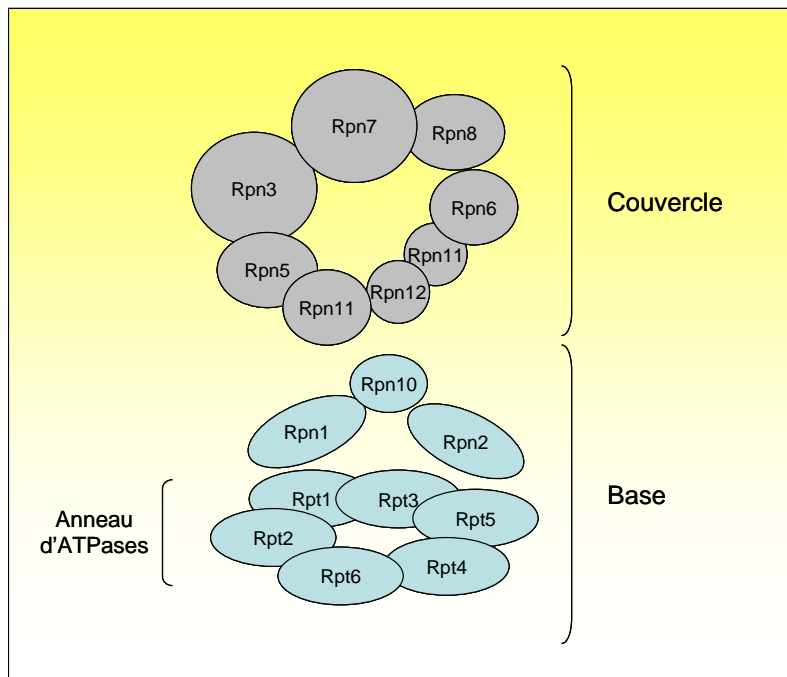


Figure 7 : Structure du complexe régulateur 19S. Rpt : *Regulatory particle triple-A protein*, Rpn : *Regulatory particle non-ATPase*. Adapté d'après Esser, et coll (92)

Les sous-unités régulatrices 19S (aussi appelées PA700) sont fixées à chaque extrémité du protéasome 20S. Chaque particule 19S peut être divisée en deux sous-structures, un "couvercle" et une base (67, 68). La base contient un anneau de six ATPases de la famille AAA, Rpt1 à Rpt6 (*ATPases Associated with a variety of cellular Activities*), et trois sous-unités non-ATPasiques, Rpn1, 2 et 10 (93). L'anneau d'ATPases contrôle l'entrée dans l'orifice du protéasome 20S et joue un rôle de protéine chaperone nécessaire à la dénaturation des substrats et à leur translocation dans la chambre protéolytique du protéasome (84, 85, 91). Le couvercle est constitué d'au moins huit sous-unités non ATPasiques (Rpn 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, et 12) responsables de la reconnaissance de la chaîne poly-ubiquitinylée et du recyclage de l'ubiquitine (81).

III. L'ubiquitinylation des protéines

A. Généralités

1. L'ubiquitine

L'ubiquitine (Ub) est une petite protéine de 76 acides aminés, décrite pour la première fois en 1975 (94). Elle se présente sous forme globulaire et est trouvée soit en tant que monomère libre dans le cytosol, soit liée de façon covalente (liaison amide) avec elle-même ou avec d'autres protéines (68). L'ubiquitine a d'abord été mise en évidence pour sa participation à la protéolyse réalisée par le protéasome.

L'ubiquitine possède une structure relativement complexe qui permet des interactions protéines-protéines (95). Pour certains, l'ubiquitinylation constituerait une modification post-traductionnelle des protéines aussi importante que la phosphorylation (96). Ainsi, outre son rôle dans la dégradation protéasomique, l'ubiquitine participe à la transduction du signal qui régule le cycle cellulaire, l'endocytose, la transcription, la réparation de l'ADN, l'apoptose et la réponse immune (95, 97).

2. Les différents types d'ubiquitinylation des protéines

L'ubiquitine est conjuguée aux protéines sur lesquelles elle se fixe *via* une liaison peptidique entre l'extrémité carboxy-terminale d'un de ses résidus glycine (G76) et l'extrémité amino-terminale des lysines acceptrices portées par les protéines cibles (68).

L'ubiquitine possède elle-même 7 résidus lysines (K6, -11, -27, -29, -33, -48, -63) (Figure 8) qui chacune permettent son autopolymérisation et la formation de chaînes de différents types (Figure 9).

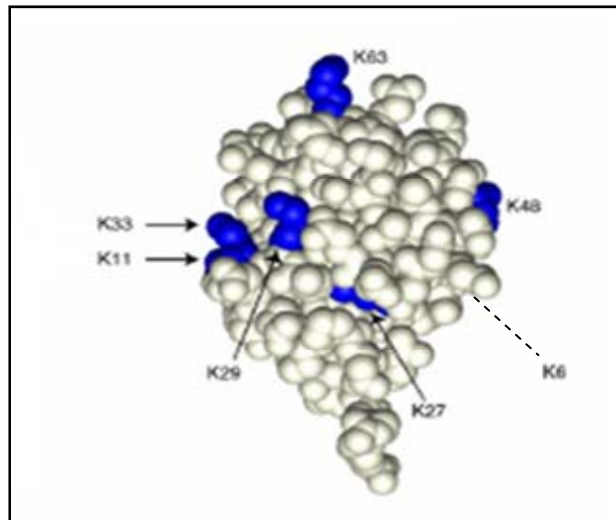


Figure 8 : Représentation tri-dimensionnelle de l'ubiquitine. Les résidus lysines responsables des interactions sont colorés en bleu. *Adapté d'après Staub, et coll. (97).*

L'ubiquitinylation des protéines peut être de différents types (Figure 9). Ainsi, est observée la fixation covalente d'un seul résidu ubiquitine (monoubiquitinylation et monoubiquitinylation multiple) ou la conjugaison de chaînes de résidus ubiquitine (polyubiquitinylation) (98).

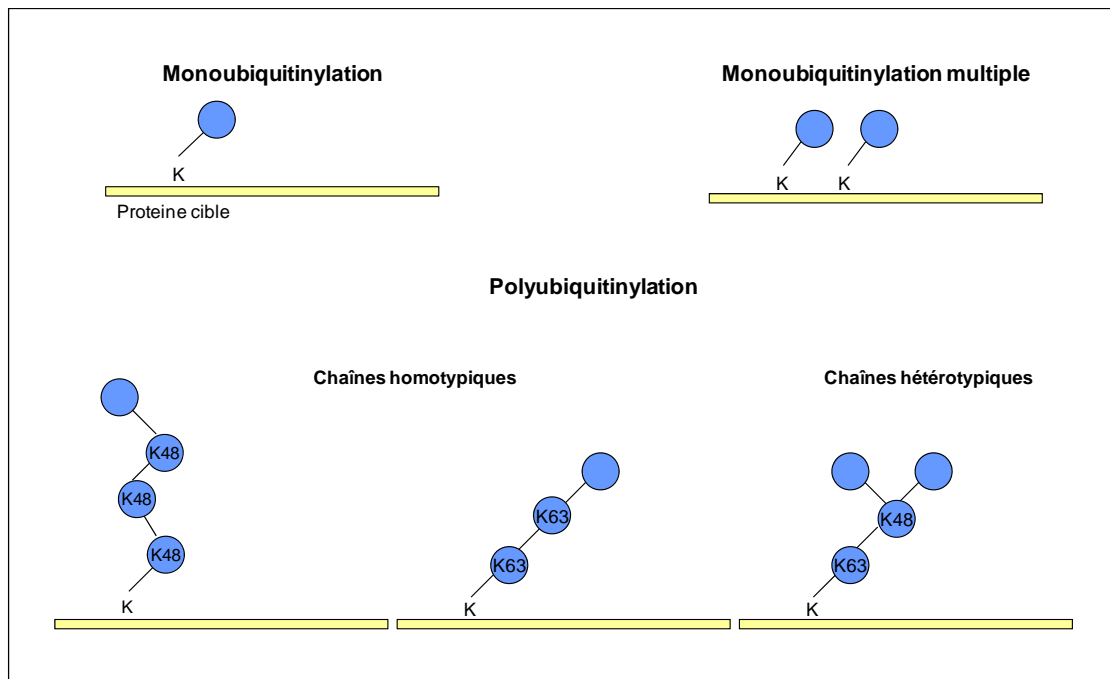


Figure 9 : Les différents types d'ubiquitinylation des protéines. Adapté d'après Dikic, et coll. (98)

Dans une chaîne polyubiquitine, chaque ubiquitine se lie à la précédente en établissant un pont peptidique entre son résidu glycine carboxy terminal (G76) et un résidu lysine (K48, K63...) de l'ubiquitine précédente. Les chaînes les plus représentées dans les cellules sont les chaînes homotypiques K48 (99).

3. Les multiples rôles de l'ubiquitinylation des protéines

La fixation d'une seule molécule d'ubiquitine (monoubiquitinylation) constitue un signal important dans la signalisation intracellulaire en participant aux processus d'endocytose (ex. internalisation des récepteurs à tyrosine-kinase) et aux phénomènes d'adressage des protéines entre les différents compartiments cellulaires (97, 100). La monoubiquitinylation est aussi impliquée dans la régulation de la compaction de la chromatine et dans la réparation de l'ADN (ubiquitinylation des différents acteurs de la réparation, par exemple PCNA [*Proliferating Cell Nuclear Antigen*]) (79, 101, 102).

Dans le cas d'une chaîne poly-ubiquitinylée, la disposition des résidus ubiquitine dans la chaîne n'est pas anodine et le signal ainsi constitué modifie fortement le devenir de la protéine porteuse de la chaîne.

Ainsi, les chaînes homotypiques K48 et K29 sont impliquées dans l'adressage des protéines pour la dégradation protéasomique. Une chaîne tétra-ubiquitine K48 est le signal minimal pour une reconnaissance efficace par le protéasome. Néanmoins, il semble que les chaînes plus longues confèrent un avantage significatif, le principal bénéfice étant certainement une augmentation du temps de résidence sur le protéasome, plutôt qu'une augmentation de l'affinité du substrat pour le protéasome.

Les chaînes K11 et K63 sont, quant à elles, impliquées dans d'autres processus comme la réparation des lésions de l'ADN, l'endocytose, ou la régulation d'activités enzymatiques (67, 91, 103).

B. Cascade enzymatique de fixation de la chaîne d'ubiquitine

L'ubiquitinylation des protéines, présentée sur la figure 10, requiert l'activité séquentielle de plusieurs types d'enzyme (81).

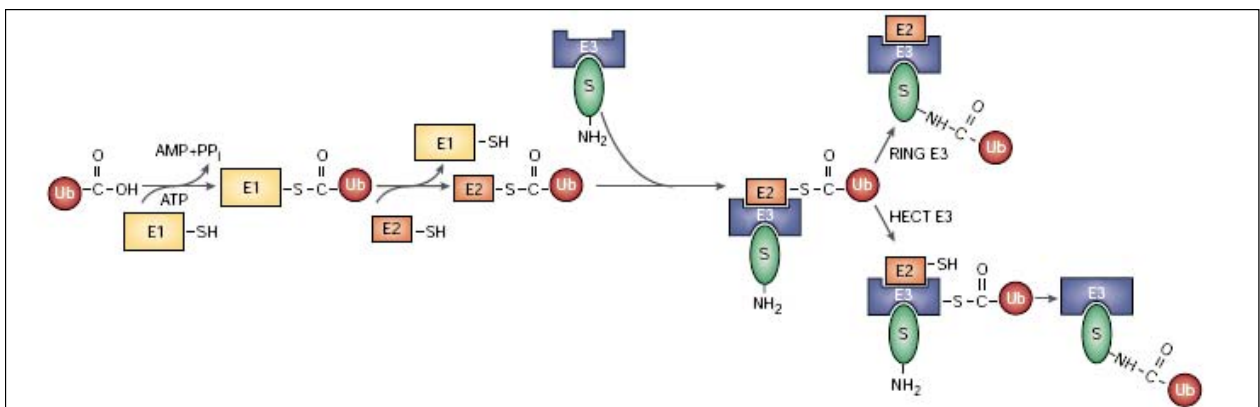


Figure 10 : Les différentes étapes de l'ubiquitinylation des protéines. Ub = ubiquitine ; S = protéine substrat. *Adapté d'après Weissman (101)*

1. Enzymes d'activation E1s

L'ubiquitine est tout d'abord activée avec formation d'une liaison thioester avec une enzyme d'activation (*ubiquitin-activating enzyme* ou E1) en présence d'ATP. Chez les Eucaryotes, la réaction d'activation se déroule en deux étapes : la formation initiale d'un intermédiaire ubiquitine-adénylate est suivie de la réaction de cet intermédiaire avec le résidu cystéine de l'E1 pour former un pont thioester. L'ubiquitine ainsi activée est ensuite transférée aux enzymes de type E2 (104). Une dizaine d'enzymes de type E1 ont été décrites chez l'Homme. Par ailleurs, la délétion du gène codant pour l'enzyme E1 chez la Levure est systématiquement létale, ce qui démontre le caractère essentiel de cette enzyme (68).

2. Enzymes de conjugaison E2s

Au cours d'une réaction de transthiolation, l'ubiquitine activée est transférée de l'enzyme E1 vers un résidu cystéine d'une enzyme de conjugaison E2 (*ubiquitin-conjugating enzyme*). Chez les Mammifères, plus d'une centaine de protéines ont été identifiées comme membre de la famille E2. Toutes ces enzymes possèdent un domaine conservé d'environ 150 acides aminés contenant le résidu cystéine nécessaire à leur activité (68, 97, 104).

3. Ubiquitine-ligases E3s

L'étape suivante dans la cascade d'ubiquitylation des protéines correspond au recrutement spécifique de la protéine à dégrader et au transfert de l'ubiquitine sur cette protéine substrat. Cette réaction est catalysée par les enzymes de la famille E3 ou ubiquitine-ligases. Plusieurs centaines de membres ont déjà été décrits chez les Mammifères (67, 99).

a. Les deux grands types de E3s

L'ubiquitine ligase est une protéine ou un complexe protéique capable de se lier à l'enzyme E2 et à la protéine à dégrader. L'interaction avec le substrat peut être directe ou se faire par l'intermédiaire des protéines adaptatrices. On distingue deux grandes familles d'enzymes E3 :

- **les E3s à domaine HECT** (*Homologous to the E6-AP Carboxy-Terminus*) : dans ce cas, l'enzyme E3 possède un rôle catalytique. L'ubiquitine activée est transférée de l'E2 sur un résidu cystéine de l'enzyme E3 avant d'être conjuguée à un groupement amino-terminal d'une lysine de la protéine cible. L'extrémité NH₂-terminale de ces enzymes E3 est très variable et est responsable de la reconnaissance spécifique du substrat (67, 68, 101).

- **les E3s à RING finger** (*Really Interesting New Gene*) : l'enzyme E3 sert de support assurant le rapprochement de l'enzyme E2 porteuse de l'ubiquitine activée et le substrat, ce qui permet un transfert direct et efficace de la molécule d'ubiquitine sur la protéine à dégrader. Le motif "*RING finger*" est indispensable pour la fixation à l'enzyme de type E2. Parmi les E3s à RING finger, trois types de complexes supramoléculaires (SCF, CBC, APC/C) sont bien connus et présentent des similitudes architecturales et fonctionnelles (Figure 11 et Tableau V) (81, 95).

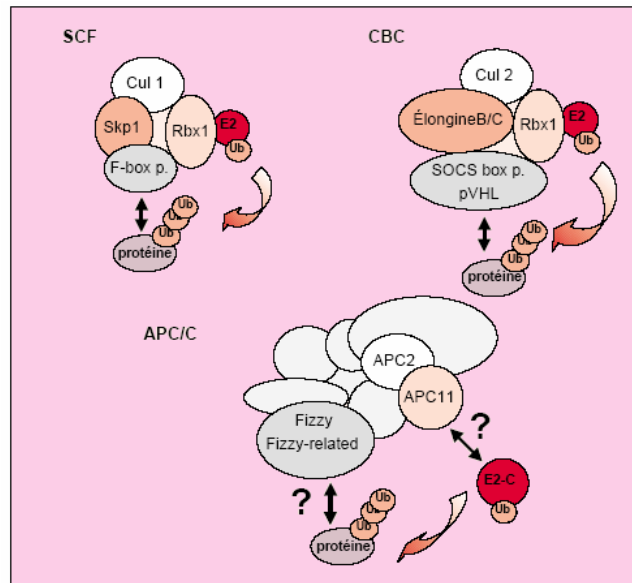


Figure 11 : Structure des complexes multimériques SCF, CBC et APC/C. Adapté d'après Coux, et coll. (81)

Tableau V : Classification et caractéristiques des enzymes E3 à RING finger

	Structure	Protéines cibles	Exemples	Références
Complexes SCF	Skp1 - culline 1 - F-box protein	Protéines phosphorylées	p27, cdc25, IκBα, β-caténine	(68, 81)
Complexes CBC	Culline 2 - élongine B - élongine C	Motif de reconnaissance non déterminé	HIF1α	(81)
Complexes APC/C	Anaphase Promoting Complex/Cyclosome	Protéines possédant un motif KEN box	Cyclines A et B	(81, 105, 106)

b. Mode de reconnaissance du substrat

L'ubiquitinylation nécessite la fixation de la protéine cible à l'ubiquitine ligase appropriée. Plusieurs modes de reconnaissance par les E3s ligases sont désormais bien caractérisés (Tableau VI). Parmi ceux-ci, la phosphorylation du substrat est le mécanisme le plus décrit (67, 107)

Tableau VI : Les différents modes de reconnaissance du substrat par les E3s ligases (67, 68, 108).

Mode de reconnaissance	Séquences identifiées	Exemples de substrats
Via le résidu NH₂-terminal	Résidu NH ₂ -terminal = motif de destabilisation	<i>nd</i>
Phosphorylation du substrat	PEST (Proline - acide glutamique, Sérine, Thréonine)	Cyclines D et E, p27, IκBα
Reconnaissance en <i>trans</i>	Intervention de protéines ancillaires	Destruction de p53 et du récepteur CD4 lymphocytaire induite par des virus (HPV et HIV)
Protéines anormales, mutées ou mal conformées	Domaines hydrophobes	Protéines mal conformées du reticulum endoplasmique
Via des séquences spécifiques	Boîte de destruction	Cyclines A et B

nd : non déterminé

4. Enzymes d'élongation E4s

Pour de nombreuses protéines, la chaîne de polyubiquitine est formée par une série de cycles identiques impliquant successivement les enzymes E1, E2 et E3, jusqu'à obtention d'un motif suffisant pour permettre la dégradation par le protéasome. En revanche, pour d'autres protéines à dégrader, la formation de la chaîne implique l'intervention d'une autre famille d'enzymes, appelées enzymes d'élongation ou E4 (104, 109).

C. Régulation du processus d'ubiquitylation

1. Régulation générale

Le système ubiquitine-protéasome peut être régulé soit au niveau de l'ubiquitylation, soit au niveau de l'activité du protéasome. Ce système intervenant dans une multitude de processus cellulaires, la régulation est généralement très spécifique. Néanmoins, une régulation plus générale a été rapportée. On note une augmentation de l'expression des différents composants de la voie ubiquitine-protéasome lors de la dégradation massive des protéines des muscles

squelettiques chez les Mammifères. Ceci survient notamment dans les cas de cachexie liée au cancer, de septicémie, ou d'acidose métabolique (108).

2. Régulation par des protéines dites "ubiquitine-like"

Les enzymes et les substrats de la voie d'ubiquitylation sont modifiés par des protéines dites "ubiquitine-like" (protéines structurellement et fonctionnellement proches de l'ubiquitine). Dans le cas des enzymes de type E1, E2 et E3, la fixation des protéines ubiquitine-like affecte leur activité ou leur stabilité. Par ailleurs, la fixation de ces protéines sur les substrats modifie leur capacité à être dégradée par la voie ubiquitine-protéasome (67).

Les multiples rôles des protéines "ubiquitine-like" sont actuellement en cours de découverte mais leur importance biologique est déjà parfaitement reconnue. Un des mécanismes régulateurs les plus décrits est l'attachement de molécules "ubiquitine-like" comme SUMO (*Small Ub-related MOdifier*), à la place de l'ubiquitine. Par exemple, alors que l'activation de NF- κ B est généralement associée à l'ubiquitylation et à la destruction de son inhibiteur naturel I κ B α , la sumoylation de I κ B α stabilise la protéine (non dégradation par non reconnaissance par les enzymes d'ubiquitylation) et évite l'activation de NF- κ B. De façon similaire, à l'état basal, la protéine p53 est rapidement ubiquitylée et dégradée par le protéasome *via* la E3 ligase MDM2. En revanche, en cas de stress génotoxique, p53 peut être SUMOylée et conduit à la relocalisation la protéine au niveau de ses sites d'activation de la transcription. Il est possible que l'antagonisme mutuel entre SUMO et ubiquitine résulte aussi en une molécule se partageant entre deux pools, stable et instable, entre différents compartiments cellulaires (79).

3. Recyclage de l'ubiquitine et enzymes de déubiquitinylation

a. Diversité des enzymes de déubiquitinylation (DUBs)

Les enzymes de déubiquitinylation appartiennent à 5 sous-familles, 4 sont des cystéines protéases et 1 est une métalloprotéase dépendante du zinc : on distingue les UBP (*UBiquitin-specific processing Protease group*), les UCH (*Ubiquitin Carboxy-terminal Hydroxylases*), les OTU-related proteases (*Ovarian Tumor*), l'ataxin-3, et les JAMM/MPN+ proteases (*JAB1/MPN/Mov34 metalloenzyme/Mrp1p Pad1p N-terminal domain*). Les deux premières catégories sont de loin les plus fréquentes et les plus étudiées (110). En général, les UCH sont impliquées dans l'élimination des courtes chaînes d'ubiquitine. Les UBP sont responsables de la dégradation des chaînes de polyubiquitine plus complexes (94). Les projets de séquençage du génome humain ont mis en évidence de nombreux candidats pouvant intervenir en tant que DUBs, ce qui en fait une des familles d'enzymes les plus importantes parmi toutes celles impliquées dans le système ubiquitine-protéasome (111). Chez l'Homme, plus de 500 candidats ont été proposés (112).

b. Fonctions biologiques des enzymes de déubiquitinylation

Les DUBs jouent un rôle très important dans l'homéostasie cellulaire. L'inactivation des principales enzymes de déubiquitinylation conduit, entre autres, à l'inhibition de la protéolyse par le système ubiquitine-protéasome. Ceci est certainement la conséquence de deux phénomènes : la déplétion du pool cellulaire d'ubiquitine libre et la saturation du protéasome par des chaînes polyubiquitinylées (67, 111).

Les enzymes de déubiquitinylation possèdent de multiples rôles biologiques parmi lesquels on distingue :

- La dégradation des précurseurs de l'ubiquitine (génération de monomères d'ubiquitine libres)

Les molécules d'ubiquitine ne sont généralement pas synthétisées dans les cellules sous forme de monomères libres mais plutôt en tant que multimères circulaires et en tant que protéines de fusion avec les ribosomes. Ainsi les DUBs sont essentielles pour la génération de monomères

d'ubiquitine libres à partir des précurseurs circulaires et des adduits aux protéines ribosomales (111).

- La correction des substrats ubiquitinylés de façon inappropriée

Les enzymes de déubiquitinylation exercent aussi de fonction de correction en éliminant les chaînes d'ubiquitine conjuguées à des substrats par erreur (108).

- La libération des substrats polyubiquitinylés pour permettre la dégradation par le protéasome 26S

Le complexe régulateur 19S du protéasome possède une activité de déubiquitinylation qui permet la libération des chaînes polyubiquitinylées à partir des substrats à dégrader ; la (les) sous-unités porteuse(s) de cette activité reste(nt) à identifier (67, 111).

- Le trafic des protéines membranaires

La monoubiquitinylation et la polyubiquitinylation en lysine 63 conduisent à l'internalisation des protéines de la membrane cellulaire par phénomène d'endocytose. Les enzymes de déubiquitinylation permettent le recyclage des molécules d'ubiquitine avant que les vésicules d'endocytose ne fusionnent avec les lysosomes (97, 100).

D. Exceptions à la voie classique d'ubiquitinylation

Pendant longtemps, la voie d'ubiquitinylation classique a consisté uniquement en une cascade de réactions enzymatiques catalysées successivement par les enzymes de type E1, E2 et E3, qui conduit à la formation d'une chaîne de plusieurs molécules d'ubiquitine liées par des ponts peptidiques entre la glycine en position 76 et un résidu lysine de la protéine substrat. Quelques exceptions ont été décrites.

Il existe des enzymes d'activation analogues de l'enzyme E1 qui assurent l'activation spécifique des protéines "ubiquitine-like". Dans d'autres cas, l'ubiquitine est activée par une enzyme hybride E1-E2. Il existe de la même façon des enzymes hybrides de type E2-E3 (67).

Pour certaines protéines, la fixation de la première molécule d'ubiquitine s'effectue non pas sur un résidu lysine interne au substrat mais au niveau de l'extrémité amino-terminale (71).

IV. Dégradation des protéines poly-ubiquitinylées par le protéasome

A. Adressage des protéines à dégrader au protéasome

De multiples mécanismes sont responsables de l'adressage des substrats au protéasome, même s'il n'existe pas d'accord général sur leur identité et leur nombre exact. Cette variété reflète probablement la diversité des situations à laquelle les cellules doivent faire face. On peut, par exemple, facilement comprendre que la dégradation d'une protéine qui doit être extraite du réticulum endoplasmique pour être détruite, n'obéisse pas aux mêmes contraintes que celle d'une protéine nucléaire. Il est probable qu'une fraction des protéines ubiquitinylées soit reconnue directement par le protéasome. Il est possible (bien que la démonstration formelle soit encore manquante) que la plupart des protéines ubiquitinylées soient adressées au protéasome grâce à des protéines navettes se liant d'un côté à des chaînes d'ubiquitine et, de l'autre, au complexe régulateur 19S. En effet, de nombreuses protéines peuvent se fixer au protéasome de façon plus ou moins transitoire. Il semble que le protéasome, loin de fonctionner en tant qu'entité propre, appartienne à des structures macromoléculaires dynamiques dont les composants varient en fonction des besoins cellulaires. Les multiples protéines capables de se fixer au protéasome permettent d'amener les protéines à dégrader à proximité du protéasome (99). Enfin, des travaux récents ont démontré que cet adressage des protéines à dégrader pouvait avoir des conséquences physiopathologiques importantes, notamment dans le cadre des maladies neurodégénératives, les protéines se distribuant entre deux compartiments en fonction de leur ubiquitinylation et de leur état d'agrégation (113).

1. Composants du système d'ubiquitinylation

De plus en plus d'arguments suggèrent que le protéasome fonctionne, au moins pour partie, associé de façon directe avec le système d'ubiquitinylation. La manière dont les protéines ubiquitinylées sont transférées au protéasome reste obscure mais il semble que la plupart des

protéines ubiquitylées soient adressées au protéasome grâce à des protéines "navettes" se liant d'un côté à des chaînes d'ubiquitine et, de l'autre au complexe régulateur 19S (99).

Ainsi, de nombreux auteurs rapportent que les enzymes de type E2 et E3 peuvent être associées, au moins temporairement, avec le protéasome. Ces interactions semblent le plus souvent transitoires et des protéines contenant des domaines ubiquitine-like jouent probablement le rôle de ponts moléculaires au cours de ces processus. Ce type d'association assure une efficacité optimale du système ubiquitylation - dégradation (91, 99, 114).

2. Chaperones et protéines de choc thermique

Outre la fonction "chaperone-like" de la base du complexe 19S, il est établi que le protéasome s'associe avec des protéines de choc thermique ou protéines chaperones (notamment Hsp70 et Hsp90 [*Heat shock protein*]) (109). Les cellules sont équipées de deux systèmes qui évitent l'accumulation de protéines anormales formées au cours de la synthèse ou lors de dommages post-synthétiques. L'un de ces systèmes est constitué par les protéines chaperones qui reconnaissent les conformations non-natives des protéines pour éviter des phénomènes d'agrégation irréversibles et aider ces protéines à acquérir leur conformation fonctionnelle. Le second système est le système ubiquitine/protéasome qui assure la destruction sélective des protéines non assemblées ou de conformation incorrecte et qui n'ont pas pu être prises en charge efficacement par les chaperones. Ces deux systèmes agissent donc de façon coordonnée pour éviter l'agrégation et l'accumulation de ces protéines, maintenant ainsi l'homéostasie au sein de la cellule (115). Comme les chaperones ne peuvent renaturer toutes les protéines endommagées dans une cellule, leur capacité à faciliter la dégradation de ces protéines *via* une interaction directe avec le protéasome est fondamentale, notamment en évitant une consommation d'ATP inutile par d'infructueux essais de renaturation (116).

3. L'exemple de la protéine CHIP

Le cas de la protéine CHIP (*Carboxy terminus of Hsp70-Interacting Protein*) est le plus décrit pour illustrer l'intégration du protéasome dans des complexes macromoléculaires permettant l'élimination des protéines surnuméraires ou endommagées. La figure 12 représente schématiquement l'intégration du protéasome dans un complexe macromoléculaire, associant, entre autres, la protéine CHIP et la chaperone Hsp70.

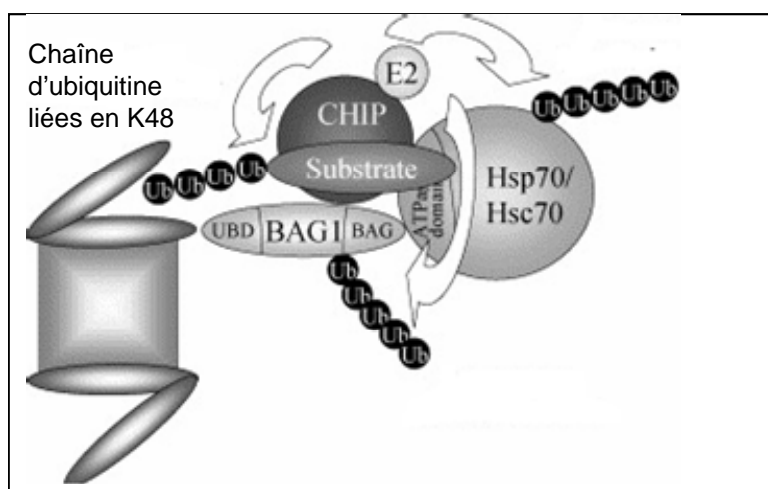


Figure 12 : Interaction de la protéine CHIP avec le protéasome et la protéine chaperone Hsp70. Adapté d'après Farras, et coll. (99)

La protéine CHIP est un co-chaperon qui interagit avec les protéines chaperones de la famille Hsp70. CHIP agit également en tant que E3 ligase pour les substrats des protéines de choc thermique. Elle peut également fixer des enzymes de type E2. Les chaperones sélectionnent les substrats pour l'ubiquitinylation médiée par CHIP. La protéine BAG-1 (*Bcl-2-associated AthanoGene*) intervient aussi dans ce complexe et assure le lien entre Hsp70 et le complexe 19S du protéasome. La E3 ligase CHIP assure aussi la conjugaison de chaînes d'ubiquitine sur les autres membres du complexe (notamment Bag-1 et Hsp70) mais les raisons de l'absence de dégradation de ces protéines par le protéasome ne sont pas élucidées (67, 92, 99, 107).

B. Mécanisme général de la dégradation des substrats polyubiquitylés

La dégradation des substrats poly-ubiquitylés par le protéasome se déroule en plusieurs étapes (Figure 13).

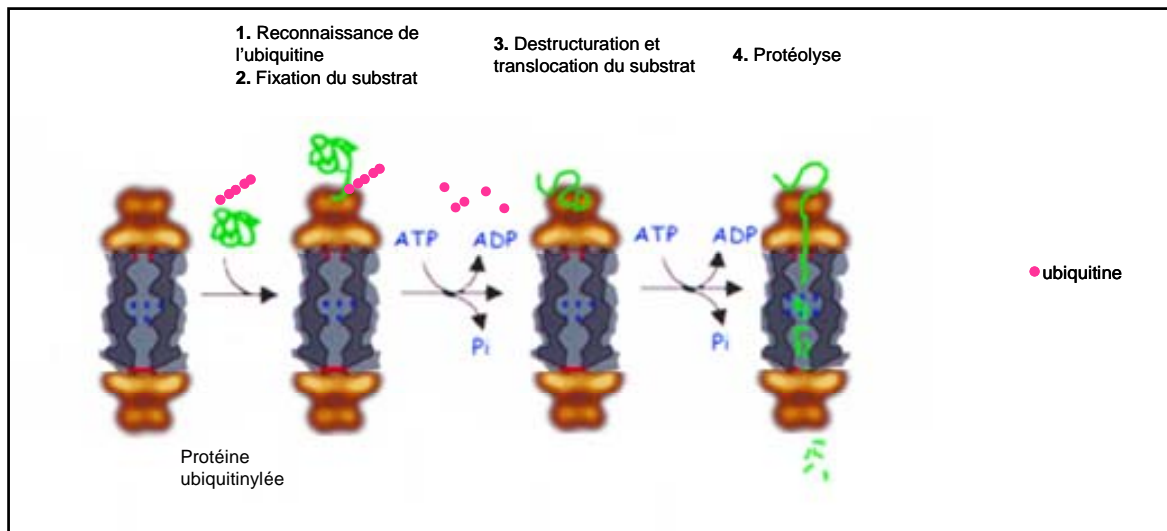


Figure 13 : Les différentes étapes de la dégradation des substrats polyubiquitylés. Adapté d'après Smith, et coll. (117)

1. Reconnaissance de l'ubiquitine

Une chaîne formée de quatre résidus ubiquitine est le signal de dégradation minimal (103). La reconnaissance de ce signal peut se faire directement par certaines sous-unités du complexe 19S (notamment Rpn1 et Rpn2) (67). En outre, il a été montré que la sous-unité ATPasique Rpt5 de cellules eucaryotes est également capable de reconnaître la chaîne poly-ubiquitine (118). Par ailleurs, un certain nombre de protéines peuvent s'associer transitoirement au protéasome ou aux sous-unités du complexe 19S et assurer ainsi une reconnaissance indirecte des chaînes d'ubiquitine (67, 99).

La fixation de la chaîne d'ubiquitine se fait généralement sur la sous-unité Rpn10 du complexe 19S, notamment *via* des interactions hydrophobes. Plusieurs autres sous-unités du complexe 19S, sont certainement nécessaires pour la fixation optimale de la chaîne

d'ubiquitine (67). Récemment, il a été démontré que la sous-unité Rpn13 participait à la reconnaissance des chaînes mono- et bi-ubiquitine (119, 120).

2. Fixation du substrat

Après la fixation de l'ubiquitine, la protéine substrat est fixée par le protéasome *via* de multiples interactions hydrophobes impliquant diverses sous-unités du complexe 19S. Ces multiples interactions permettent de positionner les substrats de façon adéquate afin qu'ils puissent ensuite être facilement injectés au niveau de la chambre catalytique du protéasome 20S (67).

3. Déubiquitylation

Après reconnaissance de la chaîne d'ubiquitine, celle-ci est dissociée du peptide à cliver, puis les molécules d'ubiquitine sont libérées dans le cytoplasme. Le complexe régulateur 19S possède une activité ubiquitine-hydrolase qui permet d'éliminer la chaîne d'ubiquitine. Il est probable que la chaîne poly-ubiquitine doive être éliminée avant que le substrat à dégrader ne soit injecté dans la chambre protéolytique. Il est également possible que l'activité ubiquitine-hydrolase du complexe 19S permette de libérer des substrats qui auraient subi une ubiquitylation "par erreur" (67).

4. Destruction et translocation

La dégradation des protéines par le protéasome est strictement ATP-dépendante. Les sous-unités ATPasiques situées au niveau de la base du complexe 19S utilisent l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP pour :

- déplacer les extrémités amino-terminales des sous-unités α pour ouvrir le protéasome 20S ;
- déstructurer les substrats à dégrader : il s'agit d'une étape indispensable car le pore d'entrée dans la chambre protéolytique est trop étroit pour permettre aux protéines d'y pénétrer à l'état natif

- injecter le substrat déstructuré dans la chambre protéolytique de la particule 20S.

On ne sait pas actuellement si ces différentes fonctions sont portées par des sous-unités ATPasiques distinctes ou si chacune d'entre elles est susceptible d'effectuer l'ensemble des réactions liées à l'hydrolyse de l'ATP (67).

5. Protéolyse

Dans la plupart des cas, les protéasomes clivent les protéines au niveau des liaisons peptiques et relarguent des peptides courts, de 3 à 22 acides aminés. La longueur médiane des produits de dégradation est de 7 à 9 résidus. Une protéine est totalement hydrolysée avant que le substrat suivant ne pénètre dans la chambre protéolytique. Les peptides générés par le protéasome ont une demi-vie courte et ne s'accumulent pas dans les cellules. Ils sont systématiquement hydrolysés dans les secondes qui suivent leur production par des protéases et des aminopeptidases cytosoliques (67, 89).

La protéolyse effectuée par le protéasome est un phénomène rapide : un grand nombre de protéines différentes peuvent être éliminées en quelques minutes (121). En outre, le mécanisme de dégradation sélective des protéines réalisé par le système ubiquitine-protéasome est irréversible, ce qui en fait un régulateur idéal pour contrôler des processus unidirectionnels, comme le cycle de division cellulaire (122, 123).

C. Exceptions à la voie classique de la dégradation par le protéasome

La protéolyse par le système ubiquitine-protéasome suit un schéma relativement simple et bien organisé. Néanmoins, il existe de multiples exceptions.

Ainsi, certains substrats ne nécessitent pas la fixation d'une chaîne d'ubiquitine pour être dégradés par le protéasome : c'est le cas, par exemple, de l'ornithine décarboxylase, de p21, de c-Jun, de la calmoduline, ou de la troponine-C. Des travaux récents ont en effet montré que certaines protéines faiblement structurées, comme p21 sont capables de désorganiser

l'obturation du protéasome 20S et de trouver, seules, leur chemin vers la chambre catalytique (93, 99, 124).

Par ailleurs, l'ubiquitylation ne conduit pas toujours à l'élimination totale du substrat : c'est le phénomène de RUPture (*Regulated Ubiquitin/proteasome-dependent Processing*). C'est le cas de la dégradation limitée de p105, protéine précurseur de la sous-unité p50 de NF- κ B. Le domaine C-terminal de p105 est complètement dégradé par le protéasome alors que la partie amino-terminale reste intacte. Il semble qu'en cas de protéolyse partielle d'une protéine, la dégradation intervienne au niveau des extrémités C- et N-terminales ainsi qu'à partir de domaines flexibles transloqués à l'intérieur du protéasome. Etant donné que le protéasome dégrade les protéines de façon progressive, des signaux au sein de la protéine en cours de destruction doivent exister pour permettre l'arrêt de la réaction (67, 108, 125, 126).

V. Implication du système ubiquitine-protéasome dans les processus cellulaires physiologiques

La place centrale qu'occupe le protéasome dans la protéolyse intracellulaire fait qu'il est impliqué dans tous les processus cellulaires fondamentaux, comme le cycle cellulaire, l'adaptation métabolique aux conditions environnementales, la réponse aux stimuli extracellulaires, la biogénèse des organelles, la réparation de l'ADN et la régulation de la transcription. Toutes ces fonctions font du protéasome un élément indispensable au maintien de l'homéostasie cellulaire (67, 79, 82, 84, 115, 127).

A. Dégradation associée au réticulum endoplasmique

Chez les Mammifères, lors de la synthèse protéique, les ribosomes se fixent sur les translocons, et les protéines nouvellement synthétisées sont transférées directement dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE). Les translocons (par exemple Sec61) sont des canaux de la membrane du RE qui permettent le passage à double sens des protéines (128, 129). Dans des conditions physiologiques, jusqu'à 30% des polypeptides nouvellement synthétisés n'atteignent jamais leur état natif. La mauvaise conformation des protéines peut être stimulée par la mauvaise incorporation d'acides aminés, conséquence de mutation ou d'erreurs pendant la transcription et la traduction, ainsi que par des stress thermiques, osmotiques et oxydatifs. Il n'existe pas de fonction de correction de la mauvaise conformation avant le passage dans le RE (92). A ce stade, deux types de réponses peuvent se mettre en place :

- dans un premier temps, la présence de protéines dénaturées induit une réponse dite *Unfolded Protein Response* (UPR). En conséquence, l'expression transcriptionnelle des chaperones est stimulée, ce qui se traduit par une concentration plus élevée de chaperones dans la lumière du RE et ce qui aide à corriger les défauts de conformation (129). L'UPR conduit également à une diminution de l'import des protéines dans le RE en induisant un ralentissement de la synthèse protéique (130).

- si les chaperones ne parviennent pas à renaturer toutes les protéines anormales, une voie de dégradation impliquant le protéasome se met alors en place. Il s'agit de la voie ERAD (*Endoplasmic Reticulum-Associated protein Degradation*). L'ERAD est une voie catabolique responsable de la destruction rapide des polypeptides défectueux ou de configuration anormale ainsi que des protéines physiologiquement instables présentes dans le lumen ou associées aux membranes du RE. Au cours de ce processus, les protéines anormales sont extraites du RE via les translocons et sont dégradées dans le cytoplasme par le protéasome (91, 131). La polyubiquitinylation des substrats a lieu au niveau de la face cytosolique du RE, sur laquelle les enzymes de type E2 et E3 sont fixées. La protéine CHIP assure la fonction E3 ligase pour une majorité des polypeptides du RE (129).

La figure 14 représente le mécanisme schématique du processus ERAD.

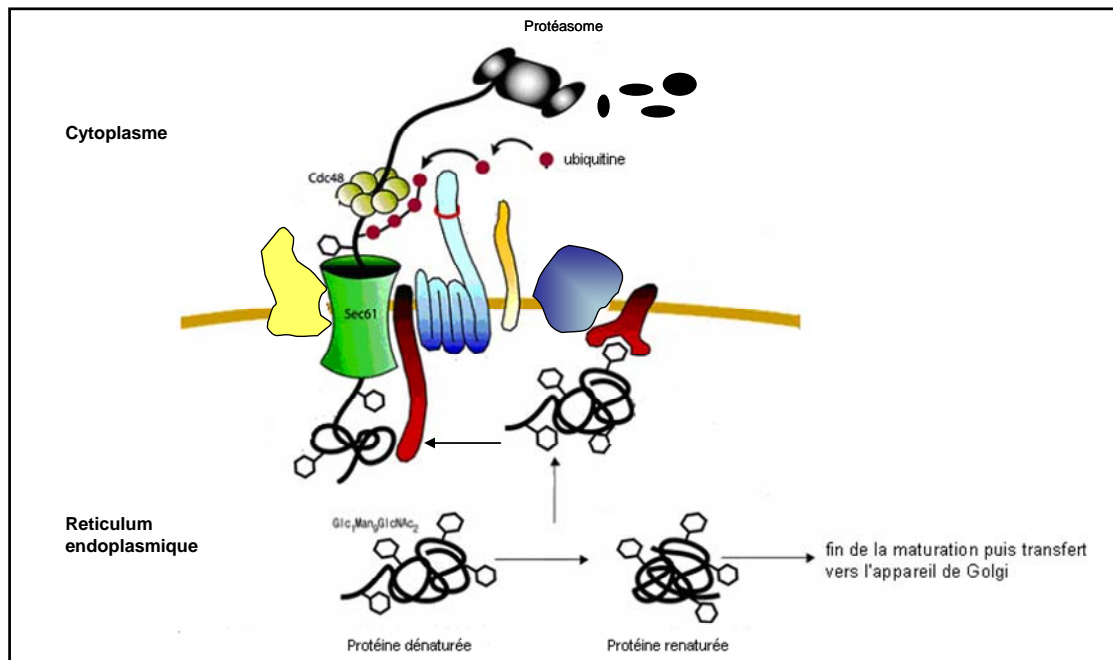


Figure 14 : Mécanisme de transfert rétrograde des protéines dénaturées du reticulum endoplasmique ou ERAD. Adapté d'après Kostova, et coll. (132)

L'UPR et l'ERAD constituent des réponses adaptatives aux stress subis par le RE. L'UPR permet l'exposition prolongée des substrats à la machinerie de renaturation, et il évite le relargage de protéines potentiellement dangereuses pour les cellules (128, 129). En effet, les polypeptides dénaturés exposent à leur surface des zones hydrophobes, qui sont responsables de la formation d'agrégats. La machinerie de contrôle-qualité cellulaire supprime la formation des agrégats en assurant la fidélité de la transcription et de la traduction et en dégradant sélectivement les protéines à conformation non-native avant leur agrégation (133). Lorsque les capacités des chaperones et de la voie ERAD sont débordées, le RE se trouve dans une situation de stress prolongé, ce qui conduit à l'activation des voies de mort cellulaire par apoptose (115, 130).

B. Dégradation protéasomique et réponse immunitaire

Il existe des analogues très particuliers du protéasome appelé immunoprotéasomes, rencontrés uniquement chez les Eucaryotes les plus évolués qui présentent une réponse immune adaptative. Au niveau cellulaire, les immunoprotéasomes se localisent préférentiellement au niveau du réticulum endoplasmique (80). Ces entités possèdent une structure différente de celle du protéasome classique, tant au niveau du noyau 20S que des complexes régulateurs. En effet, les trois sous-unités catalytiques du protéasome 20S sont remplacées, dans le cas de l'immunoprotéasome par des sous-unités β particulières, β i1 (LMP2), β i2 (LPM7) et β i5 (MECL-1) qui possèdent elles aussi une activité protéolytique. Les complexes régulateurs 19S sont remplacés, quant à eux, par des complexes 11S (ou PA28), spécifiques des immunoprotéasomes. La fixation du complexe PA28 ouvre le pore de l'anneau α pour permettre l'accès aux substrats, mais cette structure a une prédilection pour les protéines partiellement dégradées, plutôt que pour les molécules intactes polyubiquitinylées (67, 79).

Les sous-unités catalytiques de l'immunoprotéasome ainsi que les complexes PA28 sont inductibles par diverses cytokines, en particulier par l'interféron- γ . Il est à noter que ces structures sont exprimées constitutivement dans la rate et le thymus, notamment au niveau des lymphocytes T (84, 134). En conditions non-inflammatoires, la plupart des types cellulaires n'expriment pas les sous-unités β i1, β i2 et β i5 et l'expression de PA28 reste faible (90).

Dans les globules blancs et dans tous les autres types cellulaires en conditions inflammatoires, les immunoprotéasomes sont exprimés sous l'effet de l'interféron- γ (infections virales et bactériennes, notamment). Les immunoprotéasomes clivent les protéines étrangères après les acides aminés hydrophobes, ce qui permet l'association des peptides clivés avec la machinerie du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (67, 84). Contrairement à ce qui se passe avec le protéasome 26S, la dégradation réalisée par l'immunoprotéasome ne nécessite pas la présence d'ATP (81). Les peptides étrangers associés au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I sont ensuite exposés à la surface des cellules infectées et sont reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques qui déclenchent la lyse de la cellule infectée (78, 135).

C'est dans ce cadre qu'à été mis en évidence une nouvelle propriété du protéasome : en effet, Hanada, et coll. (136) ont démontré que le protéasome était susceptible, dans certains cas, de réaliser un "épissage" des protéines à cliver afin de générer les antigènes de classe I appropriés (cet épissage consiste en un clivage de la protéine en 3 fragments puis en la ligation des deux fragments carboxy- et amino-terminaux, générant un peptide plus court et tronqué).

C. Dégradation protéasomique et cycle cellulaire

Le passage spécifique des cellules d'une phase du cycle cellulaire à l'autre est contrôlé par des régulateurs positifs (cyclines, CDKs [*Cyclin-Dependant Kinases*]) et par des régulateurs négatifs comme les inhibiteurs de CDK (CKIs). A chaque transition d'une phase à une autre sont associées des combinaisons spécifiques des différents régulateurs positifs et négatifs (Figure 15) (137). L'activité de chaque CDK est régulée spécifiquement par des cyclines et cette activité oscille au cours des différentes phases du cycle cellulaire (138, 139).

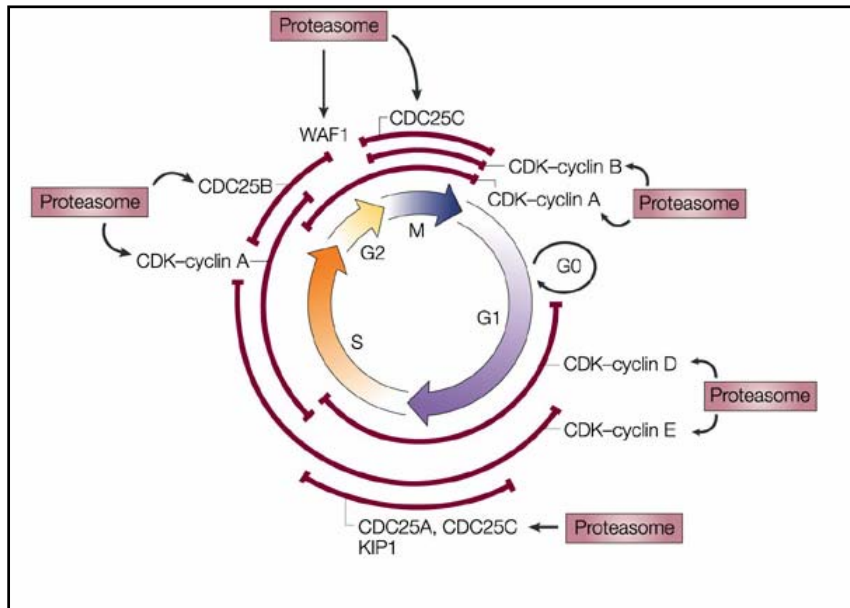


Figure 15 : Intervention du système ubiquitine-protéasome dans la progression dans le cycle cellulaire. Adapté d'après Adams (96)

Les cyclines agissent spécifiquement lors de certaines phases du cycle cellulaire : les cyclines D et E interviennent durant la phase G1, les cyclines E et A agissent au cours de la phase S et les cyclines A et B pendant la mitose. Le niveau d'expression des différentes cyclines varie de façon spécifique à chaque phase du cycle cellulaire *via* des processus étroitement régulés de synthèse et de protéolyse. Deux E3-ligases participent à la dégradation des cyclines par le système ubiquitine-protéasome : il s'agit du complexe APC/C et d'un complexe SCF qui présentent des activités spécifiques lors de chaque phase du cycle cellulaire afin d'assurer la dégradation des cyclines adéquates. Ainsi, le complexe APC/C est indispensable à la transition M/G1 en assurant en particulier l'ubiquitinylation des cyclines mitotiques A et B. Le complexe SCF est impliqué dans le passage de la phase G1 à la phase S en ubiquitinylant les cyclines de la phase G1 (D et E) (96, 138).

D. Implication du système ubiquitine-protéasome dans l'apoptose

Le système ubiquitine-protéasome joue un rôle dans les phénomènes d'apoptose principalement par l'intermédiaire des protéines qu'il dégrade. De nombreuses protéines aussi bien pro- et que anti-apoptotiques sont ainsi soumises à la dégradation réalisée par le système ubiquitine-protéasome (Tableau VII).

Tableau VII : Exemples de protéines régulatrices de l'apoptose dégradées par le système ubiquitine-protéasome *Adapté d'après Naujokat, et coll. (137).*

Protéine	Fonction	Conséquences de la dégradation, remarques
c-IAP1, XIAP	Inhibition de l'apoptose	Induction de l'apoptose, dégradation après auto-ubiquitinylation en réponse à des stimuli pro-apoptotiques
Bcl-2	Inhibition de l'apoptose	Induction de l'apoptose
Bax	Induction de l'apoptose	Inhibition de l'apoptose, augmentation de la dégradation dans les carcinomes de prostate
Bid	Induction de l'apoptose	Inhibition de l'apoptose
IκBα	Inhibition de NF-κB	Inhibition de l'apoptose <i>via</i> l'activation de NF-κB

IAP : Inhibitor of APoptosis

Lors de l'exposition à des stimuli apoptotiques, le protéasome peut jouer des rôles opposés dans la régulation de l'apoptose en fonction des protéines qu'il dégrade et des études ont montré l'implication du protéasome à la fois en tant qu'élément pro- et anti-apoptotique. La nature des signaux de survie et l'environnement cellulaire vont déterminer le rôle pro- ou anti-apoptotique joué par le protéasome (137).

VI. Système ubiquitine - protéasome et pathologies humaines

Faisant partie intégrante des cascades de signalisation intracellulaire, il n'est pas étonnant de constater que la dégradation protéasomique est altérée, directement ou indirectement, dans de nombreuses situations pathologiques. Les mécanismes mis en évidence n'impliquent pour le moment que l'ubiquitinylation des régulateurs cellulaires clés. Le domaine évoluant rapidement, il est vraisemblable que des anomalies d'adressage au protéasome seront aussi découvertes dans un futur proche. Les maladies étudiées incluent, entre autres, les neuro-dégénérescences, les maladies génétiques, les déficits immunitaires, les désordres hématopoïétiques et les cancers (99).

Les états pathologiques associés au système ubiquitine-protéasome peuvent être classés en deux groupes :

- ceux qui résultent d'une perte de fonction (mutations du substrat ou des enzymes du système d'ubiquitinylation), conduisant à la stabilisation de la protéine cible ;
- ceux qui résultent d'un gain de fonction, menant à une dégradation anormale ou accélérée de la protéine cible (67).

A. Cancer

1. Généralités

Parmi les substrats du protéasome potentiellement dérégulés lors du développement d'une tumeur, on distingue :

- des régulateurs positifs et négatifs du cycle cellulaire (cyclines A, B, C, D et E, inhibiteurs de CDK, comme p21 et p27)
- des régulateurs de la transformation oncogénique (c-fos, c-jun, c-myc)
- des suppresseurs de tumeurs (p53)
- des régulateurs pro- et anti-apoptotiques (Bax, Bcl-2)
- des régulateurs négatifs de la transcription (I κ B α)
- des molécules d'adhésion cellulaire (ICAM-1, VCAM-1²) (69, 140).

² ICAM-1 : *pro-Inflammatory Cell Adhesion Molecule 1* ;

Dans le plasma, les niveaux des différentes activités du protéasome sont nettement plus élevés dans les états cancéreux. Ces activités sont 1000 fois plus élevées chez les patients atteints de tumeurs solides que chez les sujets sains. Certaines enzymes E2 et E3 présentent également des taux d'expression plus élevés dans les cancers. Il est possible que les cellules cancéreuses maintiennent une quantité importante de machinerie protéolytique, qui, soit facilite la dégradation des protéines suppressives de tumeurs, soit active des proto-oncogènes (73). Il est à noter que certains des effecteurs du système d'ubiquitinylation sont soit des oncogènes (Mdm2), soit des suppresseurs de tumeurs (pVHL, *von-Hippel-Lindau disease tumor suppressor*) (99).

2. Non-dégradation de protéines oncogéniques

La non-dégradation des protéines oncogéniques peut découler de deux mécanismes principaux :

- il peut s'agir d'altérations structurales de la protéine, pouvant entraîner la perte ou l'inaccessibilité des motifs qui confèrent la sensibilité au système ubiquitine/protéasome. C'est le cas des protéines c-Myc mutées dans certains lymphomes de Burkitt, en raison de la translocation du gène *c-myc* dans l'un des locus codant pour les immunoglobulines.

- la non-dégradation peut également avoir lieu suite à la phosphorylation de la protéine cible, due à l'activation oncogénique de protéines de signalisation intracellulaire. Ainsi, l'un des effets de l'activation oncogénique de la protéine Ras, observée dans de nombreux cancers, est la stabilisation de la protéine c-Myc *via* une phosphorylation spécifique. Un autre exemple de phosphorylation inhibant la dégradation est celui de la β -caténine, dont la stabilisation a été observée à l'origine dans le syndrome de polypose adénomateuse familiale, maladie héréditaire autosomique caractérisée par une prédisposition au cancer du côlon (75).

3. Accélération de la dégradation de p27

A l'inverse de la situation précédente, la dégradation de certaines protéines onco-suppressives est accélérée dans de nombreuses tumeurs. Un exemple particulièrement intéressant est celui

VCAM-1 : *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*.

de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27 (75, 141). La figure 16 présente les mécanismes de dégradation de p27 dans les cellules normales et tumorales.

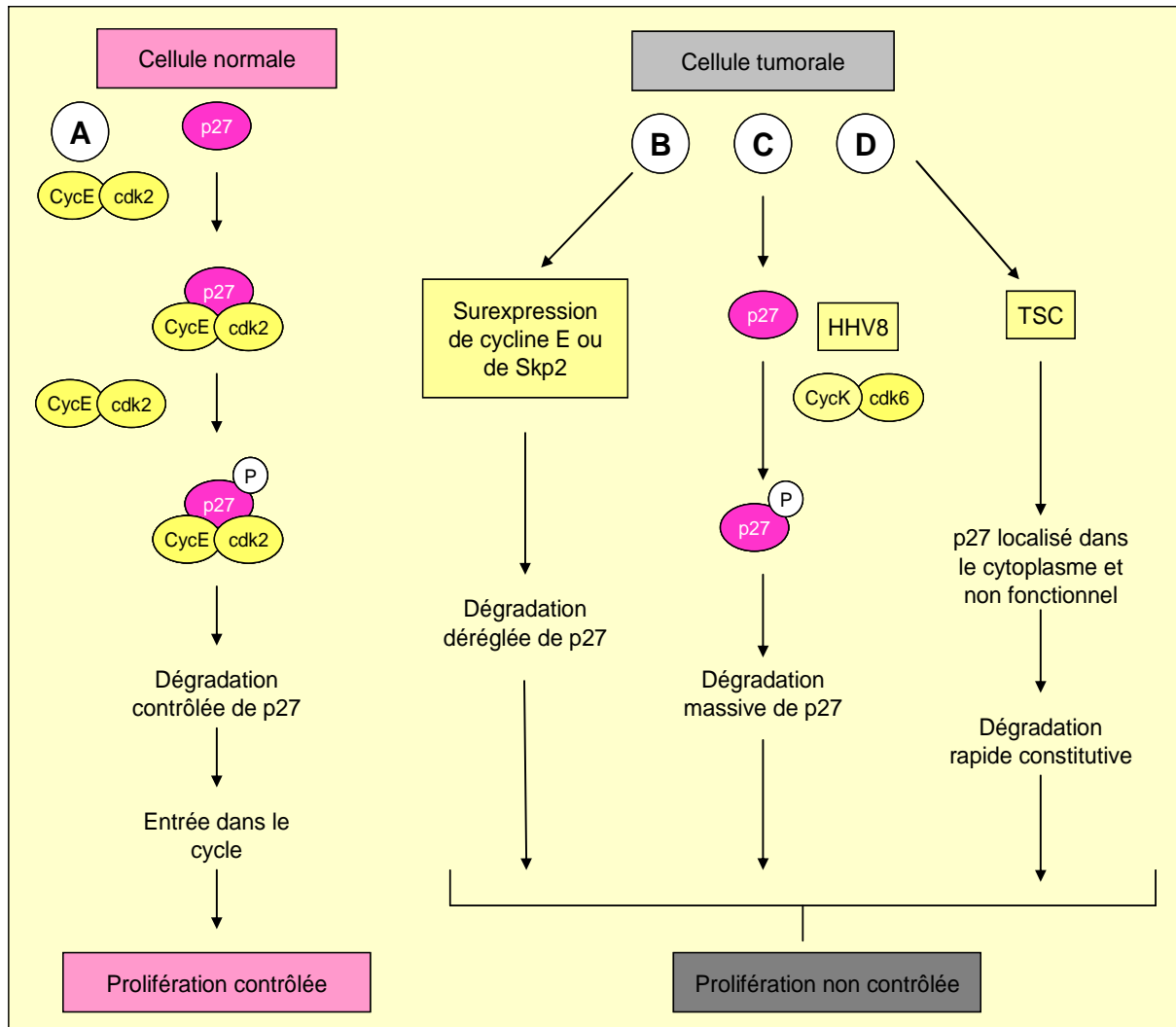


Figure 16 : Mécanismes de dégradation de p27 dans les cellules normales et tumorales. A. Dans les cellules normales, p27 est dégradé après phosphorylation par des complexes CycE/cdk2 actifs. Dans les cellules tumorales, la dégradation accélérée de p27 peut résulter de différents mécanismes. B. Surexpression de CycE ou Skp2. C. La cycline K codée par le virus HHV8 se substitue à la cycline E pour entraîner une dégradation massive de p27. D. Dans le cas du syndrome TSC, une localisation cytoplasmique aberrante est associée à une grande instabilité dont les mécanismes sont inconnus. *Adapté d'après Ferrara, et coll. (75)*

La protéine p27 est abondamment exprimée dans les cellules soumises à des signaux antiprolifératifs, et son expression diminue en fin de phase G1 en raison de sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome. L'ubiquitinylation de p27 est déclenchée de façon

complexe, puisqu'elle nécessite la formation préalable d'un complexe trimérique p27/CycE/cdk2 inactif, puis sa phosphorylation en *trans* par un complexe CycE/cdk2 actif. Cet événement ne peut se produire qu'en fin de phase G1 alors que la synthèse de CycE est maximale. La E3 ligase intervenant dans l'ubiquitinylation de p27 est un complexe SCF dont le composant Skp2 reconnaît et recrute p27. Le gène *P27* n'a encore jamais été trouvé sous une forme transcriptionnelle inactive ou mutée dans une tumeur humaine. Cependant, une expression très faible de p27, liée à la déstabilisation de la protéine, est observée dans de nombreux cancers humains. Ce faible taux d'expression est corrélé à l'agressivité de la tumeur et à un très mauvais pronostic (75, 121). Trois hypothèses expliquant cette dégradation anormale ont été évoquées :

- En premier lieu, la protéine Skp2, impliquée dans la dégradation de p27, est surexprimée dans de nombreux cancers humains, tels que les carcinomes de la sphère ORL, les carcinomes pulmonaires à petites cellules, les cancers du sein et de la prostate (75, 142).
- Par ailleurs une relocalisation intracellulaire anormale peut aussi participer à l'inactivation de p27, associée à une destruction accélérée. C'est le cas dans le syndrome de la sclérose tubéreuse (*Tuberous Sclerosis Complex* ou TSC), maladie autosomique dominante caractérisée par un retard mental, une épilepsie rebelle et le développement de tumeurs variées. La protéine p27 est alors anormalement localisée dans le cytoplasme et est rapidement dégradée, ce qui ne lui permet plus de jouer son rôle d'inhibiteur du cycle cellulaire.
- Enfin, la diminution de l'abondance de p27 peut également avoir une étiologie virale. Ainsi, l'apparition du sarcome de Kaposi chez les patients atteints de SIDA est liée à l'infection des cellules par le virus herpétique HHV8 (*Human Herpes Virus 8*), qui a développé une stratégie propre pour diminuer l'abondance de p27, en favorisant sa phosphorylation et donc son ubiquitinylation (75).

4. p53, MDM2, E6 et cancers

La protéine p53 est considérée comme "le gardien de l'intégrité du génôme". Les fonctions biologiques de p53 sont de prévenir d'une part la propagation des altérations de l'ADN génomique, et d'autre part la prolifération cellulaire induite par des signaux oncogéniques ou hyperprolifératifs aberrants (143).

En conditions physiologiques, le niveau d'expression de p53 est très faible dans les cellules et est régulé *via* son interaction avec l'E3 ligase Mdm2 (Hdm2 chez l'Homme) qui conduit à sa dégradation par le protéasome. En réponse à un stress cellulaire, la dégradation de p53 est stoppée et son niveau d'expression augmente rapidement (144).

La fonction onco-suppressive de p53 est altérée dans la majorité des cancers humains. Pour une fraction d'entre eux, cette perte de fonction est directement liée à une dégradation accélérée de la protéine selon deux processus différents :

- le gène *MDM2* peut être amplifié ce qui, conduisant à une surabondance de la protéine Mdm2, résulte en une dégradation accélérée de p53. L'amplification de *MDM2* a été observée dans les cancers du sein, les sarcomes des tissus mous, les carcinomes de l'œsophage, les carcinomes pulmonaires, les glioblastomes et les mélanomes malins. La fréquence globale de l'amplification de *MDM2* dans les tumeurs humaines est de 7%, avec notamment une amplification dans un tiers des sarcomes (73, 75, 142).

- la protéine p53 peut également être déstabilisée dans les cancers du col de l'utérus induits par les papillomavirus HPV16 et HPV18 (*Human Papilloma Virus*), cette déstabilisation étant essentiellement sous la dépendance de la protéine oncogénique virale E6. Celle-ci recrute une E3 cellulaire, E6-AP, pour former un complexe E6/E6-AP capable d'ubiquitinyler efficacement p53 et d'induire ainsi sa destruction (73, 75).

5. Surexpression de l'EGFR

Les facteurs de croissance tels que l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) sont reconnus par des récepteurs à tyrosine kinase localisés à la surface cellulaire. Après fixation du ligand, le récepteur subit une dimérisation et une série de phosphorylation de ses propres résidus tyrosine a lieu le long de la partie intracellulaire du récepteur, ce qui constitue le point de départ des cascades de signalisation. Il existe une boucle d'auto-régulation négative visant à limiter l'effet de la stimulation par les facteurs de croissance : la fixation du ligand sur le récepteur induit également la conjugaison d'une chaîne d'ubiquitine sur la partie intracellulaire du récepteur, ce qui conduit à la dégradation du couple ligand-récepteur après internalisation et fusion avec le compartiment lysosomal. La E3 ligase responsable de la fixation de l'ubiquitine sur le récepteur est un complexe monomérique appelé Cbl capable de cibler les résidus tyrosine phosphorylés des récepteurs (97).

La famille de protéines à tyrosine kinase EGFR joue un rôle important dans la pathogénèse de divers cancers, plus particulièrement dans les gliomes et les tumeurs du sein. Environ 40% des glioblastomes présentent des mutations du récepteur à l'EGF, la plus fréquente résultant en une activation constitutive du récepteur avec un faible niveau d'autophosphorylation du résidu tyrosine. Δ EGFR ne subit pas une régulation négative par la E3 ligase Cbl. La mutation touche généralement le site de fixation à Cbl. L'absence de régulation négative conduit à une stimulation cellulaire accrue par les facteurs de croissance et participe à la prolifération cellulaire incontrôlée (67, 68).

B. Maladies neuro-dégénératives A reprendre

1. Généralités

La plupart des maladies neurodégénératives se caractérisent par la présence de corps d'inclusion, constitués de polypeptides ubiquitinylés, dénaturés et insolubles, qui n'ont pas été dégradés par le système ubiquitine-protéasome. Ce phénomène a été rapporté pour la maladie d'Alzheimer (plaques amyloïdes), la maladie de Parkinson (corps de Lewy), la sclérose amyotrophique latérale (inclusions hyalines) ou la chorée de Huntington (inclusions nucléaires). Toutefois, un lien pathogénique direct n'a jusqu'à présent pas été mis en

évidence : on ne sait pas si des aberrations dans la cascade protéolytique sont à l'origine de ces maladies ou si le système ubiquitine – protéasome joue seulement un second rôle, en étant incapable de dégrader les protéines anormales, dont l'accumulation est toxique (67, 108, 145).

L'accumulation de ces protéines pourrait être due en partie à la diminution de l'activité du protéasome avec l'âge et ainsi à une perte d'efficacité de la voie ERAD (146, 147). On suppose que la formation des corps d'inclusion est un mécanisme protecteur mis en place en réponse à un dépassement des capacités de dégradation du protéasome. Afin d'éviter une agrégation disséminée des protéines anormales dans la cellule, il existerait des sites préférentiels de stockage au niveau des centrosomes, vers lesquels les protéines seraient acheminées. Ces sites de stockage, aussi appelés aggrésomes, sont entourés par une "cage" de vimentine et permettraient d'assurer le fonctionnement cellulaire en dépit de l'accumulation des protéines anormales (146).

2. Cas particulier de la maladie de Parkinson

De toutes les maladies neuro-dégénératives, la maladie de Parkinson est celle qui est le plus fortement associée à une dégradation anormale des protéines par le système ubiquitine-protéasome (146). Il a été clairement démontré que les trois activités protéolytiques du protéasome sont altérées au niveau de biopsies cérébrales réalisées chez des patients atteints de maladie de Parkinson (148, 149).

Un autre facteur important dans la pathogénèse de la maladie de Parkinson est la parkine. Il s'agit d'une protéine de 465 acides aminés qui possède une activité E3 ligase. Des mutations du gène de la parkine ont été découvertes chez les patients atteints de la forme juvénile autosomique récessive de la maladie. Ces mutations semblent intervenir dans près de 50% des cas familiaux, avec un début avant 45 ans, mais également dans plus de 15% des cas isolés de maladie de Parkinson à début précoce, dans des populations de diverses origines ethniques. Grâce à son activité E3-ligase, la parkine reconnaît des protéines substrats spécifiques et induit leur poly-ubiquitylation, signal de ciblage vers la voie de dégradation par le protéasome. La perte de cette fonction entraînerait une accumulation délétère de substrats non ubiquitylés qui serait à l'origine de la dégénérescence neuronale chez les patients porteurs de mutations (115, 150, 151).

Enfin, une des protéines majeures constituant les corps de Lewy est la synucléine α qui n'est plus dégradée par le protéasome et s'aggrège dans le cytoplasme des neurones dopaminergiques. Ces agrégats sont capables d'interagir avec la sous-unité 19S et inhibent ainsi le protéasome 26S, perpétuant un cercle vicieux d'accumulation d'agrégats protéiques et de dégénérescence neuronale subséquente (152).

C. Mucoviscidose

Le gène *CF* (*Cystic Fibrosis*) code pour le canal ionique CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Receptor*) qui joue un rôle important dans l'efflux cellulaire des ions chlorure. Des mutations au niveau de ce gène conduisent à une dérégulation des flux d'ions chlorure et aux manifestations cliniques de la mucoviscidose (notamment l'obstruction chronique des voies aériennes et une malabsorption sévère due à un défaut des fonctions exocrines du pancréas). A l'état physiologique, seulement une faible proportion du récepteur CFTR sauvage parvient à la surface des cellules, alors que la majorité des récepteurs synthétisés sont dégradés au niveau du reticulum endoplasmique par le système ubiquitine-protéasome. Plus de 600 mutations au niveau du gène *CF* ont été décrites, la plus fréquente étant la mutation $\Delta F508$. Dans ce cas, la totalité des récepteurs sont dégradés au niveau du reticulum endoplasmique, avec probablement une absence totale de récepteurs au niveau de la surface cellulaire, ce qui contribue à la pathogénèse de la maladie (67).

D. Syndrome de Liddle

Il s'agit d'une forme sévère d'hypertension artérielle due à la mutation d'un domaine du canal ENac rénal (*Epithelial Na⁺ channel*). Le canal muté est incapable d'interagir avec son ubiquitine-ligase Nedd4, ce qui conduit à la stabilisation du canal et ainsi à une augmentation de la réabsorption du Na⁺ et de l'eau, responsable de l'hypertension artérielle (67, 108).

E. Syndrome d'Angelman

Le système ubiquitine-protéasome est probablement impliqué dans le développement du cerveau humain. Un défaut dans le gène codant pour la E3 ligase E6-AP a été identifié comme la cause directe du syndrome d'Angelman caractérisé par un retard mental sévère, une épilepsie et une gaieté anormale. Les protéines cérébrales cibles qui sont probablement stabilisées par la mutation, n'ont toujours pas été identifiées (67).

VII. Conclusions

Le système ubiquitine-protéasome joue un rôle prépondérant dans tous les compartiments cellulaires et participe, par son action de protéolyse ciblée et étroitement régulée, à l'homéostasie cellulaire. En outre, les peptides produits par le protéasome jouent un rôle déterminant dans la décision selon laquelle une cellule est reconnue comme infectée ou tumorigène et éliminée ou si elle est identifiée comme composant du soi et épargnée.

L'ubiquitinylation est aujourd'hui considérée comme une modification post-traductionnelle des protéines aussi importante que la phosphorylation : elle joue un rôle fondamental dans le destin des protéines cellulaires. La complexité de la machinerie enzymatique responsable de la fixation de l'ubiquitine sur les protéines cibles participe à la régulation indispensable à un système de dégradation.

En dépit de la progression marquée des connaissances sur le système ubiquitine-protéasome, un certain nombre de questions restent posées. Par exemple, les conditions d'association directe entre les machineries d'ubiquitinylation et le protéasome doivent être précisées. L'élongation des chaînes d'ubiquitine est également un processus dont certains paramètres restent à découvrir.

Les perspectives concernent d'une part la découverte de nouveaux substrats du protéasome et de nouveaux complexes E3-ligase et, d'autre part, la reconnaissance de l'implication du système ubiquitine-protéasome dans la pathogénie de diverses maladies humaines. En conséquence, mais aussi en parallèle, un champ de recherche particulièrement intéressant concerne la mise au point et le développement de modulateurs de l'activité du protéasome visant à limiter la participation de ce système à divers états pathologiques.

Chapitre 4 : Développement préclinique et clinique des inhibiteurs de protéasome

Chapitre 4 : Développement préclinique et clinique du bortézomib

La découverte du système ubiquitine-protéasome a conduit au développement d'inhibiteurs de protéasome afin de mieux appréhender les rôles physiologiques de ce système. La découverte fortuite du fait que ces inhibiteurs peuvent induire sélectivement l'apoptose des cellules néoplasiques a conduit à la mise en place d'études systématiques et au développement ultérieur d'essais cliniques en oncologie.

I. Généralités

A. Classification des inhibiteurs de protéasome

Les premières étapes dans le développement des inhibiteurs sont issues des travaux concernant les mécanismes moléculaires impliqués dans l'atrophie musculaire, comme celle qui survient lors de la dénervation et de la plupart des maladies systémiques, dans la cachexie due au cancer, le SIDA ou l'insuffisance rénale. Historiquement, les premiers inhibiteurs de protéasome synthétisés ont été de simples aldéhydes peptidiques, analogues des substrats préférentiels de l'activité chymotrypsine-like du protéasome. Des dérivés naturels, comme la lactacystine, ont ensuite été mis en évidence, notamment en raison de leurs propriétés pro-apoptotiques, attribuées *a posteriori* à leur capacité d'inhibition du protéasome (84). Les inhibiteurs de protéasome existant actuellement ciblent principalement l'activité chymotrypsine-like (Tableau VIII, Figure 17) (153).

Tableau VIII: Classification des principaux inhibiteurs de protéasome (153-157) Kisselev, 2001 #705]

Origine	Classe	Exemples de molécules	Spécificité	Mécanisme d'inhibition
Inhibiteurs naturels	β -lactones	Lactacystine et dérivés Salinosporamide A (NPI-0052)	Relativement spécifiques mais faibles inhibiteurs du protéasome	Métabolisation en clasto-lactacystine β -lactone qui forme un ester covalent avec le résidu catalytique thréonine
	Composés macrocycliques	TMC-95a et dérivés	Inhibiteurs sélectifs du protéasome	Fixation au site actif thréonine par des ponts disulfures
	Gliotoxines	Toxine épipolythiodioxopipérazine fongique	<i>nd</i>	Fixation à un site catalytique inconnu qui provoque l'inhibition du protéasome
	Polyphénols extraits du thé vert	Epigallocatechin-3-gallate	Inhibiteurs sélectifs du protéasome	Acylation des résidus thréonine
Inhibiteurs synthétiques	Aldéhydes peptidiques	MG115, MG132, PSI, LLnV, ALLN, Z-LLF	Inhibiteurs également de la calpaïne 1 et de la cathepsine B	Analogues de l'état de transition. La partie aldéhydrique interagit réversiblement avec le résidu catalytique thréonine du protéasome
	α -céto-amides	Dérivés amides des aldéhydes peptidiques	Inhibiteurs sélectifs du protéasome	Réaction réversible avec les résidus thréonine
	Acides et esters boroniques	PS-341, MG262, DFLB	Inhibiteurs sélectifs du protéasome	Réaction réversible de l'atome de bore avec le résidu catalytique thréonine
	Peptides époxycétones	Epoxomicine, eponomicine	Inhibiteurs sélectifs du protéasome	Fixation covalente aux sous-unités catalytiques du protéasome
	Peptides vinylsulfones	NLVS, YLVS	Inhibiteurs aussi des cathepsines	Formation d'adduits irréversibles avec les résidus thréonine

nd : non déterminé

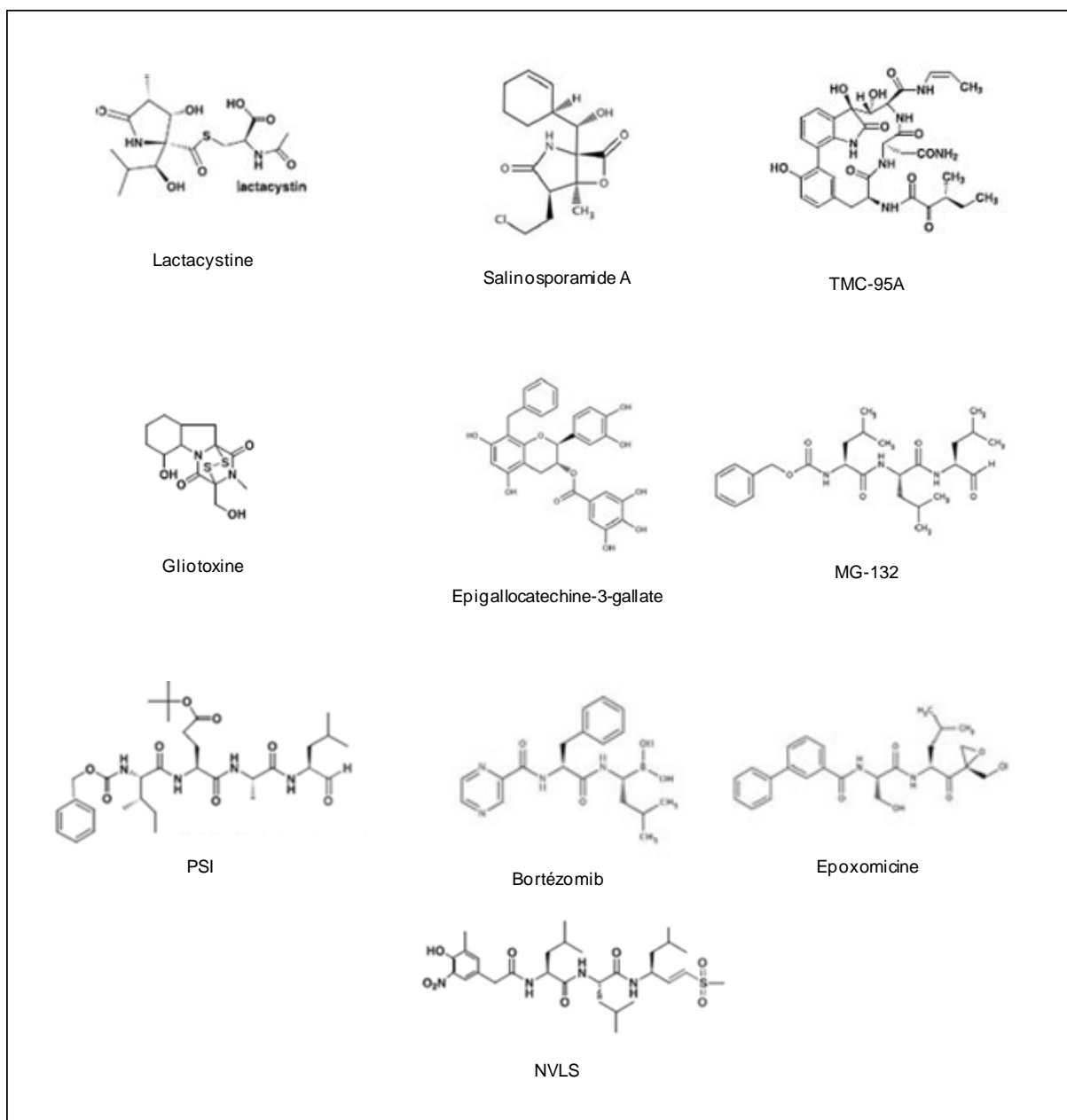


Figure 17 : Structures des principaux inhibiteurs de protéasome. Adapté d'après Guédat, et coll. et Kisselev, et coll. (157, 158)

Parmi toutes ces classes, les aldéhydes peptidiques, et les peptides vinylsulfones esteront dédiés à des expérimentations *in vitro*, notamment en raison de leur instabilité *in vivo*, de leur manque de spécificité vis-à-vis du protéasome et de leur fixation covalente au protéasome (69). A l'heure actuelle, le bortézomib appartenant à la classe des acides boroniques est le produit le plus avancé sur le plan clinique et est le seul inhibiteur de protéasome commercialisé. Depuis peu, une nouvelle molécule, le salinosporamide A ou NPI-0052, qui est un dérivé de la lactacyctine, a démontré un potentiel antitumoral intéressant sur divers

modèles tumoraux, notamment hématologiques et est évaluée dans des essais cliniques de phase I (66, 159, 160).

B. Nouvelle génération d'inhibiteurs et modulateurs de l'activité du protéasome

La plupart des composés naturels et synthétiques existant ciblent de façon efficace l'activité chymotrypsine-like du protéasome. Bien que celle-ci soit majoritairement responsable de l'activité protéolytique du protéasome, le(s) rôle(s) des deux autres activités reste(nt) à déterminer précisément, et des inhibiteurs spécifiques des ces deux activités sont nécessaires pour permettre la poursuite des investigations biologiques (153). Récemment, une nouvelle génération d'inhibiteurs, présentant un spectre d'activité plus large (ciblage des activités trypsine-like et caspase-like) ou ciblant l'immunoprotéasome est en cours de développement (112). Par ailleurs, en dépit du ciblage vers le site actif de l'activité chymotrypsine-like, les inhibiteurs existant présentent pour la plupart des effets plus ou moins importants sur les deux autres activités du protéasome. Ces effets sont également à l'étude (112, 157).

Outre les inhibiteurs décrits précédemment, un certain nombre de molécules commercialisées pour d'autres indications ont été décrites comme pouvant modifier significativement l'ubiquitinylation des protéines ou les différentes activités protéolytiques du protéasome *in vitro* (Tableau IX).

Tableau IX : Agents influençant les fonctions du système ubiquitine-protéasome *Adapté d'après Orłowski (161).*

Classe médicamenteuse	Mécanisme d'action
Agents de chimiothérapie	
Aclarubicine	Inhibition de l'activité chymotrypsine-like du protéasome
Acide <i>trans</i> -rétinoïque	Accélération de la dégradation protéasomique d'une protéine anormale présente dans les leucémies promyélocytiques
Arsenic trioxyde	Inhibition de l'ubiquitinylation et de la dégradation de I κ B α
Camptothécine	Stimulation de l'ubiquitinylation et de la dégradation de la topoisomérase I
Geldanamycine	Inhibition des Hsp90 et stimulation de la dégradation des protéines cibles
Vinblastine, vincristine	Inhibition des 3 activités protéolytiques du protéasome
Rapamycine	Inhibition des fonctions protéolytiques du protéasome
Agents immunosuppresseurs	
Cyclosporine A	Compétiteur non-compétitif de l'activité chymotrypsine-like
Autres agents	
Lovastatine	Mécanisme inconnu
Agents anti-rétroviraux (ritonavir, saquinavir)	Inhibition des activités chymotrypsine-like et trypsine-like du protéasome

Si les effets de ces différents agents sur le système ubiquitine protéasome ont été bien démontrés *in vitro*, la réalité et l'importance de ces phénomènes *in vivo* aux concentrations classiquement utilisées en thérapeutique humaine restent à évaluer (157).

C. Conséquences majeures de l'inhibition du protéasome

1. Introduction

La comparaison des données d'efficacité avec celles d'environ 80 000 autres composés a démontré que les inhibiteurs de protéasome possèdent un spectre d'activité unique et original sur un panel de 60 lignées cellulaires du NCI (*National Cancer Institute*) (162). De façon générale, l'inhibition du système ubiquitine-protéasome provoque un déséquilibre de multiples protéines régulatrices, conduisant à des arrêts du cycle cellulaire en phases G1/S et G2/M et induisant les voies pro-apoptotiques (163).

Parmi leurs multiples conséquences, les inhibiteurs de protéasome provoquent en particulier :

- l'accumulation de protéines anormales qui peuvent induire l'apoptose,
- la stabilisation de suppresseurs de tumeurs (p53, p27),
- l'inhibition de l'activation de NF- κ B.

Toutefois, l'importance relative de ces différents mécanismes *in vivo* reste difficile à appréhender et chaque inhibiteur possède des spécificités d'action propres (84).

2. Inhibiteurs de protéasome et induction de l'apoptose

Classiquement les inhibiteurs de protéasome sont décrits comme des inducteurs d'apoptose, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. L'apoptose induite après exposition des cellules tumorales à des inhibiteurs de protéasome a été mise en évidence sur de nombreux types tumoraux : lymphomes hodgkinien et non-hodgkinien, myélome multiple, leucémie, cancer de la prostate, glioblastome, cancer pancréatique, cancer colorectal, cancer ovarien, cancer gastrique, cancer du col et cancer du poumon (164). De nombreux mécanismes ont été identifiés comme susceptibles de participer à l'apoptose induite par les inhibiteurs de protéasome. Parmi ces mécanismes, on distingue, entre autres, la restauration de l'activité pro-apoptotique de p53, l'inhibition de NF- κ B et des arrêts dans le cycle cellulaire provoqués par la non-dégradation de p21 et p27. Il semble que ces processus soient dépendants du type cellulaire considéré et de l'inhibiteur utilisé (165).

3. Inhibiteurs de protéasome et réponse au choc thermique

Le choc thermique constitue un processus particulier dans la réponse aux inhibiteurs de protéasome. En effet, il est provoqué par l'exposition aux inhibiteurs du protéasome mais la réponse cellulaire qui fait suite participe à la résistance à ces mêmes molécules

Les protéines de choc thermique sont induites non seulement par de hautes températures mais aussi par de multiples conditions qui endommagent les protéines cellulaires, notamment l'exposition aux métaux lourds ou aux radicaux libres. Le point commun à toutes ces

conditions est qu'elles causent l'accumulation de protéines altérées dans les cellules. Le système ubiquitine-protéasome capable de dégrader ces protéines endommagées, est un des acteurs majeurs qui supprime indirectement l'expression des protéines de choc thermique. Dans le cas de l'exposition à un inhibiteur de protéasome, une accumulation de protéines anormales a lieu, et l'induction des protéines de choc thermique est observée.

Ainsi, l'exposition à des conditions de stress (comme l'exposition à un inhibiteur de protéasome) conduit à la production de diverses chaperones, permettant la mise en conformation des protéines, et à la production d'ubiquitine et d'autres composants de la machinerie de dégradation. Les cellules sont ainsi mieux armées pour faire face au stress induit par les protéines anormales (84).

4. Inhibiteurs de protéasome et spécificité tumorale

Le fait que le protéasome occupe une place centrale dans l'exécution de nombreuses fonctions cellulaires semble indiquer qu'il ne peut être une cible thérapeutique : des agents modulant l'activité protéolytique du protéasome ne devraient pas présenter un indice thérapeutique acceptable, permettant une administration *in vivo*. Néanmoins, des expériences empiriques ont démontré que de nombreux types de cellules malignes sont plus sensibles à l'inhibition du protéasome que leurs homologues normaux (96, 164). Alors que les cellules normales peuvent récupérer d'un blocage transitoire du protéasome, les cellules malignes entrent en apoptose (166).

a. Constatations précliniques et cliniques

Au niveau préclinique, il a été démontré que les fibroblastes transformés par *ras* et *c-myc* et les lymphoblastes transformés par *c-myc* sont jusqu'à 40% plus sensibles à l'apoptose induite par les inhibiteurs de protéasome que les fibroblastes primaires et les lymphoblastes humains non transformés (164).

Au niveau clinique, des cellules malignes issues de patients atteints d'hémopathies malignes ont été traitées avec des inhibiteurs de protéasome et leur sensibilité a été comparée à celles

de leurs homologues cellulaires normaux isolés chez ces mêmes patients. Ainsi, chez des patients atteints de leucémie lymphoblastique chronique (LLC), les cellules leucémiques sont dix fois plus sensibles à la lactacystine que les lymphocytes normaux. Les cellules hématopoiétiques progénitrices CD34⁺ issues de patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC) sont trois fois plus sensibles à l'apoptose induite par les inhibiteurs de protéasome que les cellules correspondantes des volontaires sains. Les cellules malignes des patients atteints de myélome multiple sont 20 à 40 fois plus sensibles à l'apoptose induite par le bortezomib que les cellules mononucléaires sanguines normales. Les cellules souches leucémiques des patients atteints de leucémie myéloblastique aiguë (LMA) sont plus sensibles au MG132 que les cellules souches hématopoiétiques normales (167, 168). En ce qui concerne les tumeurs solides, relativement peu de données ont été publiées. Chen, et coll. ont évalué l'activité chymotrypsine-like du protéasome sur 25 prélèvements de cancers du sein (169). Leurs résultats montrent une augmentation de l'activité du protéasome sur 23 prélèvements, comparativement à du tissu sain adjacent, en lien avec une augmentation de l'expression des sous-unités du protéasome.

b. Hypothèses proposées

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer les différences de sensibilité à l'inhibition du protéasome entre cellules normales et cellules tumorales.

Dans les cellules normales, l'inhibition du protéasome induit un blocage du cycle cellulaire, la dégradation organisée des cyclines et des autres régulateurs du cycle n'étant plus assurée. La division cellulaire ne sera alors possible que lorsque l'inhibition du protéasome sera levée. Dans les cellules tumorales, les points de contrôle du cycle sont généralement absents. L'inhibition du protéasome ne conduit pas à un blocage du cycle cellulaire mais modifie l'équilibre entre les facteurs pro- et anti-apoptotiques, créant ainsi des conditions de stress inacceptables (69, 167, 168).

En outre, dans certains types tumoraux, une dérégulation du système ubiquitine-protéasome a été mise en évidence. En effet, les cellules de LLC présentent une activité chymotrypsine-like trois fois supérieure à celles des lymphocytes normaux. Il est probable que les cellules cancéreuses augmentent leurs capacités de dégradation pour pouvoir faire face aux

conséquences des mutations et de l'instabilité chromosomique. Les cellules cancéreuses et les cellules embryonnaires à prolifération rapide ont généralement des taux d'activité protéasomique plus élevés que leurs homologues bien différenciés. La raison en est inconnue mais est probablement liée aux "besoins" accrus des cellules en phase de prolifération rapide, ou à des taux plus élevés de stress oxydatif, ou aux cytokines et aux facteurs de croissance. La sécrétion autocrine d'interleukine 3 (IL3) par les cellules cancéreuses augmente l'activité du protéasome. De même, les phénomènes d'hypoxie/reperfusion au niveau du microenvironnement tumoral sont connus pour modifier la distribution et la fonction des protéasomes au sein des tumeurs. Ces phénomènes rendent les cellules tumorales plus dépendantes d'une activité "optimale" du protéasome (86, 165, 167, 168).

II. Principaux résultats des études précliniques concernant le bortézomib

A. Généralités

Aussi connu comme N-pyrazinecarbonyl-L-phenylalanine-L-leucine boronic acid, MLN-341, LDP-341 ou PS-341, le bortézomib (Velcade[®]) appartient à la classe des acides di-peptidyl-boroniques. Il s'agit d'un inhibiteur réversible de l'activité chymotrypsine-like du protéasome. Il est le premier inhibiteur de protéasome à permettre une administration *in vivo*, et par suite, à atteindre les phases cliniques (170, 171). Mis au point initialement par la firme Millenium, le bortézomib a ensuite été développé par les laboratoires Janssen-Cilag. Il possède actuellement une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le traitement de patients atteints de myélome multiple en rechute ou réfractaires à une première ligne de traitement (172).

B. Tolérance du bortézomib

1. Etudes de pharmacologie de sécurité

Ces études ont pour objet de déterminer si l'agent testé est susceptible d'induire des effets indésirables graves sur les organes "critiques" que sont le système nerveux, le système cardiovasculaire et le système respiratoire. Les premières études de tolérance du bortézomib ont été réalisées chez des souris et des singes et ont mis en évidence pour les doses les plus élevées une tachycardie initiale suivie d'une hypotension importante. Aucun effet indésirable particulier concernant le système nerveux central et le système ventilatoire n'a été observé (167).

2. Etudes de toxicologie

Les objectifs de ces études sont d'établir le profil toxicologique, d'identifier les organes cibles de la toxicité, d'établir le potentiel génotoxique, de déterminer les interactions médicamenteuses toxiques et de déterminer la toxicité pour la reproduction du produit testé. La compréhension des mécanismes impliqués fait également partie des objectifs. Les études

de toxicité du bortézomib ont été réalisées à la fois en dose unique et en doses réitérées aussi bien chez le singe et le chien, que chez le rat et la souris. Ces études ont permis la détermination des doses maximales tolérées (DMT), très variables entre les différentes espèces (en dose unique, la DMT est de 1,2 mg/m² - 3,6 mg/m² - 0,6 mg/m² et 3,0 mg/m², respectivement chez le singe, le chien, le rat et la souris). Les études de toxicologie ont également montré que les principaux effets indésirables du bortézomib chez l'animal sont des toxicités gastro-intestinales (diarrhée, vomissements), des toxicités hématologiques (principalement des thrombopénies) et des neuropathies périphériques partiellement résolutive entre les injections. En outre, des hypotensions majeures ont été rapportées aux doses les plus élevées chez le singe (167).

Les études évaluant le potentiel toxique pour la reproduction du bortézomib ont été réalisées chez le lapin et le rat et ont montré que ce produit pouvait potentiellement affecter la fertilité des mâles et des femelles. En outre, les études de toxicologie du développement ont démontré une absence d'effets tératogènes du produit (167).

Des études de génotoxicité ont été menées afin de déterminer le potentiel mutagène du bortézomib à la fois dans des systèmes *in vitro* et *in vivo*. Si *in vitro* le bortézomib a démontré un potentiel clastogène, les études *in vivo* n'ont pas montré la formation de micro-noyaux chez la souris. Il est probable que la divergence entre ces résultats provienne des différences de doses entre ces deux types d'études : la tolérance du bortézomib limite en effet considérablement les doses administrables *in vivo* (167).

Enfin, des études de tolérance concernant les associations du bortézomib avec d'autres agents de chimiothérapie (carboplatine, cyclophosphamide, doxorubicine, irinotécan, gemcitabine, taxol et 5-fluorouracile) ont été conduites chez la souris. Les résultats ont systématiquement démontré une additivité des effets indésirables (167).

C. Activité antitumorale du bortézomib administré seul

Le bortézomib a montré des propriétés antitumorales prometteuses sur de nombreux modèles précliniques de tumeurs *in vivo* (Tableau X).

Tableau X : Principales études précliniques *in vivo* du bortézomib seul *Adapté d'après Boccardo, et coll. (173).*

Type tumoral	Activité	Schéma thérapeutique	Références
Myélome multiple	Diminution de la croissance tumorale et de l'angiogenèse, augmentation de la survie	0,5 mg/kg iv x 2/sem pendant 4 semaines	(174)
Leucémie	Diminution ou sans effet sur la croissance tumorale	1,0 mg/kg ip x 2/sem pendant 2 semaines	(175, 176)
Poumon	Délaï de croissance tumorale et diminution des métastases pulmonaires	1,0 mg/kg po x 1/j pendant 18 jours	(177)
Sein	Diminution de la fraction survivante cellulaire	5,0 mg/kg ip 1 fois	(177)
Prostate	Diminution de la croissance tumorale Diminution ou sans d'effet sur l'angiogenèse	1,0 mg/kg iv x 1/sem pendant 4 semaines ou toutes les 72h pendant 15 jours	(178, 179)
Pancréas	Diminution ou sans effet sur la croissance tumorale, l'angiogenèse et l'apoptose	1,0 mg/kg iv x 2/sem pendant 2 ou 3 semaines ou x 1/ semaine pendant 4 semaines ou 0,25 mg/kg ip x 2/sem pendant 4 semaines	(180-182)
Tête et cou	Diminution de la croissance tumorale et de l'angiogenèse	1,5 mg/kg ip x 3/sem pendant 3 semaines	(183)
Côlon	Diminution de la croissance tumorale et augmentation de l'apoptose	1,0 mg/kg iv x 2/sem	(184)
	Diminution de la croissance tumorale	1,0 mg/kg ip x 2/sem	(185)
Rein	Diminution du nombre de métastases pulmonaires	0,5 – 1,0 – 1,5 mg/kg	(186)
Neuroblastome	Diminution de l'angiogenèse et de la croissance tumorale	1,0 mg/kg iv 2 ou 3 fois/sem	(187, 188)
Ovaire	Diminution de la croissance tumorale et de l'angiogenèse, augmentation de l'apoptose	1,0 mg/kg iv x 2/sem	(189)
Mélanome	Diminution de la croissance tumorale et de l'angiogenèse, augmentation de l'apoptose	1,25 mg/kg x 2/sem pendant 5 semaines	(190)

iv : voie intraveineuse ; ip : voie intrapéritonéale ; po : per os.

Administré seul, l'efficacité du bortézomib est dose-dépendante et cet agent est plus efficace s'il est administré à une dose proche de la dose maximale tolérée (191). De façon globale, le bortézomib peut induire trois types d'effets : induction de l'apoptose, arrêt de la croissance tumorale et réduction de l'angiogenèse. Les mécanismes impliqués sont multiples et variables

en fonction des types cellulaires considérés. Une diminution des signaux de survie et de croissance, une augmentation des signaux pro-apoptotiques ou une inhibition de la réparation de l'ADN sont observés (192).

Par ailleurs, de façon très surprenante, il apparait que l'inhibition du protéasome soit plus élevée dans les tissus normaux que dans les tumeurs. Il semble que les cellules normales, contrairement aux cellules tumorales, soient capables de tolérer une inhibition importante de l'activité du protéasome sans entrer dans les voies de mort cellulaire (193). Pour toutes les espèces, une inhibition transitoire du protéasome est mieux tolérée et les plus hauts niveaux d'inhibition du protéasome correspondent à la toxicité la plus importante (191).

Une autre observation des études précliniques est la très faible fréquence de résistance à l'efficacité du bortézomib, même en présence de facteurs de résistance connus (notamment l'expression de la glycoprotéine P). Une étude systématique des transporteurs membranaires associés à la résistance multiple aux drogues a montré que le bortézomib est un mauvais substrat de ce type de transporteurs (194).

D. Activité antitumorale du bortézomib administré en association

Un certain nombre d'études précliniques ont évalué l'activité antitumorale du bortézomib associé à d'autres thérapies (Tableau XI).

Tableau XI : Principales études précliniques du bortézomib en association *Adapté d'après Boccadoro, et coll. (173).*

Type tumoral	Drogue	Modèles	Références
Chimiothérapie	5-FU, cisplatine, paclitaxel, doxorubicine, cyclophosphamide	Sein, poumon	(177)
	Melphalan, doxorubicine, dexaméthasone	Myélome multiple	(195-197)
	Irinotécan	Côlon, pancréas	(182, 184)
	Gemcitabine	Pancréas, vessie	(180, 198)
	Doxorubicine liposomale pegylée	Sein	(199)
	Docétaxel	Pancréas	(200)
	Témozolomide	Mélanome	(190)
	Salinosporamide A	Myélome multiple	(201)
	Radiothérapie		Sein, côlon, prostate
Immunothérapie	Daclizumab	Leucémie	(176)
Nouveaux agents	TRAIL/ Apo2L	Myélome multiple, leucémie myéloïde, rein	(204, 205)
	Inhibiteurs d'Hsp90 : 17-AAG	Sein	(206)
	Inhibiteurs d'HDAC : SAHA	Leucémie myéloïde chronique,	(207-209, 210,
	butyrate de sodium	myélome multiple, poumon, tête et cou	211)
Transplantation	Transplantation allogénique de moëlle osseuse	Leucémie	(212)

5-FU : 5 FluoroUracile ; Hsp90 : Heat shock protein 90 ; 17-AAG : 17-N-AllylAmino-17-demethoxyGeldenamycin ; SAHA : SuberoylAnilide Hydroxamic Acid.

Les études précliniques d'association du bortézomib ont démontré des effets synergiques avec d'autres thérapies anticancéreuses. Par exemple, la combinaison du bortézomib avec le témozolomide a été étudiée dans des modèles de mélanome malin (190). *In vitro*, le bortézomib augmente les effets antiprolifératifs et cytotoxiques du témozolomide sur des cellules de mélanome. La combinaison de ces deux produits entraîne la rémission complète de mélanomes xénotransplantés chez la souris. Les mécanismes expliquant la sensibilisation aux autres thérapies anticancéreuses impliquent essentiellement une régulation négative des voies de résistance majeures (NF- κ B, P-gp, MAPK, réparation de l'ADN...) (213, 214).

E. Conclusion des études précliniques

Le bortézomib a démontré des propriétés anti-prolifératives, pro-apoptotiques, antiangiogéniques et antitumorales sur divers modèles de tumeurs humaines ou murines. Les investigations précliniques menées ont montré que le bortézomib présente une tolérance acceptable aux doses auxquelles il a démontré une activité antitumorale sur des modèles de xénogreffes de myélome multiple, de leucémie, de cancer du poumon, du sein, de la prostate, du pancréas, de la tête et du cou, de côlon et de mélanome. Le bortézomib potentialise également l'effet antitumoral d'autres thérapies anticancéreuses (chimiothérapie, radiothérapie, immunothérapie...), sans aggravation de la toxicité. Ces études précliniques ont apporté le rationnel scientifique nécessaire à la mise en œuvre d'essais cliniques étudiant l'intérêt du bortézomib seul ou en association dans le traitement de patients atteints de tumeurs solides ou d'hémopathies malignes (173).

III. Développement clinique du bortézomib dans le traitement des tumeurs solides

A. Etudes de phase I

L'administration de bortézomib, seul ou en association, a été évaluée au cours d'études de phase I (Tableau XII).

Tableau XII : Etudes cliniques de phase I du bortézomib dans les tumeurs solides

Pathologie	Nombre de patients	Schéma thérapeutique	DMT	Réponses	Toxicités principales	Références
Cancer de la prostate	53	0,13 mg/m ² /j à 2,00 mg/m ² /j i.v. 1 fois/sem pendant 4 semaines (cycle de 5 semaines)	1,6 mg/m ²	2 RP et 2 réponses en PSA	Diarrhée, hypotension	(215)
Tumeurs solides de stade avancé	28 + 16	Schéma 1 : 2 fois/sem pendant 4 semaines (cycle de 6 semaines) Schéma 2 : 2 fois/sem pendant 2 semaines (cycle de 3 semaines)	1,7 mg/m ² 1,6 mg/m ²	1 RP (myélome multiple)	Neuropathie, fatigue	(216)
Hépatocarcinome	18	Dose de départ : 1 mg/m ² /j J1, J4, J8 et J11 pendant 3 semaines	1,3 mg/m ²	7 MS	Thrombocytopénie, neuropathie, fatigue	(217)
Tumeurs solides de stade avancé	14	BTZ : dose de départ 0,8 mg/m ² /j J2, J5, J9, J12 Docétaxel : dose de départ 25 mg/m ² /j J1, J8 pendant 3 semaines	NE	4 MS	Toxicité hématologique	(218)
Tumeurs solides de stade avancé	25	BTZ : dose de départ 0,6 mg/m ² /j J2, J5, J9, J12 Paclitaxel : dose de départ 80 mg/m ² /j J1, J8 pendant 3 semaines	NE	1 RP	Neurotoxicité, fatigue	(219)
Tumeurs solides de stade avancé	51	BTZ : dose de départ 1,3 mg/m ² /j 2 fois/sem Irinotécan : 125 mg/m ² /j J1, J8 pendant 3 semaines	NE	10 MS	Diarrhée, nausées, vomissements	(220)

Tumeurs solides de stade avancé	18	BTZ : 1,0 – 1,3 – 1,6 mg/m ² 1 ou 2 fois/sem Celecoxib : 200 – 400 mg/m ² 2 fois/j	NE	2 MS		(221)
Tumeurs solides de stade avancé	31	BTZ : dose de départ 1,0 mg/m ² /j 2 fois/sem Gemcitabine : 1000 mg/m ² /j 1 fois/sem pendant 2 semaines (cycle de 3 semaines)	NE	1 RP, 7 MS	Douleurs abdominales, toxicité hématologique	(222)
Tumeurs solides de stade avancé	21	BTZ : dose de départ 0,5 mg/m ² /j 2 fois/sem 5-FU : 500 mg/m ² /j Leucovorin : 20 mg/m ² pendant 4 semaines	NE	1 RP, 8 MS	Douleurs abdominales, diarrhée	(223)
Tumeurs solides de stade avancé	13	BTZ : 1,0 – 1,3 – 1,6 mg/m ² J1 et J8 Oxaliplatine : 130 mg/m ² J1 Capécitabine : 750 - 900 mg/m ² 2 fois/j pendant 14 jours	1,6 mg/m ²	3 RP	Toxicité hématologique, diarrhée	(224)
Carcinome pulmonaire non à petites cellules de stade avancé	26	BTZ : dose de départ 1,0 mg/m ² / J J1, J4, J8, J11 Gemcitabine : dose de départ 800 mg/m ² /j J1, J8 Carboplatine : AUC 5 à J1	1,0 mg/m ²	9 RP, 8 MS	Myélosuppression, hyponatrémie	(225)
Cancer ovarien de stade avancé	15	BTZ : dose de départ 0,75 mg/m ² /j J1, J4, J8, J11 Carboplatine : AUC 5 à J1	NE	2 RC, 5 RP	Diarrhée	(226)

DMT : Dose Maximale Tolérée ; RP : Réponse Partielle ; PSA : Prostatic Specific Antigen (antigène prostatique spécifique) ; MS : Maladie Stable. BTZ : BorTéZomib ; 5-FU : 5-FluorUracile ; AUC : Area Under Curve (aire sous la courbe) ; RC : Réponse Complète ; NE : Non Evalué.

Lorsqu'il est administré seul, la dose maximale tolérée du bortézomib est de 1,3 mg/m². En association avec d'autres agents de chimiothérapie, il semble qu'on ne puisse pas dépasser une dose de 1,0 mg/m², en raison d'effets indésirables de grade 3 ou 4 (227). Il est à noter que

dans une grande partie de ces études, la dose maximale tolérée n'est pas atteinte ou n'est pas déterminée, les investigateurs cherchant plus la "dose biologique efficace" que la DMT.

B. Etudes de phase II

1. Etudes de phase II du bortézomib administré seul

De nombreux essais de phase II chez des patients atteints de tumeurs solides de stade avancé sont en cours ou ont été publiés (Tableau XIII).

Tableau XIII : Etudes cliniques de phase II dans les tumeurs solides (bortézomib seul)

Pathologie	Nombre de patients	Schéma thérapeutique	Réponses	Toxicités principales	Références
Mélanome métastatique	27	1,5 mg/m ² /j J1, J4, J8, J11 pendant 3 semaines	6 MS	Neuropathie, fatigue, thrombocytopénie	(228)
Sarcome des tissus mous récurrent ou métastatique	25	1,5 mg/m ² /j J1, J4, J8, J11 pendant 3 semaines	1 RP	Neuropathie, myalgie, fatigue	(229)
Tumeur neuroendocrine métastatique	16	1,5 mg/m ² /j J1, J4, J8, J11 pendant 3 semaines	11 MS	Neuropathie, nausées, vomissements	(230)
Cancer colorectal métastatique	19	1,5 mg/m ² /j J1, J4, J8, J11 pendant 3 semaines	3 MS	Neuropathie, myalgie	(231)
Tumeur rénale de stade avancé	37	1,5 mg/m ² /j J1, J4, J8, J11 pendant 3 semaines	4 RP, 14 MS	Neuropathie	(232)
Tumeur rénale de stade avancé	23	1,5 mg/m ² /j J1, J4, J8, J11 pendant 3 semaines	1 RP	Neuropathie	(233)
Cancer du sein métastatique	12	1,5 mg/m ² /j J1, J4, J8, J11 pendant 3 semaines	Pas de réponse objective	Fatigue	(234)
Cancer du sein métastatique	12	1,5 mg/m ² /j J1, J4, J8, J11 pendant 3 semaines	1 MS	Thrombocytopénie, fatigue	(235)
Cancer du sein métastatique	12	1,5 mg/m ² /j J1, J4, J8, J11 pendant 3 semaines	Pas de réponse objective	-	(236)

MS : Maladie Stable ; RP : Réponse Partielle.

Ces études de phase II ont démontré la très faible efficacité du bortézomib administré seul, quel que soit le type de tumeurs solides considéré. Les réponses partielles observées le sont classiquement au prix d'effets indésirables de grade 3 ou 4 nécessitant l'arrêt du traitement ou la réduction des doses de bortézomib (227).

2. Etudes de phase II du bortézomib administré en association

L'absence d'efficacité du bortézomib administré seul a conduit les cliniciens à étudier l'intérêt d'associer cette molécule à d'autres agents de chimiothérapie (Tableau XIV).

Tableau XIV : Etudes de phase II du bortézomib administré en association dans les tumeurs solides *Adapté d'après Milano, et coll. (227).*

Pathologie	Nombre de patients	Schéma thérapeutique	Réponses	Toxicités principales	Références
Cancer colorectal en rechute	102	Bras 1 : BTZ 1,5 mg/m ² /j J1, J4, J8, J11 pendant 3 semaines Bras 2 : BTZ 1,3 m/m ² /j J1, J4, J8, J11 + irinotécan 125 mg/m ² pendant 3 semaines	RR 0% (bras 1) RR 3,5% (bras 2)	Fatigue, toxicité hématologique, neuropathies périphériques	
Carcinome colorectal	68	Bras 1 : BTZ 1,5 mg/m ² /j J1, J4, J8, J11 pendant 3 semaines Bras 2 : BTZ 1,3 m/m ² /j J1, J4, J8, J11 + irinotécan 125 mg/m ² pendant 3 semaines	ND	Toxicité hématologique, neuropathie, fatigue	(237)
Carcinome pancréatique métastatique	87	Bras 1 : BTZ 1,5 mg/m ² /j J1, J4, J8, J11 pendant 3 semaines Bras 2 : BTZ 1,0 m/m ² /j J1, J4, J8, J11 + gemcitabine 1000 mg/m ² pendant 3 semaines	RR 0% (bras 1) RR 10% (bras 2)	Douleurs abdominales, fatigue, neuropathie	(238)
Carcinome pulmonaire non à petites cellules pré-traité	75 + 80	Bras 1 : BTZ 1,5 mg/m ² /j J1, J4, J8, J11 pendant 3 semaines Bras 2 : BTZ 1,3 m/m ² /j J1, J4, J8, J11 + docétaxel 75 mg/m ² pendant 3 semaines	6 RP + 16 MS (bras 1) 7 RP, 35 MS (bras 2)	Neutropénie, neuropathie, fatigue	(239)
Cancer du sein métastatique	48	BTZ 1,0 – 1,5 mg/m ² J1, J4, J8, J11 Docétaxel 60-100mg/m ² pendant 3 semaines	RR 29% (39% à la MTD)	Neutropénie fébrile, asthénie, douleurs osseuses	(240)

ND : Non Disponible ; RR : Response Rate (taux de réponse) ; RP : Réponse Partielle ; MS : Maladie Stable.

L'association du bortézomib avec des agents de chimiothérapie traditionnelle semble présenter un intérêt. Toutefois, les études précliniques ont laissé espérer des résultats meilleurs que ceux obtenus au cours des essais cliniques. D'autres essais sont nécessaires afin de déterminer les combinaisons optimales entre le bortézomib et ces agents de chimiothérapie (227).

C. Conclusions des essais cliniques dans le traitement des tumeurs solides

Aucun type histologique n'a montré une sensibilité au bortézomib aussi importante que celle observée dans le myélome multiple. Les études cliniques réalisées ont démontré l'absence d'efficacité antitumorale du bortézomib administré seul à des patients atteints de tumeurs solides. Néanmoins, les associations d'agents cytotoxiques classiques avec le bortézomib restent potentiellement intéressantes (69, 227).

IV. Données cliniques

La majorité des données cliniques ont été obtenues chez des patients atteints de myélome multiple, pathologie pour laquelle le bortézomib a montré une efficacité marquée.

A. Schéma thérapeutique

Le bortézomib est indiqué à la dose de 1,3 mg/m² administré deux fois par semaines (J1, J4, J8, J11) tous les 21 jours. Lors des essais cliniques, le bortézomib a été administré à raison de 8 cycles consécutifs, 3 cycles supplémentaires pouvant être prescrits en consolidation. Cependant, la fréquence et l'intensité des effets indésirables conduisent fréquemment à des réductions de dose, en général 1,0 mg/m² ou 0,7 mg/m², administré à une fréquence similaire au traitement initial (163, 241).

B. Pharmacodynamie et pharmacocinétique

En raison de la clairance rapide du bortézomib, un essai enzymatique est utilisé afin d'estimer le degré d'inhibition du protéasome, notamment pour les études de phase I et II. L'inhibition de l'activité du protéasome dans les tissus est corrélée avec les taux d'inhibition observés dans le compartiment plasmatique. Des études chez les primates ont montré que le niveau d'inhibition du protéasome ne doit pas excéder 80% au niveau sanguin. Avec les doses recommandées (soit 1,3 mg/m²/injection), on obtient une inhibition de l'activité chymotrypsine-like du protéasome dans les globules blancs d'environ 60% dans l'heure qui

suit l'administration du bortézomib. Le degré d'inhibition du protéasome est dose-dépendant et ne semble pas être influencé significativement par les caractéristiques des patients (96, 163). Certaines études décrivent néanmoins des degrés d'inhibition moindres. Ainsi, Yang, et coll. (235) rapportent que pour 12 patientes atteintes de cancers du sein métastatique, l'administration de bortézomib à la dose de 1,5 mg/m² conduit à une inhibition de seulement 50% de l'activité du protéasome.

Les données concernant la pharmacocinétique du bortézomib sont rares dans la littérature. Le bortézomib se caractérise par une clairance rapide (40 L/h/m² après la première injection) et un volume de distribution important (800 à 900 L/m² en fonction des doses après la première injection) (242). Les voies de distribution et d'élimination du bortézomib ne sont pas encore entièrement caractérisées. Après une administration IV, plus de 90% de la drogue est éliminée du plasma en quelques minutes. Le bortézomib est métabolisé par les cytochromes P450 (CYP) hépatiques (isoformes 3A4, 2D6, 2C19, 2C9 et 1A2) en différents métabolites hydroxylés (163, 243). Plus de 30 métabolites ont été identifiés. Le bortézomib est d'abord métabolisé par oxydation *via* les cytochromes P450 et pas par les voies de type II (glucuronidation, sulfonation). La déboronation (par CYP3A4 et 2D6) représente plus de 90% du métabolisme total quand le bortézomib est incubé avec des microsomes de foie humain. Les métabolites déboronés ne présentent pas d'activité inhibitrice sur le protéasome. L'excrétion biliaire est la principale voie d'élimination du bortézomib (167).

C. Effets indésirables

Les principales toxicités (fréquence > 20%) attribuées au bortézomib sont des effets indésirables gastro-intestinaux, des thrombopénies transitoires, de la fatigue, de la fièvre et des neuropathies périphériques. La plupart de ces effets sont de grade 1 ou 2. Quelques cas de toxicités pulmonaires (dyspnées, épanchements pleuraux) ont été rapportés (242). La thrombopénie de grade ≥ 3 est classiquement observée chez 30% des patients. Les neuropathies périphériques sont classiquement l'effet indésirable le plus caractéristique du bortézomib. Elles apparaissent chez environ 35% des patients et sont plus fréquentes chez les patients ayant déjà reçu des traitements neurotoxiques ou atteints d'une neuropathie pré-existante. Les neuropathies périphériques dues au bortézomib sont d'abord sensibles et se

caractérisent par des douleurs, des paresthésies et des dysesthésies, les pieds étant plus atteints que les mains. Ces symptômes peuvent être minimisés par des ajustements de dose et sont habituellement réversibles à l'arrêt du bortézomib, mais il n'existe pas de traitement spécifique (163, 192, 244).

D. Résistance au bortézomib

En dépit du gain de survie apporté, les deux tiers des patients atteints de myélome multiple réfractaire en rechute ne répondent pas au bortézomib, et parmi ceux qui répondaient initialement, on observe le développement de phénomènes de résistance (245, 246). Parmi les mécanismes de résistance impliqués, plusieurs études ont démontré une induction des protéines de choc thermique qui modulent les voies apoptotiques, ce qui confère une protection vis-à-vis des agents de chimiothérapie (86, 247). En particulier, il a été démontré que l'inhibition de la protéine de choc thermique Hsp27 permettait de restaurer la sensibilité au bortézomib de cellules de lymphome humain (248).

E. Conclusion des études cliniques

En dépit de l'efficacité du bortézomib dans le myélome multiple, les modèles murins expérimentaux et les essais cliniques suggèrent que les tumeurs solides nécessitent la combinaison avec d'autres thérapies pour obtenir des réponses de longue durée. Les effets secondaires du bortézomib constituent également une limitation clinique non négligeable (thrombopénie et surtout neuropathies périphériques de grade 3 qui touchent 10 à 30% des patients et nécessitant des ajustements de dose) (249).

VI. Mécanismes d'action du bortézomib

A. Induction de l'apoptose

Les mécanismes antitumoraux du bortézomib sont multiples et dépendent certainement des caractéristiques spécifiques des types tumoraux ainsi que des lésions moléculaires les plus présentes dans chaque type de cancer. Le bortézomib ne cible pas uniquement les voies pro-apoptotiques mais il facilite également leur activation, en supprimant les fonctions de diverses voies anti-apoptotiques qui inhibent l'activité des caspases à plusieurs niveaux.

1. Augmentation de l'activité pro-apoptotique de p53

L'inhibition du protéasome en empêchant la dégradation de p53 conduit à une augmentation de son niveau d'expression. Ceci se traduit par une augmentation de la transcription des gènes cibles de p53 (*P21*, *BAX*, *NOXA*, *CD95...*), conduisant à un arrêt du cycle cellulaire et éventuellement à l'apoptose. Dans les cellules tumorales où la protéine p53 est dégradée de façon anarchique (amplification du gène *MDM2* par exemple), l'inhibition du protéasome restaure le statut p53.

Des mutations du gène *p53* sont fréquentes dans divers types tumoraux, ce qui résulte en un défaut d'expression de la protéine p53 ou une inactivation de son activité transcriptionnelle. Ces mutations participent à la fois à la progression tumorale et à la résistance aux traitements. Dans ce cas, l'inhibition du protéasome ne permet pas de restaurer l'activité transcriptionnelle de p53 et l'apoptose induite par le bortézomib passe par d'autres voies (154, 164, 250).

2. Accumulation des molécules inhibitrices du cycle p21 et p27

Le bortézomib peut provoquer un arrêt du cycle cellulaire, principalement attribué à la non-dégradation de p21 et de p27. L'accumulation inappropriée de ces régulateurs favorise la mort cellulaire programmée, particulièrement dans les cellules qui présentent une division incontrôlée (164). En outre, l'accumulation de ces inhibiteurs du cycle cellulaire peut conduire à des conflits de signalisation (par exemple, c-Myc et accumulation de p27), que la cellule va

résoudre en entrant en apoptose (154). Néanmoins, le bortézomib est également actif sur des cellules qui ne prolifèrent pas ou qui présentent une croissance très lente (69).

3. Accumulation des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2

L'inhibition de la dégradation des protéines par le bortézomib induit une stabilisation des protéines pro-apoptotiques appartenant à la famille Bcl-2, telles que Bax ou Bad, qui favorisent l'entrée en apoptose par la voie mitochondriale (154, 164).

4. Activation des SAPK (*Stress-Activated Protein Kinase*)

Un autre mécanisme par lequel les inhibiteurs de protéasome induisent l'apoptose est l'induction de MKP-1 (*Mitogen-activated protein Kinase Phosphatase-1*) qui déphosphoryle p44/p42MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*). La voie de signalisation p44/p42MAPK est particulièrement impliquée dans les signaux de croissance et de survie cellulaire (168, 251).

De plus, le bortézomib conduit à une accumulation intracellulaire de c-Jun qui induit l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de AP-1 et c-Myc. Ces deux facteurs conduisent respectivement à l'augmentation de l'expression de Fas et Fas ligand qui provoquent l'entrée des cellules en apoptose (69).

5. Suppression des effets anti-apoptotiques de NF-κB

Le facteur de transcription NF-κB¹ contrôle l'expression des cytokines et des molécules d'adhésion cellulaire impliquées dans les réponses immunes et inflammatoires. L'activation de NF-κB peut également inhiber le processus apoptotique *via* l'augmentation de l'expression de divers agents de survie (IAPs, TRAF1, TRAF2²...). La voie classique d'activation de NF-κB nécessite la dégradation de l'inhibiteur IκBα par le protéasome. Le bortézomib inhibe cette

¹ NF-κB : *Nuclear Factor kappa B*

² IAP : *Inhibitor of APoptosis* ; TRAF : *TNF Receptor-Associated Factor 1*

dégradation. Ainsi, le traitement par bortézomib induit la diminution de la localisation nucléaire et la réduction de la fixation de NF- κ B à l'ADN, supprimant ainsi les effets anti-apoptotiques de NF- κ B. Par ailleurs, NF- κ B participe à la chimio- et à la radio-résistance tumorale. Les inhibiteurs de protéasome peuvent donc sensibiliser les cellules à l'apoptose induite par les traitements. Ce mécanisme est le principal invoqué pour expliquer la potentialisation de la cytotoxicité de la radiothérapie et de diverses molécules de chimiothérapie par le bortézomib (154, 164).

6. Stress du reticulum endoplasmique

L'inhibition du protéasome conduit à une accumulation des polypeptides endommagés, et si les mécanismes cytoprotecteurs sont débordés, ceci peut conduire à l'induction de l'apoptose, *via* la voie de la caspase-12. Les cellules possédant des capacités sécrétrices importantes semblent particulièrement vulnérables vis-à-vis de ce type de mort cellulaire, ce qui explique en partie pourquoi les cellules de myélome multiple sont aussi sensibles aux effets du bortézomib. Des études récentes ont démontré que l'activation de la kinase JNK³ est nécessaire pour que ce type de réponse cellulaire ait lieu lors du traitement par inhibiteurs de protéasome (164, 173, 247).

B. Propriétés antiangiogéniques

Les effets antitumoraux du bortézomib sont également expliqués par sa capacité à réduire l'angiogenèse tumorale. Le bortézomib inhibe l'angiogenèse *via* l'inhibition de la production de facteurs de croissance (IL-8⁴, activateur du plasminogène, VEGF) et l'induction de l'apoptose des cellules endothéliales. Ceci induit une réduction de la densité microvasculaire au niveau tumoral. Ainsi, Hamner, et coll. ont montré que le bortézomib était susceptible de réduire à la fois la concentration de VEGF et la densité microvasculaire sur un modèle de neuroblastome humain xéno-greffé chez la souris (188). Des résultats similaires ont été rapportés sur d'autres modèles de tumeurs (181, 183, 187, 252). Il est également probable que

³ JNK : *c-Jun N terminal Kinase*.

⁴ IL-8 : InterLeukine 8.

l'inhibition de l'activation de NF- κ B induite par l'inhibition du protéasome participe à l'effet anti-angiogénique du bortézomib (69, 138, 164).

C. Autres mécanismes d'action proposés

1. Effet sur la réparation de l'ADN

Hideshima et coll., ont démontré que le bortézomib induit un clivage d'ATM et/ou de la sous-unité catalytique de la DNA-PK⁵ dans des cellules de myélome multiple, ce qui suggère que cette molécule interfère avec les voies de réparation de l'ADN. Ce phénomène présente sans doute une importance particulière lorsque le bortézomib est associé à des agents provoquant des lésions de l'ADN (253). En outre, Jacquemont et coll. ont montré que les cellules nécessitent une fonction protéasomique intacte pour effectuer correctement la réparation de l'ADN (254). Il semble que le traitement par un inhibiteur de protéasome (MG-132, bortézomib) retarde, sinon inhibe la réparation des dommages à l'ADN, notamment ceux induits par le cis-platine et les radiations ionisantes. Néanmoins, ces auteurs n'ont pas mis en évidence de variations du marquage γ H2AX (Histone H2AX) lors de l'association d'un inhibiteur de protéasome avec les radiations ionisantes, ce qui suggère que le système ubiquitine-protéasome n'intervient pas dans toutes les voies de réparation des dommages à l'ADN.

2. Effet sur le microenvironnement tumoral

Les inhibiteurs de protéasome affectent les tumeurs humaines non seulement en ciblant les cellules tumorales, mais aussi en influençant les cellules non malignes du microenvironnement tumoral (69). L'inhibition du protéasome permet d'atténuer les interactions entre les cellules cancéreuses et leur microenvironnement en modifiant l'expression des molécules d'adhésion cellulaire, des facteurs de croissance et des cytokines, notamment *via* l'inhibition de NF- κ B (167).

⁵ ATM : *Ataxia Telangiectasia Mutated* ; DNA-PK : *DNA-dependent Protein Kinase*.

Par ailleurs, contrairement aux agents de chimiothérapie classiques, il semble que les effets cytotoxiques du bortézomib soient plus importants sur les zones de cellules hypoxiques de la tumeur. En outre, des études ont démontré que certaines cellules (cellules de myélome, de carcinome du poumon et du côlon) sont plus sensibles au bortézomib quand les cellules sont cultivées en atmosphère pauvre en oxygène (193).

VII. Inhibition du protéasome et radiosensibilisation

A. Etudes précliniques

Plusieurs équipes ont étudié l'intérêt d'associer de façon concomitante un inhibiteur de protéasome et les radiations ionisantes (Tableau XV).

Tableau XV : Associations radiothérapie et inhibiteur de protéasome - Etudes *in vitro* et *in vivo*

Type tumoral	Modèle	Inhibiteur	Radiothérapie	Résultats	Références
Etudes <i>in vitro</i>	Lymphome de Hodgkin HD-My-Z	MG-132 50µM	1 fraction 2Gy ; 4Gy ; 6Gy ou 8Gy	Radiosensibilisation	Pajonk, et coll. (255)
	Lymphome HL-60 et LY-ar	MG-132 500nM Lactacyctine 2,25µM	1 fraction 5Gy	Radiosensibilisation	Kurland, et coll. (256)
	Carcinome prostatique DU-145 et PC-3	Saquinavir 50 et 60µM	1 fraction 2Gy ; 4Gy ; 6Gy ou 8Gy	Radiosensibilisation	Pajonk, et coll. (257)
	Mélanome A375, MeWo	MG-132 10µM	1 fraction 4Gy	Radiosensibilisation	Munshi, et coll. (258)
	Myélome MM1, RPMI 8226, JJN-3 et ARH-77	Bortézomib 1-80nM	1 fraction 2 à 12Gy	Radiosensibilisation	Goel, et coll. (259)
	Cancer de la prostate PC-3	MG-132 50µM	1 fraction 2Gy ; 4Gy ; 6Gy ou 8Gy	Radiosensibilisation	Pajonk, et coll. (260)
	Cancer de la prostate PC-3	MG132 0,5µM	1 fraction 2Gy ; 4Gy ou 6Gy.	Radiosensibilisation	Warren, et coll (261)
	Carcinome du côlon HCT116	AM114 1µM	1 fraction 2Gy	Radiosensibilisation	Achanta, et coll. (262)
	Carcinome du col de l'utérus SiHA	MG-132 50µM	1 fraction 2Gy ; 4Gy ; 6Gy ou 8Gy	Radiosensibilisation en conditions normoxiques Radorésistance en conditions hypoxiques	Pajonk, et coll. (263)
	Carcinome de la tête et du cou SQ20B	Bortézomib 10nM	1 fraction 2Gy	Radiosensibilisation	Weber, et coll. (264)
	Carcinome du col de l'utérus SiHA et HeLa	Bortezomib 10nM	1 fraction 2Gy ; 4Gy ; 6Gy ou 8Gy	Radiosensibilisation pour SiHa Pas de radiosensibilisation pour HeLa	Kamer, et coll. (265)

Etudes <i>in vivo</i>	Cancer colorectal LOVO	Bortézomib 1mg/kg	1 fraction 6Gy	Radiosensibilisation	Russo, et coll. (203)
	Cancer poumon non à petites cellules A549	du MG-132 à 2,5µg/g	10 fractions de 3Gy	Radiosensibilisation	Grimes, et coll. (266)
	Myélome multiple orthotopique 5TGM1	Bortézomib 0,5mg/kg	153-Sm-EDTMP (équivalent 22,5MBq)	Radiosensibilisation	Goel, et coll. (267)

Toutes les études, à l'exception de deux, rapportent une potentialisation des effets cytotoxiques de la radiothérapie par l'inhibiteur de protéasome utilisé. Une seule étude, réalisée sur des cellules de carcinome du col de l'utérus, démontre une augmentation de la radiorésistance des cellules après traitement par MG-132, mais uniquement en condition d'hypoxie (263). Seules 5 études, parmi les 14 recensées, ont évaluées les propriétés radiosensibilisantes du bortézomib et concluent toutes à une augmentation de l'efficacité antitumorale des radiations ionisantes par le bortézomib. Seuls, Kamer, et coll. rapportent une absence de radiopotentialisation par le bortézomib pour la lignée de carcinome de col de l'utérus HeLa (265). Il est également important de noter que seulement 3 études ont été réalisées *in vivo*.

B. Etudes cliniques

Une seule étude dans la littérature rapporte l'efficacité d'une approche concomitante bortézomib-radiothérapie. Van Waes, et coll. (268) ont étudié la faisabilité d'administrer du bortézomib à 7 patients atteints de carcinomes récurrents de la tête et du cou recevant une irradiation quotidienne. Ce travail a permis de montrer que la dose maximale tolérée du bortézomib dans ce type d'association est inférieure à 0,6 mg/m² (administré 2 fois par semaine pendant 6 semaines). En outre, les auteurs démontrent une diminution des gènes cibles de NF-κB au niveau tumoral associée à une réduction de la tumeur pour 3 patients et concluent sur l'intérêt de poursuivre les études d'association bortézomib-radiothérapie.

Plusieurs essais cliniques⁶ associant bortézomib et radiothérapie sont actuellement en cours dans diverses localisations tumorales (cancer colorectal, myélome multiple, cancer de la tête et du cou, tumeur cérébrale, cancer du col de l'utérus, cancer du poumon non à petites cellules) (66).

Enfin, une étude sur une cohorte de patients atteints du SIDA et ayant développé un lymphome primitif du système nerveux central a également apporté des arguments confortant l'intérêt d'associer inhibiteur de protéasome et radiothérapie (269). En effet, pour ces patients, un protocole dit HAART (*Highly Active AntiRetroviral Therapy*) a été évalué en association avec une irradiation crânienne. Le protocole HAART consistait en l'administration d'au moins deux analogues nucléosidiques avec un inhibiteur de protéase ou un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse. Cette étude démontre une augmentation très importante de la survie pour les patients recevant un protocole HAART associé à l'irradiation crânienne par rapport à ceux recevant uniquement l'irradiation. *A posteriori*, ce bénéfice de l'association a été attribué aux propriétés inhibitrices du protéasome des anti-rétroviraux (257).

C. Mécanismes de radiosensibilisation

1. Généralités

Les études précliniques et cliniques rapportées dans la littérature ont clairement démontré les propriétés radiosensibilisantes des inhibiteurs de protéasome. En revanche, les processus sous-tendants ces propriétés restent mal décrits. De part la place centrale que le protéasome occupe au sein de la signalisation cellulaire, plusieurs mécanismes peuvent être évoqués (Tableau XVI).

⁶ Essais en cours au 1 juillet 2007

Tableau XVI : Mécanismes potentiellement impliqués dans les phénomènes de radiosensibilisation par les inhibiteurs de protéasome (168).

Cible	Séquelles provoquées par l'inhibition du protéasome	Contribution à l'effet antitumoral
NF-κB	Inhibition de la translocation nucléaire de NF-κB	Inhibition de la transcription des gènes antiapoptotiques et pro-prolifératifs sous la dépendance de NF-κB
p44/42 MAPK	Inhibition de l'activation de p44/42	Réduction des signaux de survie régulés par p44/42
Réponse au stress génotoxique	Diminution de la transcription de la machinerie de réparation de l'ADN	Sensibilisation des tumeurs aux agents provoquant des dommages à l'ADN

NF-κB : *Nuclear Factor kappa B* ; MAPK : *Mitogen Activated Protein Kinase*.

Le principal élément impliqué pour expliquer les résultats des études précliniques est la diminution et/ou la suppression de l'activation radio-induite du facteur de transcription NF-κB

2. Le facteur de transcription NF-κB

a. Structure

NF-κB est un facteur de transcription, décrit pour la première fois en 1986 comme un complexe multiprotéique appartenant à la famille Rel (Figure 18). Les 5 protéines membres de cette famille, p65 (ou RelA), c-Rel, RelB, p52, et p50 sont caractérisées par la présence d'un domaine conservé, le domaine REL constitué de 300 acides aminés, et responsable des propriétés de liaison à l'ADN, de dimérisation et de localisation nucléaire (NLS : *Nuclear Localisation Signal*).

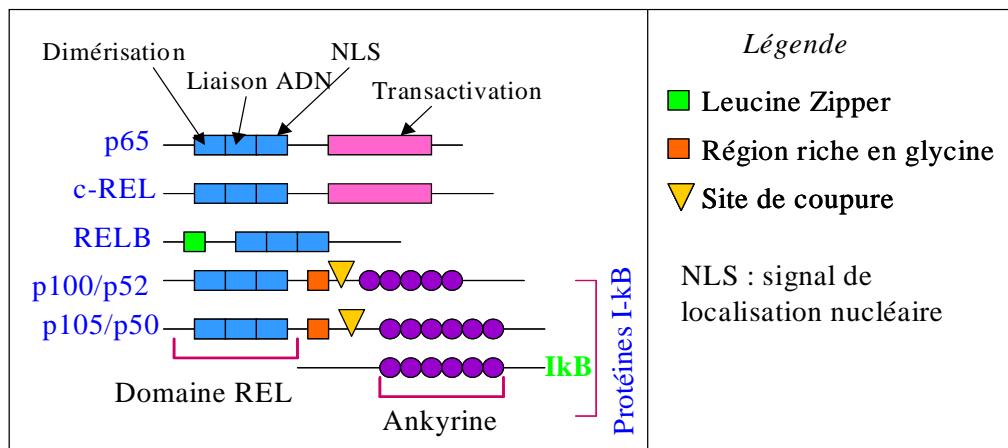


Figure 18 : Représentation schématique des protéines appartenant à la famille Rel.

La famille des protéines Rel est divisée en deux classes, qui se distinguent par leur mode de synthèse et leurs propriétés de transactivation. La première classe est composée de p65 (RelA), RelB et c-Rel qui sont synthétisés directement sous une forme mature (270). La deuxième classe est constituée de p105 et p100, qui sont des précurseurs comprenant un domaine d'homologie REL en N terminal, et un domaine composé de la répétition de séquences Ankyrine à l'extrémité C terminale. Cette région sera clivée pour libérer la forme mature (p52 et p50 respectivement).

Les protéines de la famille Rel sont capables de former plusieurs complexes d'homodimères ou d'hétérodimères possédant ou non des capacités de transactivation (271). La forme la plus classique de NF- κ B est l'hétérodimère p50-p65, qui lie l'ADN avec une haute affinité et qui possède un domaine de transactivation (272).

b. Activation de NF- κ B

La figure 19 présente la voie d'activation classique du facteur de transcription NF- κ B sous l'effet d'un stress (facteurs de croissance, radiations ionisantes, cytokines pro-inflammatoires...).

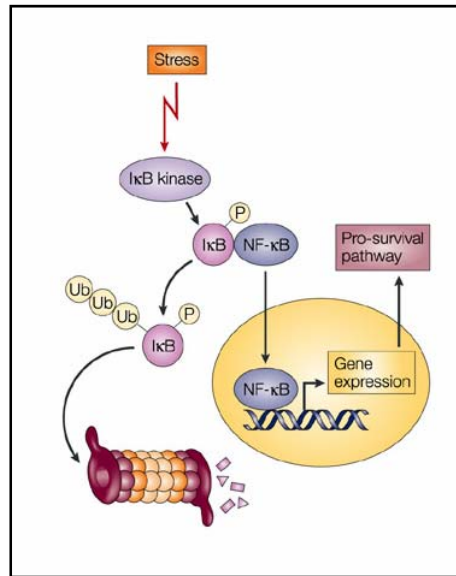


Figure 19 : Voie d'activation classique de NF- κ B. Adapté d'après Adams, et coll. (96)

A l'état basal, NF- κ B est localisé dans le cytoplasme sous forme latente et est complexé à un membre de la famille I- κ B. La plupart des stimuli activateurs de NF- κ B (comme le TNF α , l'IL-1 ou les radiations ionisantes) conduisent à l'activation d'un complexe multiprotéique IKK (*I κ B Kinases*). Le complexe IKK phosphoryle I κ B au niveau de deux résidus sérines (Ser 32 et Ser 36 pour I- κ B α) (273). Cette double phosphorylation est ensuite reconnue par une enzyme E3 ubiquitine ligase menant à l'ubiquitinylation et la dégradation de I κ B par le protéasome. Une fois I κ B dégradé, NF- κ B est libre et est transloqué dans le noyau, où il reconnaît un motif spécifique de liaison à l'ADN sur la région promotrice de nombreux gènes (motif κ B). Le gène codant pour I κ B fait partie des premiers gènes à être transcrits par NF- κ B, pouvant ainsi moduler son activation (273). NF- κ B induit l'expression de nombreux

gènes clés de l'inflammation, de la réponse immunitaire, de la croissance cellulaire et de l'apoptose (271, 272, 274).

c. NF- κ B et réponse à la radiothérapie

Le facteur de transcription NF- κ B est décrit comme étant induit par les radiations ionisantes dans les cellules de Mammifères lorsque celles-ci sont soumises à des doses cliniques de radiothérapie (2 Gy). Ceci conduit à la transcription de nombreux gènes cibles impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire, ce qui participe à la radiorésistance tumorale (275). L'activation de NF- κ B étant sous la dépendance directe du protéasome, *via* la dégradation de I κ B, il est légitime de supposer que la radiopotentialisation par les inhibiteurs de protéasome implique cette voie particulière.

Ceci a été mis en évidence dans plusieurs études. Ainsi, Russo, et coll. (203) ont montré que le traitement par bortézomib supprimait l'induction radio-induite de NF- κ B sur un modèle de carcinome colorectal et que cette inhibition conduisait à la radiopotentialisation obtenue sur ce même modèle. Toutefois, les études actuellement disponibles ne rapportent pas systématiquement l'implication de NF- κ B dans la radiosensibilisation par les inhibiteurs de protéasome. En effet, les travaux de Pajonk, et coll. (255), Kurland, et coll. (256) et Kamer, et coll. (265) sur divers types tumoraux ont montré que l'inhibition de NF- κ B par un inhibiteur de protéasome n'est pas indispensable pour induire une radiopotentialisation, qui peut alors s'expliquer par d'autres mécanismes.

VIII. Conclusions

Le bortézomib appartient à une classe récente d'agents de chimiothérapie anticancéreuse, les inhibiteurs de protéasome. Cette molécule est un inhibiteur réversible de l'activité chymotrypsine-like du protéasome et présente une sélectivité d'action relative vis-à-vis des cellules tumorales, dont elle provoque l'entrée en apoptose. Le mécanisme d'action du bortézomib est complexe et implique différentes voies de signalisation, dont l'importance et le degré d'implication varie suivant le type cellulaire.

Les premiers résultats cliniques du bortézomib indiquent un potentiel important dans le cadre du traitement des hémopathies malignes (myélome multiple, lymphome du manteau). Le bortézomib possède depuis 2005 une AMM pour le traitement des patients atteints de myélome multiple en rechute. Pour les tumeurs solides, le bortézomib ne semble pas présenter d'intérêt lorsqu'il est administré seul, mais son association avec d'autres agents de chimiothérapie permet d'améliorer l'efficacité antitumorale de ces agents.

Le bortézomib a également démontré des propriétés radiosensibilisantes sur divers types tumoraux lors d'études précliniques menées aussi bien *in vitro* que *in vivo*, et des études cliniques sont actuellement en cours. Les mécanismes à l'origine de cette radiosensibilisation ne sont pas clairement identifiés mais pourraient impliquer le facteur de transcription NF- κ B.

TRAVAIL EXPERIMENTAL

Chapitre 5 : Objectifs

Chapitre 5 : Objectifs

Les gliomes malins sont des tumeurs cérébrales primitives particulièrement agressives. Actuellement, la survie des patients atteints des formes les plus graves est seulement de 15 mois. Dans le traitement de ce type de tumeurs, les associations concomitantes radio-chimiothérapie ont démontré leur intérêt. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail.

Le bortézomib appartient à une nouvelle classe d'agents de chimiothérapie : les inhibiteurs de protéasome. Ces molécules ont clairement démontré leurs propriétés radiosensibilisantes sur divers types de tumeurs, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Le premier objectif de notre travail a été d'évaluer sur deux modèles de gliome malin xénotransplantés chez la souris nude la possibilité d'améliorer l'efficacité antitumorale de la radiothérapie par l'administration concomitante de bortézomib. Un des paramètres fondamentaux de nos travaux est de mettre en œuvre des schémas de radiothérapie et de chimiothérapie les plus proches possibles de la pratique clinique. En effet, l'utilisation de schémas thérapeutiques respectant le fractionnement et les doses applicables en clinique sont très rares, sinon inexistantes, dans la littérature et conduisent à s'interroger sur la prédictivité des études précliniques réalisées. Nous avons donc comparé deux modes de fractionnement des traitements : d'une part, nous avons administré la radiothérapie et la chimiothérapie en respectant les doses et le fractionnement utilisé chez l'Homme et d'autre part, nous avons délivré les traitements à la même dose totale à raison d'une administration par semaine.

Nous avons ensuite évalué les effets cellulaires et moléculaires de nos différents traitements. Nous avons d'abord vérifié si les effets observés lors des études de radiopotentialisation

pouvaient être expliqués au niveau de l'apoptose et de la prolifération cellulaire. Nous nous sommes ensuite intéressés aux effets du bortézomib sur sa cible, à savoir l'activité chymotrypsine-like du protéasome. Par ailleurs, le seul mécanisme identifié comme responsable de la synergie d'action entre radiations ionisantes et inhibiteur de protéasome est le blocage de l'activation du facteur de transcription NF- κ B, connu pour participer à la radiorésistance tumorale. Nous avons donc évalué les effets de la radiothérapie seule ou associée au bortézomib sur l'état d'activation de NF- κ B afin de déterminer si ce facteur pouvait expliquer les effets observés au cours des études de radiopotentialisation.

Chapitre 6 : Matériel et méthodes

Chapitre 6 : Matériel et méthodes

I. Xénogreffes hétérotopiques de gliomes malins

A. Les souris *nude*

Les animaux utilisés sont des souris *nude* femelles (*Swiss-nu/nu* Janvier, Le Genest St Isle, France) âgées de six à huit semaines. Les animaux sont athymiques donc déficients en lymphocytes T, ce qui leur permet d'être le support de greffes de tumeurs humaines. L'hébergement et les expérimentations animales sont réalisés en conformité avec la législation en vigueur (directive 86/609/CEE et décret n°87-848).

B. La xénogreffe tumorale

Les lignées tumorales utilisées sont deux lignées de gliomes de grade III :

- la lignée U87-MG (astrocytome anaplasique, HTB-14 *American Type Culture Collection*).
- et la lignée TCG3, établie au laboratoire après récupération d'un fragment de pièce opératoire (patiente de 58 ans opérée d'un oligoastrocytome anaplasique dans le Service de Neurochirurgie du CHU de Nancy).

Les principales altérations génétiques décrites dans les gliomes connues pour les deux lignées étudiées sont regroupées dans le tableau XVII (44, 276).

Tableau XVII : Principales altérations génétiques des lignées TCG3 et U87

	1p	1q	19q	9p	10p	10q	TP53	PTEN	EGFR	P16 / CDKN2A
TCG3	N	N	N	N	N	N	Mut	N	N	N
U87	D	N	D	LOH	N	N	N	D	N	D

N : Normal ; Mut : Mutation ; D : Déleté, LOH : Loss Of Heterozygosity (perte d'hétérozygotie)

1. Procédure microchirurgicale

Les souris receveuses bénéficient d'une anesthésie générale qui consiste en l'injection intrapéritonéale de xylazine (Rompun[®] 2%, Bayer Pharma, Puteaux, France) et de kétamine (Kétamine[®], Panpharma, Fougère, France) à des doses respectives de 8 mg/kg et de 90 mg/kg. Ceci permet d'obtenir une anesthésie d'environ 30 minutes.

Une souris "porte greffe" est sacrifiée lorsque le volume de la tumeur qu'elle porte atteint 1000 mm³. Le tissu tumoral prélevé est placé dans du sérum physiologique (NaCl 0,9 %) où il est coupé en fragments de 1 à 2 mm de diamètre et de 0,5 à 1 mm d'épaisseur. Ceux-ci constituent les greffons qui sont aussitôt implantés chez les souris receveuses après réalisation d'une incision au niveau du pli inguinal. La peau est suturée à l'aide de fil de suture (Prolène 5/0, Ethicon, Issy les Moulineaux, France). Les animaux sont ensuite surveillés jusqu'à leur réveil.

2. Suivi des tumeurs

Le volume tumoral est mesuré trois fois par semaine. A l'aide d'un pied à coulisse, deux mesures sont réalisées sur chaque tumeur : le grand diamètre (D) et le petit diamètre (d) afin de calculer le volume par la formule suivante :

$$V = (D \times d^2)/2.$$

II. Traitements et prélèvements tumoraux

A. Groupes de traitement

Les souris porteuses de tumeurs sont réparties dans les groupes suivants :

- CTRL : souris recevant des injections de sérum physiologique en i.v.
- Bortézomib (BTZ) : dose totale 1,8 mg/kg (administration i.v.)
- Radiothérapie (RT) : dose totale de 20 Gy
- BTZ + RT : association des deux traitements précédents

Le traitement débute lorsque les tumeurs ont atteint un volume de $250 \pm 50 \text{ mm}^3$ (J0) et est appliqué pendant 2 semaines. Pour le groupe BTZ + RT, le BTZ est administré 2 à 4h avant la radiothérapie. Chaque traitement a été administré selon 2 schémas (Figure 20) :

- **schéma dit "non fractionné"** : le BTZ est administré à raison d'une injection i.v. par semaine à la dose de 0,90 mg/kg. La radiothérapie est délivrée une fois par semaine à la dose de 10 Gy.
- **schéma dit "fractionné"** : le BTZ est administré à raison de 2 injections i.v. par semaine (J0 et J3) à la dose de 0,45 mg/kg. Ce traitement correspond au schéma indiqué chez l'Homme dans le traitement du myélome multiple en rechute (167). La radiothérapie est délivrée 5 jours sur 7 à raison de 2 Gy/jour, selon les conditions classiques de fractionnement pratiquées en clinique humaine.

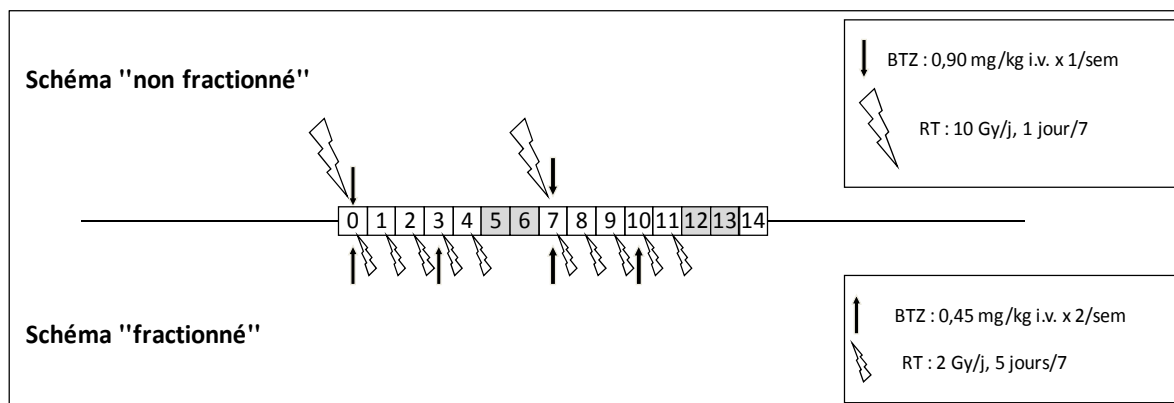


Figure 20 : Schéma thérapeutique.

L'efficacité antitumorale est appréciée après deux semaines de traitement consécutives. Les effets moléculaires et cellulaires des traitements sont évalués à l'issue d'une semaine de traitement.

B. La radiothérapie

La radiothérapie est réalisée au Centre Alexis Vautrin sous la responsabilité du Docteur V. Bernier-Chastagner, avec un appareil de radiothérapie de contact (Pantak Therapax[®] SXT 150 Pantak Medical Systems, AGFA NDT, Limonest, France). Cet appareil permet de réaliser une radiothérapie externe qui distribue des photons X grâce à un collimateur de 1,5 cm de diamètre. La souris est anesthésiée puis attachée au support par ses quatre membres, en décubitus dorsal, à l'aide de rubans adhésifs avant la séance de radiothérapie (Figure 21).



Figure 21 : Irradiation d'une tumeur par l'appareil de radiothérapie de contact.

C. Le bortézomib

Le bortézomib (BTZ, Velcade[®]) est le seul inhibiteur de protéasome commercialisé actuellement. Dans notre étude, le bortézomib a été acheté auprès du laboratoire Janssen-Cilag (Issy les Moulineaux, France). Après dissolution dans du sérum physiologique, le bortézomib est injecté dans la veine latérale de la queue de la souris.

D. Les prélèvements

Les prélèvements tumoraux sont effectués à 2 h ou 24 h après la fin de la première semaine de traitement pour tous les groupes. Les tumeurs sont excisées et sont coupées en deux : la première moitié est fixée dans une solution tamponnée de formaldéhyde 10% (V/V pH 7,4) et sont utilisées pour les analyses immunohistochimiques. La seconde moitié est immédiatement congelée à -80°C .

E. Extraction et dosage des protéines totales

Les tumeurs sont décongelées sur glace, pesées puis homogénéisées dans du tampon de lyse (composition différente en fonction de l'expérience qui fait suite).

- Pour mesurer l'activité chymotrypsine-like du protéasome, les tumeurs sont homogénéisées à l'aide d'un broyeur de type Ultra Turrax[®] (Imlab, Lille, France) dans du tampon de lyse (TRIS HCl 50 mM ; DTT 2 mM ; MgCl_2 5 mM ; Sucrose 250 mM ; dH_2O qsp) et afin d'éliminer les débris cellulaires, le broyat est centrifugé à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C .

- Pour la mesure de l'expression des formes actives de p65 et de p50, l'homogénéisation est réalisée à l'aide d'un "piston pellet" dans du "Complete Lysis Buffer" (fourni dans le kit TransAM p50, Active Motif Europe, Rixensart, Belgique), puis les tumeurs sont incubées durant 30 minutes sur glace. Le broyat est ensuite centrifugé à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C .

Dans les deux cas, la concentration en protéines des tumeurs est déterminée à l'aide du kit Bio Rad Protein DCII (Bio Rad, Ivry-sur-Seine, France). Ce kit est basé sur la technique colorimétrique de Lowry et se réalise en plaques de 96 puits. Selon les instructions du fabricant, 5 μL de chaque échantillon sont déposés dans chaque puits. La densité optique est lue au lecteur de plaques à 690 nm (Multiskan MCC/340, LabSystem, Cergy-Pontoise, France). Une gamme d'étalonnage élaborée avec de la BSA (*Bovin Serum Albumin*) permet de calculer la concentration en protéines de chaque échantillon.

III. Distribution des cellules dans le cycle cellulaire

L'étude de la distribution des cellules dans le cycle cellulaire est basée sur la mesure du contenu cellulaire en ADN après marquage à l'iodure de propidium. L'iodure de propidium est un intercalant de l'ADN qui possède des propriétés de fluorescence. Il est incorporé de façon proportionnelle à la quantité d'ADN présente dans la cellule. Lors du passage dans le cytomètre, les cellules passent une à une devant un laser qui excite l'iodure de propidium. La fluorescence émise est proportionnelle à la quantité d'ADN présente dans les cellules. Tous les réactifs, sauf mention contraire, ont été fournis par Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France).

A. Dissociation des tumeurs

Les fragments tumoraux sont décongelés dans du PBS¹ glucosé (1 mg de tumeur dans 1 mL de PBS glucosé [NaCl 140 mM ; KCl 8,4 mM ; Na₂HPO₄, 12 H₂O 2,5 mM ; KH₂PO₄ 1,1 mM ; Glucose 6,1 mM ; CaCl₂ 0,13 mM ; MgSO₄, 7 H₂O 1,2 mM ; ajusté à pH 7,6]) puis dissociés à l'aide d'un potter de Thomas. L'ensemble est centrifugé à 300 g pendant 10 minutes à température ambiante. Le culot est remis en suspension dans 1 mL de tampon citrate (trisodium citrate, 2H₂O 3,4 mM ; spermine tetrahydrochloride 1,5 mM ; Tris base 0,5 mM ; supplémenté par 1 mL/L de Nonidet 40 et ajusté à pH 7,6). Les échantillons sont ensuite traités avec une solution de trypsine (0,03 mg/mL - *Trypsin type IX-S from porcine pancreas*) pendant 10 minutes à température ambiante et sous agitation. Puis les échantillons sont incubés avec une solution de RNase (0,1 mg/mL - *Ribonuclease A type III-3 from bovine pancreas*) et d'inhibiteur de la trypsine (0,5 mg/mL - *Trypsin inhibitor type II-O from chicken egg white*) pendant 10 minutes à température ambiante sous agitation.

¹ PBS : *Phosphate Buffered Saline*

B. Marquage à l'iodure de propidium et analyse en cytométrie en flux

Les échantillons sont incubés avec une solution d'iodure de propidium (0,4 mg/mL) pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante puis centrifuger à 500 g pendant 10 minutes. Le culot est repris dans du tampon citrate et filtré sur toile (diamètre des pores 30 µm). Le filtrat est analysé à l'aide d'un cytomètre en flux de type FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Allemagne) équipé des logiciels CellQuest et ModFit LT.

IV. Détection immunohistochimique de la caspase-3 clivée et de l'antigène de prolifération Ki-67

Ces techniques, effectuées sur des coupes histologiques, ont pour but de mettre en évidence les cellules en apoptose et les cellules en prolifération dans les tumeurs, grâce à des anticorps primaires, respectivement, anti-caspase 3 clivée (Anticorps polyclonal de lapin, BD Biosciences, Belgique) et anti-Ki-67 (Anticorps monoclonal de lapin, Lab Vision, Etats-Unis). Elles ont été réalisées dans le service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU Brabois dirigé par le Pr. F. Plénat et ont été préalablement décrites (277, 278).

A. Préparation des échantillons

Après fixation des tumeurs dans du formaldéhyde 10% (V/V) pendant 24h puis inclusion en paraffine à l'aide d'un automate de type V.I.PTM (Sakura, Sysmex, Suisse), des coupes de 5 µm d'épaisseur sont effectuées à l'aide un microtome (Leica RM 2135, Leica Microsystèmes SAS, France) et déposées sur des lames. Celles-ci subissent un déparaffinage par immersion dans différents bains successifs (toluène, alcool absolu, alcool à 95°, eau osmosée). Puis une hydrolyse par la chaleur des liaisons établies entre le formaldéhyde et les protéines de l'échantillon est réalisée, afin de démasquer des sites antigéniques. Pour cela, nous utilisons un autoclave (2100 Retriever, PickCell Laboratories, Pays Bas), contenant un tampon EDTA 10 mM, pH 8.

B. Hybridation avec les anticorps

Après lavage à l'eau osmosée, l'anticorps primaire (anti-caspase 3 clivée ou anti-Ki-67 dilué respectivement au 1/1000 et au 1/100) est déposé sur les coupes pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, les lames sont rincées au PBS-Tween 1%. L'anticorps secondaire (anti-IgG de lapin biotinylé dilué au 1/200), est déposé et laissé en contact (1h, température ambiante). Après rinçage (PBS-Tween), les peroxydases endogènes sont éliminées par exposition des coupes au peroxyde d'hydrogène 6 % (20 min, température ambiante).

C. Révélation

L'étape de révélation est basée sur l'interaction entre la biotine, fixée sur l'anticorps secondaire, et un complexe streptavidine-peroxydase [(DakoCytomation, France) dilué au 1/200 dans du PBS-Tween]. L'ensemble est incubé pendant 1h à température ambiante puis la révélation s'achève par la mise en contact d'un substrat de la peroxydase contenu dans le kit NovaRED™ (Vector Laboratories, Burlingame, Etats-Unis).

Une contre-coloration des noyaux en bleu violacé est réalisée par immersion des coupes dans un bain d'hématoxyline. Après un rinçage à l'eau courante, les lames sont bleuies en les mettant en contact avec du TRIS pH 8,2 puis rincées à l'eau courante et à l'eau osmosée.

Après déshydratation par passage dans des bains successifs (alcool à 95°, alcool absolu, toluène), les lames sont montées grâce au liquide de montage Eukitt.

Le nombre de cellules apoptotiques ou en prolifération (colorées en brun-rouge dans les deux cas) est évalué par comptage des cellules immunomarquées au grossissement x1000 en immersion. Dans les deux cas, les photographies présentées ont été réalisées à l'aide d'un microscope AxioskopII Zeiss (Paris, France) avec la précieuse collaboration de Pr. F. Plénat.

V. Evaluation de l'activité chymotrypsine-like du protéasome

Cette technique consiste en la mise en œuvre d'un substrat spécifique (*Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-trifluoromethylcoumarin*, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) qui, lorsqu'il est clivé par le protéasome, libère le dérivé coumarinique émettant un signal de fluorescence à 460 nm lorsqu'il est excité à 380 nm.

50 µg de protéines totales ainsi que 10 nmoles de substrat sont déposés dans un tube eppendorf et le volume réactionnel est ajusté à 100 µL par ajout de tampon de lyse. Les échantillons sont ensuite incubés 2h à 37°C à l'obscurité, puis la réaction est stoppée par ajout de 1 mL de SDS à 1%.

L'intensité de la fluorescence après excitation à 380 nm est lue à l'aide d'un spectrofluorimètre Safas à 460 nm (Monaco).

VI. Expression des formes actives de p65 et de p50

A. Principe

L'expression des formes actives de p65 et de p50 est évaluée à l'aide des kits TransAM correspondants (Active Motif Europe, Rixensart, Belgique). Ces kits contiennent une plaque de 96 puits dans lesquels sont immobilisés des oligonucléotides contenant la séquence consensus 5' GGGACTTTCC 3' qui est reconnue et liée spécifiquement par la forme active de p65 ou de p50. Ainsi, si p65 est activée, cette protéine est liée à sa séquence consensus et devient donc détectable par réaction antigénique et quantifiable par réaction chromogénique.

NB : Les kits contiennent plusieurs réactifs : Complete Lysis Buffer, Complete Binding Buffer, et Antibody Binding Buffer respectivement appelé, pour plus de simplicité, tampon de lyse, tampon de liaison et tampon de liaison à l'anticorps.

B. Fixation de p65 ou de p50 à sa séquence consensus

Afin d'optimiser la liaison, on ajoute dans chaque puits du tampon de liaison. Puis 20 µg de protéines totales sont déposés à la concentration de 1 µg/µL dans chaque puits. Le kit contient également un extrait nucléaire de cellules Jurkat traité par TPA et CI (13-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate et calcium ionophore A23187) qui sert de contrôle positif. La spécificité de la liaison entre les sous-unités de NF-κB et leur séquence consensus est vérifiée par dépôt de séquence d'oligonucléotides mutées et sauvages. L'incubation est réalisée durant 1 h à température ambiante, puis les puits sont lavés trois fois avec la solution de lavage.

C. Liaison aux anticorps

L'anticorps primaire (anti p65 NF-κB ou anti p50 NF-κB IgG de lapin dirigé contre p65 ou p50 humain), dilué au 1/1000 dans le tampon de liaison à l'anticorps, est déposé dans les puits. La plaque est incubée 1 h à température ambiante, puis est lavée à trois reprises comme précédemment.

L'anticorps secondaire (anticorps de chèvre dirigé contre les IgG de lapin), conjugué à l'enzyme HRP (*Horse Radish Peroxydase*), dilué au 1/1000 dans le tampon de liaison à l'anticorps, est déposé dans les mêmes conditions que l'anticorps primaire. Les puits sont lavés ensuite quatre fois.

D. Réaction colorimétrique

La solution de développement (3,3',5,5' tetramethylbenzidine dans DMSO 1 %) est ajoutée dans chaque puits, et l'incubation est réalisée durant 4 minutes à température ambiante, selon les recommandations du fabricant.

La réaction est ensuite arrêtée par dépôt de la solution d'arrêt (H₂SO₄ 0,5 M) et la densité optique de chaque puits est lue au lecteur de plaques à 450 nm.

VII. Expression des gènes cibles de NF-κB par RT-PCR² quantitative

L'étude de l'expression des gènes cibles de NF-κB (TNFα et IL-6) est réalisée par RT-PCR quantitative pour la lignée TCG3.

A. Extraction des ARN totaux

1. Procédure d'extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits selon la méthode de Chomczynski, *et coll.* (279), à l'aide du réactif TRIzol[®] (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Le TRIzol[®] maintient l'intégrité des ARN lors de la dissociation des différents composants cellulaires.

Un fragment tumoral (environ 50 mg) est mis en contact avec 1 mL de réactif TRIzol[®] et est broyé à l'aide d'un "piston pellet". Les échantillons sont ensuite incubés pendant 15 minutes à 4°C.

Après récupération du surnageant, 200 µL de chloroforme (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) sont ajoutés. Le mélange surnageant/chloroforme est agité vigoureusement (environ 15 secondes), puis centrifugé (12000 g pendant 15 minutes à 4°C). Deux phases, une aqueuse et une organique, se forment : les ARN extraits se retrouvent exclusivement dans la phase aqueuse.

La phase aqueuse est récupérée et est supplémentée avec 0,5 mL d'isopropanol (VWR, Fontenay-sous-Bois, France), afin de précipiter les ARN. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 10 minutes à température ambiante, puis centrifugés à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C.

Le culot d'ARN est lavé par addition de 1 mL d'éthanol à 75 % (VWR, Fontenay-sous-Bois, France), puis centrifugé à 7500 g pendant 5 minutes à 4°C. L'éthanol est éliminé par aspiration puis par évaporation en plaçant les tubes ouverts à 37°C pendant quelques minutes.

² RT-PCR : *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*

Le culot est ensuite resuspendu dans 50 μL d'eau *RNase DNase free* (Eppendorf, Hambourg, Allemagne).

2. Vérification de la qualité et quantification des ARN extraits

Les échantillons sont dosés par spectrophotométrie à 260 nm (absorbance des acides nucléiques) et 280 nm (absorbance des protéines) (Biophotomètre Eppendorf, Hambourg, Allemagne). La concentration en ARN (en $\mu\text{g/mL}$) est donnée par la formule suivante :

$$[\text{ARN}] = A_{260} \times D \times 40$$

où D est le facteur de dilution de l'échantillon.

Le rapport A_{260}/A_{280} témoigne de la pureté des extraits d'ARN vis-à-vis des protéines. La préparation est considérée de bonne qualité si $R > 1,8$.

B. Transcription inverse (RT)

1. Traitement des échantillons à la DNase

Afin d'éliminer d'éventuelles contaminations par de l'ADN génomique lors de l'extraction des ARN totaux, chaque échantillon d'ARN totaux est traité à la DNase I (1 U/ μL , Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne). Les échantillons sont ensuite incubés 1h à 37°C puis la DNase est inactivée par chauffage pendant 10 minutes à 65°C.

2. Transcription inverse (RT)

Cette réaction permet d'obtenir un ADN simple brin complémentaire (ADNc) de l'ARN à l'aide d'amorces et d'une enzyme, la transcriptase inverse. Cette enzyme présente une activité ADN-polymérase ARN dépendante ainsi qu'une activité exo-ribonucléasique hybride dépendante permettant la dégradation des ARN contenus dans les hybrides ADN-ARN. La

synthèse du brin d'ADNc est réalisée à l'aide du kit iScript™ cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, Ivry-sur-Seine, France) selon les recommandations du fournisseur. L'ADNc est obtenu à partir de 1 µg d'ARN en utilisant un mélange d'amorces à fixation aléatoire et d'amorces oligodT. Ce mélange d'amorces permet d'obtenir la rétro-transcription de l'ensemble des ARN. La réaction est réalisée dans un thermocycleur (2720 Thermal Cycle Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) selon les étapes du tableau XVIII.

Tableau XVIII: Etapes de la réaction de transcription inverse

Etape	Température (°C)	Temps (minutes)	
1	30	5	Activation de l'enzyme
2	42	30	Transcription inverse
3	85	5	Dénaturation des ARN non reverse transcrits et inhibition de l'enzyme

C. Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (PCRq)

1. Principe

La PCR correspond à une amplification d'un fragment d'ADN spécifique délimité par des amorces. A la fin de la réaction de PCR, la quantité d'ADN de la séquence cible a augmentée d'un facteur 2^n (n étant le nombre de cycle effectués). La PCRq permet de mesurer en temps réel l'amplification de cet ADN. L'appareil utilisé pour réaliser cette technique est le LightCycler (Roche, Mannheim, Allemagne), thermocycleur rapide à air pulsé piloté par un ordinateur qui permet l'acquisition et le suivi en temps réel des données ainsi que leur traitement. La quantification de l'ADN cible se fait grâce à un agent fluorophore s'intercalant dans l'ADN double brin, le SYBRGreen. La réaction de PCR se déroule en trois étapes : dénaturation, hybridation et élongation. Au début de la réaction, le mélange réactionnel contient de l'ADN dénaturé, les amorces et le fluorophore non lié. Après hybridation des amorces, le fluorophore se lie à l'ADN double brin, cette liaison à l'ADN se traduit par une augmentation de la fluorescence. Pendant l'étape d'élongation, le nombre de molécules de fluorophore lié à l'ADN synthétisé augmente, ce qui se traduit par une augmentation de la fluorescence. La fluorescence est mesurée à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle.

Le SYBRGreen étant un agent intercalant non spécifique, la spécificité des fragments d'ADNc obtenus après amplification (amplicon) est vérifiée en réalisant une courbe de fusion. La température est élevée progressivement de 60°C à 95°C avec une lecture continue de la fluorescence. Quand la température augmente, l'ADN double brin se dissocie, entraînant la libération du SYBRGreen dans le milieu et une diminution progressive de la fluorescence. Lorsque 50 % de l'ADN double brin est dissocié, la fluorescence chute brutalement, c'est à cette température que correspond la température de fusion (T_m) du produit synthétisé. En traçant la courbe dérivée première négative de la fluorescence émise en fonction de la température, nous obtenons un maximum qui correspond à la température de fusion. Cette température est caractéristique d'un amplicon donné.

2. Réalisation de la réaction

a. Choix des amorces

Pour notre étude, nous nous sommes intéressés à l'expression des gènes codant pour le TNF α et pour l'IL-6 (Tableau XIX). Afin de pouvoir comparer les différents échantillons entre eux, nous avons étudié l'expression d'un "gène de ménage", dont le taux d'expression reste constant. Dans nos expérimentations, nous avons choisi le gène codant pour la protéine β -actine.

Tableau XIX : Caractéristiques des différents couples d'amorces utilisés pour l'amplification des ADNc

Gène	Amorce sens	Amorce antisens	T _m (°C)	Fournisseur
TNF α	5'-CTCCTCACCCACCCATCA	5'-GGAAGACCCCTCCAGATAG	85	Sigma-Genosys, France
IL-6	5'-CAATTCTGGATTCAATGAGGAGAC	5'-CTCTGGCTTGTCCTCACTACTC	80	
β -actine	5'-ATGTGGCCGAGGACTTTGAAT	5'-AGTGGGGTGGCTTTAGGATG	77	

b. Préparation des échantillons et réalisation de la PCRq

Chaque extrait d'ADNc obtenu après la transcription inverse est dilué au 1/5 dans de l'eau *RNase DNase free* (Eppendorf, Hambourg, Allemagne). La réaction a lieu dans des capillaires en verre. Le mélange réactionnel contient :

- 2 µl d'ADNc dilué au 1/5
- 10 µL de SYBRGreen (LightCycler Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBRGreen I)
- 1 µL d'amorce sens (0,5 µM)
- 1 µL d'amorce antisens (0,5 µM)
- 6 µL d'eau *RNase DNase free* (Eppendorf, Hambourg, Allemagne)

La réaction a lieu dans des capillaires en verre de 20 µL selon les étapes décrites dans le tableau XX.

Tableau XX : Etapes de la PCR quantitative

Etapes	Température (°C)	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation	95°C	5 minutes	1
Amplification	Dénaturation	95°C	10 secondes
	Hybridation et élongation	60°C	30 secondes
Courbes de fusion	Dénaturation	95°C	15 secondes
	Hybridation	65°C	15 secondes
	Dénaturation	95°C	0 seconde
Refroidissement	40°C	30 secondes	1

c. Purification de l'ADNc

Une gamme étalon (10^{-3} à 10^{-7} ng/mL) est réalisée pour chaque gène cible permettant ainsi de quantifier l'expression de chaque produit de PCR. Cette gamme est préparée après la purification du produit de PCR obtenu à partir de l'ADNc du gène cible. Un kit de purification d'ADN (MinElute[®] PCR Purification Kit, Qiagen, Courtaboeuf, France) est

utilisé pour cette étape. Brièvement, le contenu de produits de PCR ayant subi l'amplification spécifique d'un gène cible est récupéré par centrifugation (1 pulse, 500 g) puis cette suspension est mélangée à un tampon (*Binding Buffer*) et est déposée sur la colonne porteuse d'une membrane capable de retenir l'ADN. Les colonnes sont ensuite lavées deux fois par des tampons de lavage (*Washing Buffers* 1 et 2) et l'ADN est élué par 10 µL d'eau *RNase DNase free*. Un dosage spectrophotométrique est effectué afin de déterminer la concentration en ADN double brin. La concentration en ADN double brin (µg/mL) est déterminée en appliquant la formule suivante :

$$[\text{ADN}] = A_{260} \times 50 \times 1/D$$

où D est le facteur de dilution.

Cette solution mère est ensuite diluée afin d'obtenir la gamme de concentration du gène considéré.

VIII. Analyse d'expression des protéines ubiquitinyliées par western blot

Le western blot est effectué sur l'extrait de protéines totales préparées pour les kits TransAM[®]. La manipulation des protéines est systématiquement réalisée sur glace, afin d'éviter la dégradation des protéines par les protéases.

A. Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide

Les gels sont préparés à l'aide du système Hoefer SE 260 (Hoefer Inc, Holliston, Etats-Unis). La proportion d'acrylamide est de 10% dans le gel de séparation et de 5% dans le gel de concentration (Tableau XXI).

Tableau XXI : Composition des gels d'acrylamide

Réactifs	Solutions mères	Fournisseur	Gel de séparation	Gel de concentration
Acrylamide – Bis acrylamide	19:1	Bio-Rad	10%	5%
Tris-HCl	1,5 M pH 8,8	Sigma	370 mM	-
Tris-HCl	0,75 M pH 6,8	Sigma	-	170 mM
Glycérol	50% (v/v)	Sigma	5%	5%
SDS	20% (m/v)	Sigma	0,2%	0,2%
Ammonium persulfate	10% (m/v)	Sigma	0,08%	0,11%
TEMED		Bio-Rad	0,04%	0,11%
H ₂ O			qsp	qsp

Le gel de séparation est coulé en premier puis recouvert d'isopropanol (Sigma). Après 30 minutes de polymérisation à 37°C, la surface du gel est rincée puis séchée. Le gel de concentration est alors coulé, puis un peigne est mis en place, afin de former les puits de dépôt. Après polymérisation, le peigne est retiré puis le bloc contenant le gel est immergé dans une cuve d'électrophorèse contenant le tampon de migration Tris-Glycine-SDS (Tampon TGS, Bio-Rad, Ivry sur Seine, France).

Les échantillons protéiques sont dilués dans du tampon de lyse (Complete Lysis Buffer, kit TransAM[®], Active Motif), de façon à obtenir 40 µg de protéines dans 12,5 µL. 12,5 µL de tampon de Laemmli (Bio-Rad) sont ajoutés dans chaque échantillon. Les protéines ainsi préparées sont chauffées pendant 7 minutes à 95°C afin de les dénaturer.

Dans chaque puits du gel d'acrylamide, 25 µL d'échantillon sont déposés. Dans au moins un puits par gel, 10 µL d'un marqueur de taille biotinylé (*Biotinylated protein ladder detection pack*, Cell Signaling, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France) sont déposés. La migration électrophorétique des protéines s'effectue à 100V pendant 2h30.

B. Transfert sur membrane

En fin de migration, le gel est démoulé et le gel de concentration éliminé. Le gel de séparation est récupéré et incubé dans le tampon de transfert (Tableau XXII) pendant au moins 10 minutes.

Tableau XXII : Composition du tampon de transfert

Réactifs	Concentration	Fournisseur
Tris Base	48,0 mM	
Glycine	39,0 mM	
SDS	1,3 mM	Sigma
Méthanol	20%	
H ₂ O	qsp	

Les membranes utilisées sont en PVDF (fluorure de polyvinylidène) de porosité 0,2 µm (membrane Fluoro Trans[®] Pall, VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Avant le transfert, les membranes sont activées selon le protocole résumé dans le tableau XXIII.

Tableau XXIII : Protocole d'activation des membranes

Solutions	Durée d'incubation
Méthanol	30 secondes
H ₂ O	2 minutes
Tampon de transfert	10 minutes

Le transfert est réalisé à l'aide d'un système de transfert semi-sec. Le transfert s'effectue à 80 mA par membrane pendant 30 minutes.

C. Marquage par des anticorps

Après le transfert, la membrane est séchée pendant 20 minutes à température ambiante sur un papier absorbant.

Après le séchage, la membrane est incubée avec la solution de saturation (lait écrémé 2%, BSA 0,5% dans du TBST 0,1%) pendant 1h à température ambiante sous agitation lente.

Pour l'immunomarquage, nous avons utilisé un anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'ubiquitine (anticorps P4D1, Santa Cruz Biotechnology, Le Perray en Yvelines, France) dilué au 1/1000 dans la solution de saturation. Nous avons également semi-quantifié l'expression de la β -actine comme témoin de dépôt et nous avons utilisé un anticorps monoclonal de lapin dirigé contre la β -actine (Cell Signaling, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France) dilué au 1/1000.

Les membranes sont incubées une nuit à 4°C avec la solution d'anticorps, sous agitation lente, dans une boîte de type Perfect Western™ (GenHunter Corporation, Nashville, USA).

Le lendemain, les membranes sont lavées 3 fois 10 minutes, sous agitation lente avec du tampon TBST 0,1%, puis mises en contact avec l'anticorps secondaire. Il s'agit soit d'un anticorps dirigé contre les IgG de souris (Cell Signaling, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France), soit d'un anticorps dirigé contre les IgG de lapin (Cell Signaling, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France), dilué à 1/2000 dans la solution de saturation. Ces anticorps sont conjugués à la peroxydase HRP (*Horse Radish Peroxydase*). Quel que soit l'anticorps secondaire utilisé, un anticorps anti-biotine (Cell Signaling, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France) dilué au 1/1000 dans la solution de saturation est également ajouté afin de mettre en évidence les différentes bandes du marqueur de taille. Les membranes sont incubées pendant 1h à température ambiante puis lavées 3 fois 10 minutes dans du tampon TBST.

D. Révélation

La révélation a été réalisée avec le kit Super Signal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Perbio Science, Brebières, France) dont le principe repose sur une réaction de chimioluminescence. La peroxydase couplée à l'anticorps secondaire est capable d'oxyder le luminol et aboutit à l'émission de lumière, impressionnant un film d'autoradiographie (Kodak BioMax light film, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France).

Les membranes sont séchées, puis mises en contact pendant 5 minutes avec la solution de révélation (mélange équivolume des deux réactifs fournis dans le kit Super Signal West Pico). Les membranes sont ensuite enveloppées dans du papier film Saran puis mises en contact avec le film photographique dans une cassette de type Hypercassette[™] (Amersham-Pharmacia Biotech, Saclay, France). Le temps d'exposition est de l'ordre de 5 minutes. Les films sont ensuite développés (révélateur Kodak GBX) puis fixés (fixateur Kodak GBX). Les films photos, une fois fixés, sont scannés et l'intensité des bandes est semi-quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ (NIH Image).

IX. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel GraphPad (version 5.0). Les effets des traitements ont été comparés à l'aide du test non paramétrique *U de Mann et Whitney*. L'analyse des courbes de Kaplan-Meier a été réalisée à l'aide du *Log rank test* de Mantel Cox. Les différences entre les groupes ont été considérées comme significative lorsque $p < 0,05$.

Chapitre 7 : Résultats

Chapitre 7 : Résultats

I. Etudes de radiopotentialisation

A. Effets des traitements sur la croissance tumorale

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux propriétés radiosensibilisantes du bortézomib en administrant les traitements (bortézomib et radiothérapie) sous forme non fractionnée pour les deux lignées TCG3 et U87. Pour ce faire, nous avons suivis les effets des différents traitements sur la croissance tumorale. Les traitements ont débuté lorsque les tumeurs ont atteint un volume de $250 \pm 50 \text{ mm}^3$ et ont été administrés pendant 2 semaines. Le volume tumoral a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse 3 fois par semaine pendant et après le traitement. Le suivi a été effectué jusqu'à ce que les tumeurs atteignent 3 fois leur volume initial, soit un volume compris entre 600 et 900 mm^3 .

Afin d'appréhender les conséquences du fractionnement des doses de bortézomib et de radiothérapie sur les propriétés radiosensibilisantes du bortézomib, une étude similaire a été conduite en administrant les différents traitements selon le schéma dit "fractionné". Les conditions de traitement et de suivi des tumeurs ont été identiques à celles de l'étude des effets du traitement non fractionné. La figure 22 illustre l'évolution du volume tumoral médian au cours du temps pour les deux lignées et selon les deux types de fractionnement.

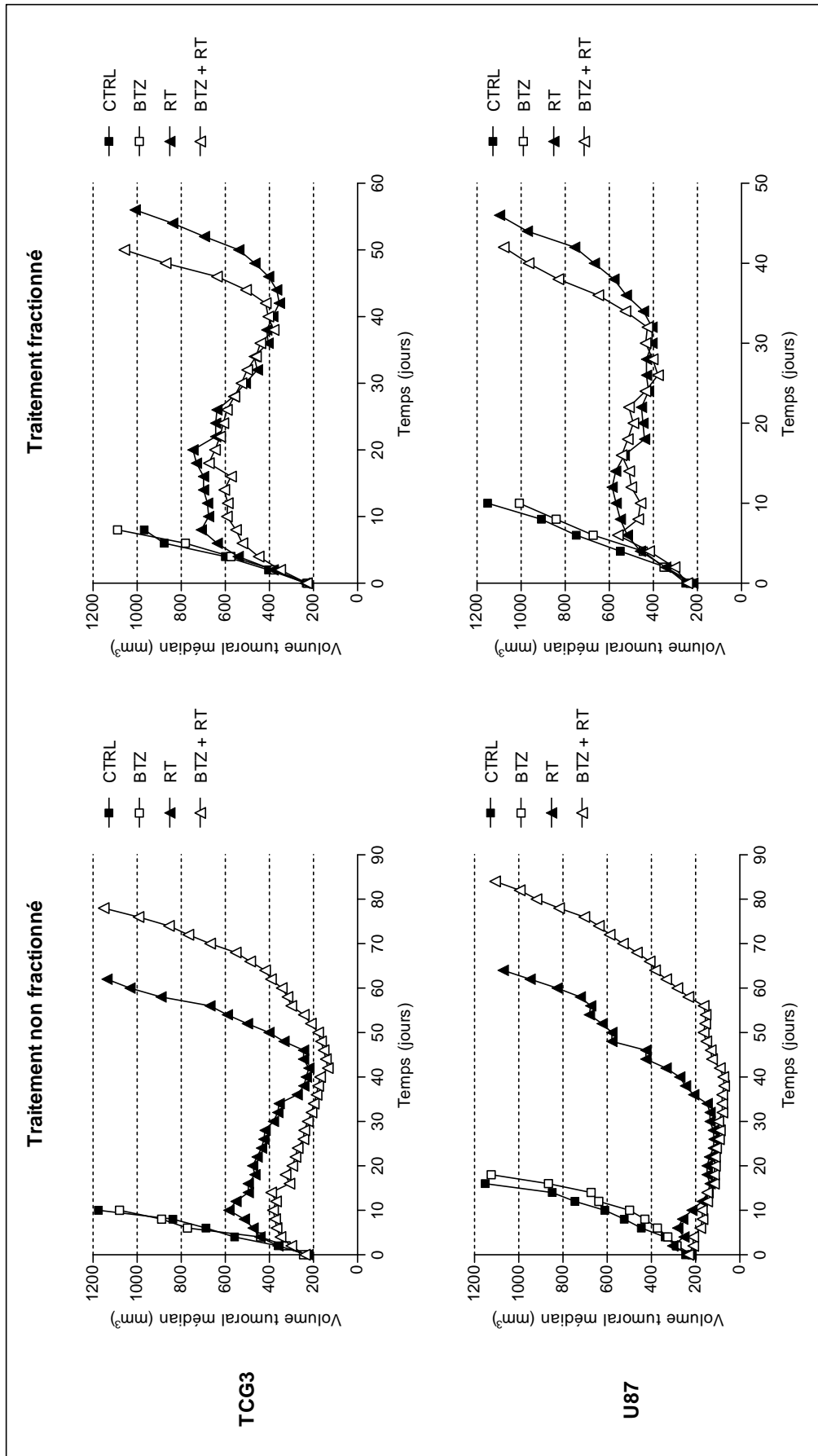


Figure 22 : Effets des traitements sur le volume tumoral médian. n = nombre de tumeurs par groupe. Lignée TCG3 traitement non fractionné CTRL n = 9 ; BTZ n = 9 ; RT n = 7 ; BTZ + RT n = 8. Lignée TCG3 traitement fractionné CTRL n = 7 ; BTZ n = 8 ; RT n = 4 ; BTZ + RT n = 10. Lignée U87 traitement non fractionné CTRL n = 7 ; BTZ n = 10 ; RT n = 5 ; BTZ + RT n = 5. Lignée U87 traitement fractionné CTRL n = 13 ; BTZ n = 13 ; RT n = 6 ; BTZ + RT n = 8.

Effets du traitement non fractionné

Les deux lignées choisies présentent une croissance spontanée relativement proche, avec atteinte d'un volume médian à 1000 mm³ entre J10 et J14.

Le bortézomib administré à raison d'une injection hebdomadaire à la dose de 0,90 mg/kg pendant 2 semaines ne présente pas d'effet sur l'évolution de la croissance tumorale par rapport au groupe CTRL pour les deux modèles étudiés. En effet, les tumeurs atteignent un volume médian de 1000 mm³ à 12 jours et 17 jours après l'inclusion pour les lignées TCG3 et U87 respectivement.

Sous radiothérapie, les deux modèles se comportent de façon différente en ce qui concerne la réponse précoce au traitement. La lignée TCG3 présente une augmentation du volume tumoral médian pendant la durée de traitement (maximum atteint à 600 mm³ à J10), alors que le volume tumoral de la lignée U87 reste stable pendant la même période. Ensuite, les deux modèles présentent une diminution du volume médian. Le minimum est atteint à J40 pour la lignée TCG3 (volume médian = 220 mm³) et à J25 pour la lignée U87 (volume médian = 120 mm³). La reprise de la croissance tumorale a lieu à partir de J45 pour la lignée TCG3 et à partir de J36 pour la lignée U87. Enfin, les tumeurs atteignent un volume médian de 1000 mm³ à J60 et à J64 pour les modèles TCG3 et U87, respectivement.

Enfin, nos résultats montrent que le bortézomib permet d'améliorer les effets de la radiothérapie sur la croissance tumorale pour les deux lignées étudiées. En effet, dès l'initiation du traitement, les courbes représentant les groupes BTZ + RT traduisent une diminution du volume par rapport aux groupes RT. Pour la lignée TCG3, le volume tumoral augmente légèrement et se stabilise à 400 mm³ à J10 puis diminue pour atteindre 150 mm³ à J40 (vs. 220 mm³ pour le groupe RT). Pour la lignée U87, le volume tumoral médian diminue dès l'initiation du traitement et se stabilise entre 75 et 100 mm³ à J40. Pour les deux lignées, la croissance tumorale reprend et le volume tumoral médian revient 200 mm³ entre 55 et 60 jours après l'inclusion. Enfin, le volume médian de 1000 mm³ est atteint à J75 et à J82 pour les modèles TCG3 et U87, respectivement.

Effets du traitement fractionné

Les deux modèles étudiés montrent une croissance sans traitement quasi identique : tous deux présentent une croissance exponentielle et atteignent un volume de 1000 mm^3 entre 8 et 10 jours après l'inclusion.

Nos résultats montrent également que, pour les deux lignées étudiées, le bortézomib ne permet pas de ralentir la croissance des tumeurs par rapport au groupe CTRL, les courbes représentant les groupes CTRL et BTZ étant superposées dans les deux cas.

Par ailleurs, la radiothérapie, associée ou non au bortézomib, permet de réduire la croissance des tumeurs par rapport au groupe CTRL. Pour les deux lignées, l'évolution du volume médian des tumeurs traitées par radiothérapie (groupes RT et BTZ + RT), peut se découper en 3 phases successives. Dans un premier temps, le volume augmente (jusqu'à J20 pour la lignée TCG3 et jusqu'à J15 pour la lignée U87). Cet accroissement est plus important pour la lignée TCG3 (à J20, le volume médian est compris entre 650 et 700 mm^3) que pour la lignée U87 (à J15, le volume médian est compris entre 500 et 600 mm^3). Puis, le volume des tumeurs traitées par radiothérapie, quelle que soit la lignée considérée, diminue jusqu'à un plateau ($V_{\text{méd}} = 400 \text{ mm}^3$ à J40 et J30, respectivement pour les lignées TCG3 et U87). Enfin, le volume tumoral recommence à croître de façon exponentielle. Les tumeurs de la lignée TCG3 présentent une sensibilité aux traitements plus importante que celles de la lignée U87 : par exemple, pour les groupes RT, les tumeurs atteignent le volume de 1000 mm^3 55 jours et 45 jours après l'initiation du traitement pour les lignées TCG3 et U87, respectivement.

Nos résultats montrent enfin que le bortézomib réduit les effets antitumoraux de la radiothérapie sur la croissance tumorale pour les deux lignées étudiées. Dans les deux cas, la courbe de volume des tumeurs du groupe BTZ + RT est superposée avec celle des tumeurs du groupe RT jusqu'à la phase de recroissance finale qui survient plus précocement pour les tumeurs du groupe BTZ + RT. Par exemple pour la lignée TCG3, le début de la recroissance intervient à J42 pour le groupe BTZ + RT, alors les tumeurs du groupe RT ne recommencent à croître qu'à J48. Des résultats similaires sont retrouvés pour la lignée U87 (début de la recroissance à J32 et J37 pour les groupes BTZ + RT et RT, respectivement). Les tumeurs atteignent un volume médian de 1000 mm^3 à J50 et à J42 pour les modèles TCG3 et U87 respectivement.

Comparaison des deux types de fractionnement

En premier lieu, nos résultats montrent que le bortézomib, que le traitement soit fractionné ou non, ne permet pas ralentir la croissance tumorale pour les deux modèles étudiés.

En ce qui concerne la radiothérapie, le fait de fractionner le traitement à raison de 2 Gy/jour/fraction provoque une diminution de l'effet antitumoral de la radiothérapie : nous observons une augmentation initiale du volume tumoral médian pendant le traitement pour les deux lignées, nettement supérieure à celle observée pour le traitement non fractionné. La diminution du volume tumoral qui fait suite est beaucoup plus marquée dans le cas du traitement non fractionné, les tumeurs présentant un volume inférieur ou égal au volume initial de début de traitement. Pour la lignée TCG3, nos résultats montrent que les deux types de traitement (fractionné ou non) conduisent à un délai relativement similaire pour atteindre un volume médian de 1000 mm³ (entre 55 et 60 jours). En revanche, pour la lignée U87, le fait de fractionner le traitement réduit considérablement le temps nécessaire pour atteindre 1000 mm³ (environ 20 jours de moins pour le traitement fractionné).

Pour les groupes de souris recevant l'association BTZ + RT, le fait de fractionner le traitement réduit considérablement le délai nécessaire pour que les tumeurs atteignent un volume de 1000 mm³. Pour la lignée TCG3, ce délai passe de 75 jours pour le traitement non fractionné à 50 jours pour le traitement fractionné (réduction d'un tiers). En ce qui concerne la lignée U87, les tumeurs recevant le traitement fractionné nécessitent un délai de 42 jours pour atteindre 1000 mm³, alors que dans le cas du traitement non fractionné, ce délai est presque doublé, atteignant 82 jours. De façon plus générale, le fractionnement des traitements conduit à une superposition des courbes représentant les groupes RT et BTZ + RT, alors que les courbes sont nettement séparées dans le cas du traitement non fractionné, et ce dès l'initiation des traitements.

B. Effets des traitements sur la survie des souris xénotransplantées

1. Courbes de Kaplan-Meier

Les effets des traitements (fractionnés et non fractionnés) ont également été évalués par l'analyse des courbes de survie de Kaplan-Meier en utilisant le délai de croissance tumorale comme paramètre de fin d'étude (Figure 23). Le délai de croissance tumorale correspond au temps mis par les tumeurs pour atteindre 3 fois le volume initial (V_i), soit un volume compris entre 600 et 900 mm³.

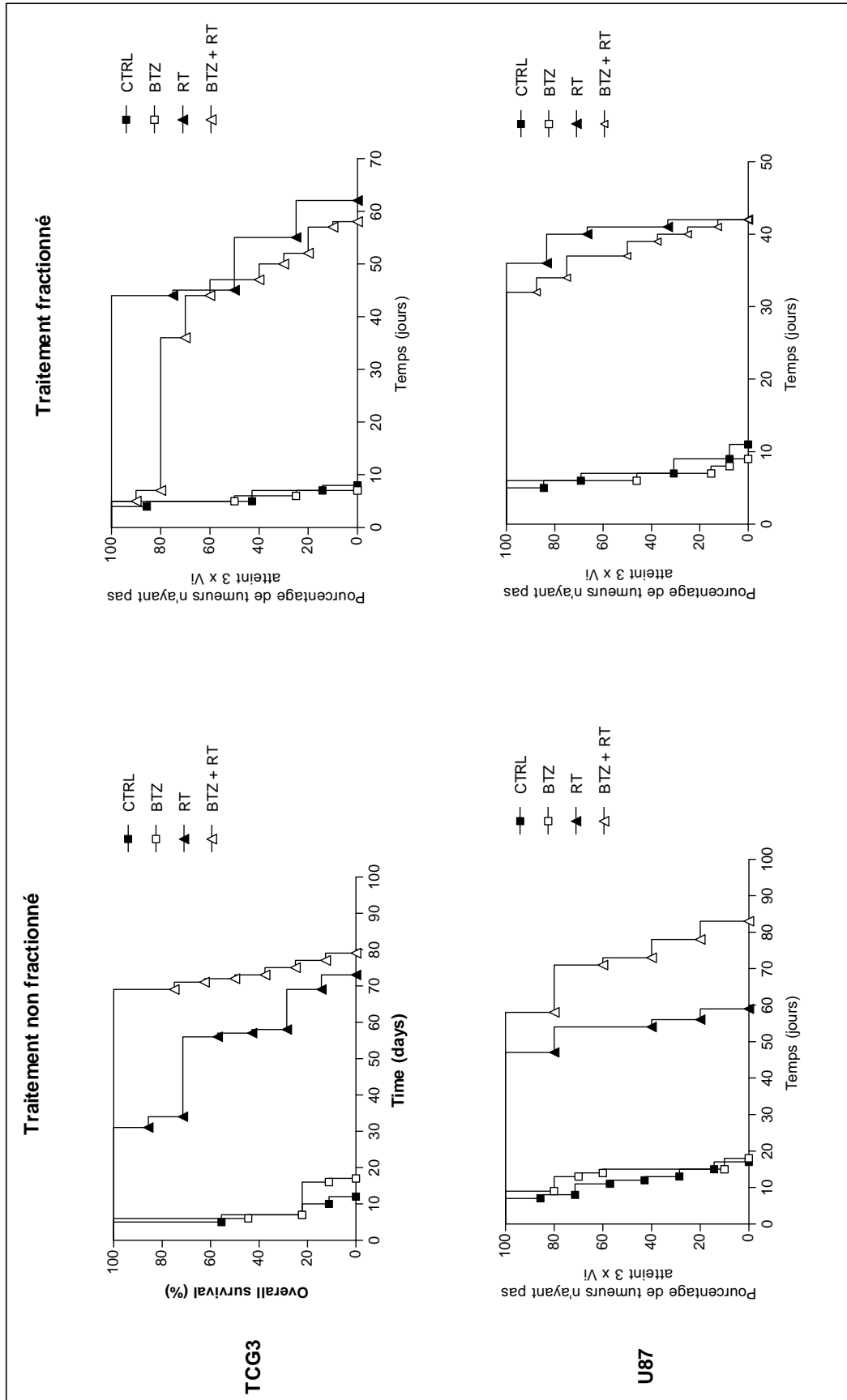


Figure 23 : Effets des traitements sur la survie de souris porteuses de tumeurs TCG3 et U87. n = nombre de tumeurs par groupe. Lignée TCG3 traitement non fractionné CTRL n = 9 ; BTZ n = 9 ; RT n = 7 ; BTZ + RT n = 8. Lignée TCG3 traitement fractionné CTRL n = 7 ; BTZ n = 8 ; RT n = 4 ; BTZ + RT n = 10. Lignée U87 traitement non fractionné CTRL n = 7 ; BTZ n = 10 ; RT n = 5 ; BTZ + RT n = 5. Lignée U87 traitement fractionné CTRL n = 13 ; BTZ n = 13 ; RT n = 6 ; BTZ + RT n = 8.

Effets du traitement non fractionné

Notre étude montre que le bortézomib seul, administré à la dose de 0,90 mg/kg/semaine pendant 2 semaines ne permet pas d'améliorer la survie des souris, quelle que soit la lignée considérée. En effet, les survies médianes sont respectivement de 6,0 jours pour la lignée TCG3 (vs. 7,0 jours pour le groupe CTRL, $p = 0,2878$) et de 15,0 jours pour la lignée U87 (vs. 12,0 jours pour le groupe CTRL, $p = 0,1878$). En revanche, la radiothérapie améliore de façon très marquée la survie médiane des animaux : elle atteint 57 jours pour la lignée TCG3 (vs. CTRL $p < 0,0001$) et 54 jours pour le modèle U87 (vs. CTRL $p = 0,0011$). Enfin, l'administration concomitante de bortézomib potentialise l'effet antitumoral de la radiothérapie. L'association des deux traitements conduit à une médiane de survie identique pour les deux modèles étudiés. En effet, la survie médiane atteint 72,5 jours pour la lignée TCG3 (vs. CTRL $p < 0,0001$) et 73,0 jours pour la lignée U87 (vs. CTRL $p = 0,0011$). Pour les deux modèles, la différence par rapport au groupe recevant uniquement la radiothérapie est significative ($p = 0,0075$ pour la lignée TCG3 et $p = 0,0066$ pour la lignée U87).

Effets du traitement fractionné

Nos résultats montrent que, pour les deux lignées étudiées, le bortézomib ne permet pas d'améliorer la survie des souris porteuses de tumeurs par rapport au groupe CTRL. Pour la lignée TCG3, la survie médiane est de 5,0 jours pour le groupe CTRL et de 5,5 jours pour le groupe BTZ. Dans le cas de la lignée U87, la survie médiane est de 7,0 et de 6,0 jours pour les groupes CTRL et BTZ, respectivement. Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre le groupe CTRL et le groupe BTZ pour les deux lignées ($p = 0,2878$ pour la lignée TCG3 et $p = 0,9363$ pour la lignée U87). Par ailleurs, la radiothérapie, délivrée seule ou en association avec le bortézomib, augmente significativement la survie des souris par rapport au groupe CTRL. La survie médiane après radiothérapie seule atteint 50 jours pour la lignée TCG3 (vs. CTRL $p = 0,0026$) et 41 jours pour la lignée U87 (vs. CTRL $p = 0,001$). Pour les deux lignées, nos résultats démontrent que l'adjonction de bortézomib ne permet pas d'améliorer l'efficacité antitumorale de la radiothérapie. Les souris recevant l'association des deux traitements ont une survie médiane légèrement inférieure à celle des animaux traités par RT seule, même si la différence entre les groupes RT et BTZ + RT n'atteint pas le seuil de significativité quelle que soit la lignée considérée ($p = 0,352$ et $p = 0,160$ pour les lignées

TCG3 et U87, respectivement). En effet, pour la lignée TCG3, la survie médiane est de 47 jours pour le groupe BTZ + RT, alors que ce paramètre atteint 50 jours pour le groupe RT. La lignée U87 est plus résistante aux traitements : la survie médiane est de 38 jours et de 41 jours pour les groupes BTZ + RT et RT, respectivement.

Comparaison des deux types de fractionnement

Quel que soit le mode de fractionnement choisi, le bortézomib ne permet pas d'améliorer la survie des souris porteuses des lignées de gliome malin humain TCG3 et U87. En ce qui concerne la radiothérapie seule, le fractionnement du traitement diminue légèrement la survie des souris : la survie médiane passe de 57,0 jours à 50,0 jours pour la lignée TCG3 et de 54,0 jours à 41,0 jours pour la lignée U87. En revanche, le fractionnement des traitements pour les groupes recevant l'association concomitante BTZ + RT conduit à une réduction considérable de la survie des souris pour les deux modèles de xénogreffes mis en œuvre. En effet, la survie médiane passe de 72,5 jours à 47,0 jours pour la lignée TCG3 sous l'effet du fractionnement des traitements (réduction d'environ un tiers). De même, pour la lignée U87, la survie médiane diminue d'environ 50% sous l'effet du fractionnement, passant de 73,0 à 38,0 jours.

2. Délais et retards de croissance tumorale

Pour chaque tumeur, nous avons déterminé le délai de croissance tumorale (DCT en jours) qui correspond au temps mis par les tumeurs pour atteindre 3 fois le volume initial, puis la médiane des DCT a été calculée dans chaque groupe de traitement. Le retard de croissance tumorale (RCT) correspond à la différence de DCT entre les groupes d'animaux traités et le groupe CTRL. Pour chaque lignée, le *ratio* de radiopotentialisation (RRP) a été calculé selon la formule suivante :

$$RRP = \frac{RCT_{BTZ+RT}}{RCT_{BTZ} + RCT_{RT}}$$

Le *ratio* de radiopotentialisation correspond au rapport entre l'effet de l'association BTZ + RT observé au cours de nos études et la somme théorique des effets du BTZ et de la radiothérapie administrés individuellement. Les résultats que nous avons obtenus sont présentés dans le tableau XXIV.

Tableau XXIV : Délais (DCT) et retards de croissance tumorale (RCT) médians pour les lignées TCG3 et U87. Les résultats sont exprimés en jours et sont calculés à un volume égal à 3 fois le volume initial. n = nombre de tumeurs par groupe.

	Lignée TCG3						Lignée U87					
	Traitement non fractionné			Traitement fractionné			Traitement non fractionné			Traitement fractionné		
	n	DCT	RCT	n	DCT	RCT	n	DCT	RCT	n	DCT	RCT
CTRL	9	7,0	-	7	5,0	-	7	12,0	-	13	7,0	-
BTZ	9	6,0	-1,0	8	5,5	0,5	10	15,0	3,0	13	6,0	-1,0
RT	7	57,0	50,0	4	50,0	45,0	5	54,0	42,0	6	41,0	34,0
BTZ + RT	8	72,5	65,5	10	47,0	42,0	5	73,0	61,0	8	38,0	31,0
RRP			1,34			0,92			1,36			0,94

En ce qui concerne le traitement non fractionné, les *ratios* de radiopotentialisation (respectivement 1,34 et 1,36 pour les modèles TCG3 et U87) sont supérieurs à 1,0 et reflètent la potentialisation de l'effet antitumoral de la radiothérapie par le bortézomib. En revanche, les résultats en *ratio* de radiopotentialisation pour le traitement fractionné (respectivement 0,92 et 0,94 pour les lignées TCG3 et U87) traduisent une efficacité antitumorale moindre de l'association BTZ + RT par rapport à l'effet théorique attendu (correspondant à la somme des effets de chaque modalité thérapeutique prise isolément).

II. Effets cellulaires des traitements

Nous avons cherché à déterminer si la perte du pouvoir radiosensibilisant du bortézomib en conditions de traitement fractionné était objectivable au niveau cellulaire en termes de prolifération et d'apoptose. Ces effets ont été évalués après la première semaine d'administration, 2h ou 24h après la fin des traitements.

A. Effets des traitements sur la prolifération cellulaire

1. Effets des traitements sur l'indice de prolifération

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'effet des traitements sur l'indice de prolifération. Les cellules en prolifération ont été mises en évidence par détection immunohistochimique de la protéine Ki-67. Le marquage obtenu avec l'anticorps anti-Ki-67 est net, et il y a très peu de bruit de fond, ce qui permet un décompte aisé des cellules. Le signal obtenu est nucléaire, et marque en brun-rouge toutes les cellules présentes dans le cycle cellulaire (Figure 24).

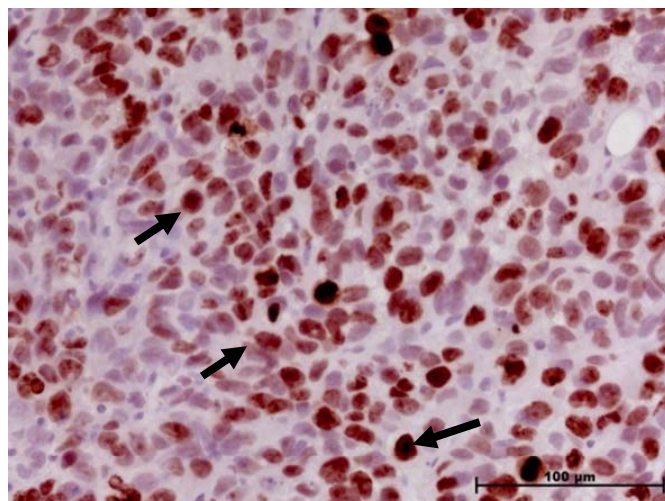


Figure 24 : Photographie représentant le marquage nucléaire brun-rouge obtenu après détection immunohistochimique de la protéine **Ki-67**. Les flèches indiquent des exemples représentatifs de marquage. Grossissement x 400.

Des photographies représentatives de chaque groupe sont présentées figures 25 et 26.

Traitement non fractionné

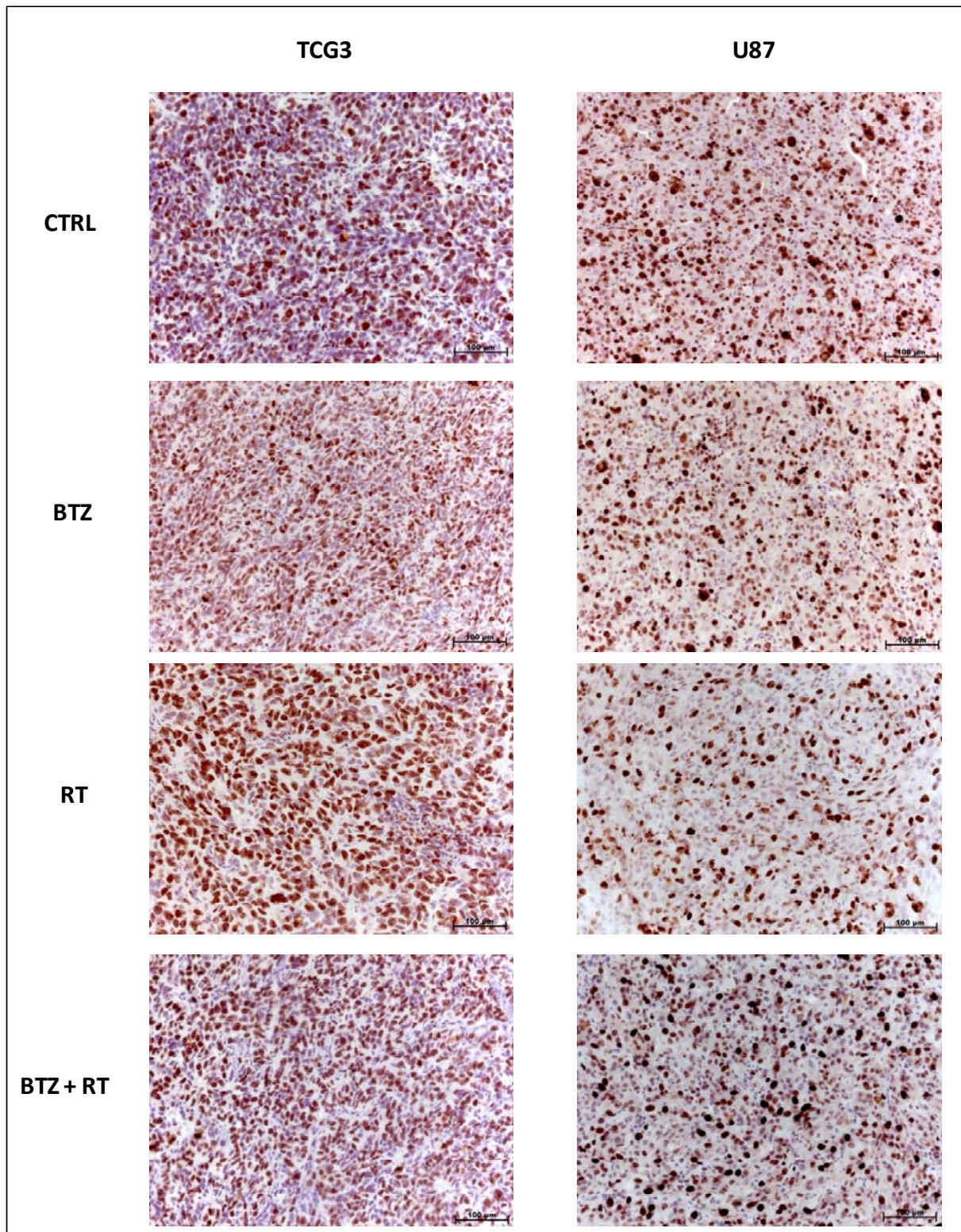


Figure 25 : Effets des traitements non fractionnés sur le marquage immunohistochimique de Ki-67. Le noyau des cellules marquées positivement apparaît en brun-rouge. Les photographies présentées sont représentatives de chaque groupe. Grossissement x 200.

Traitement fractionné

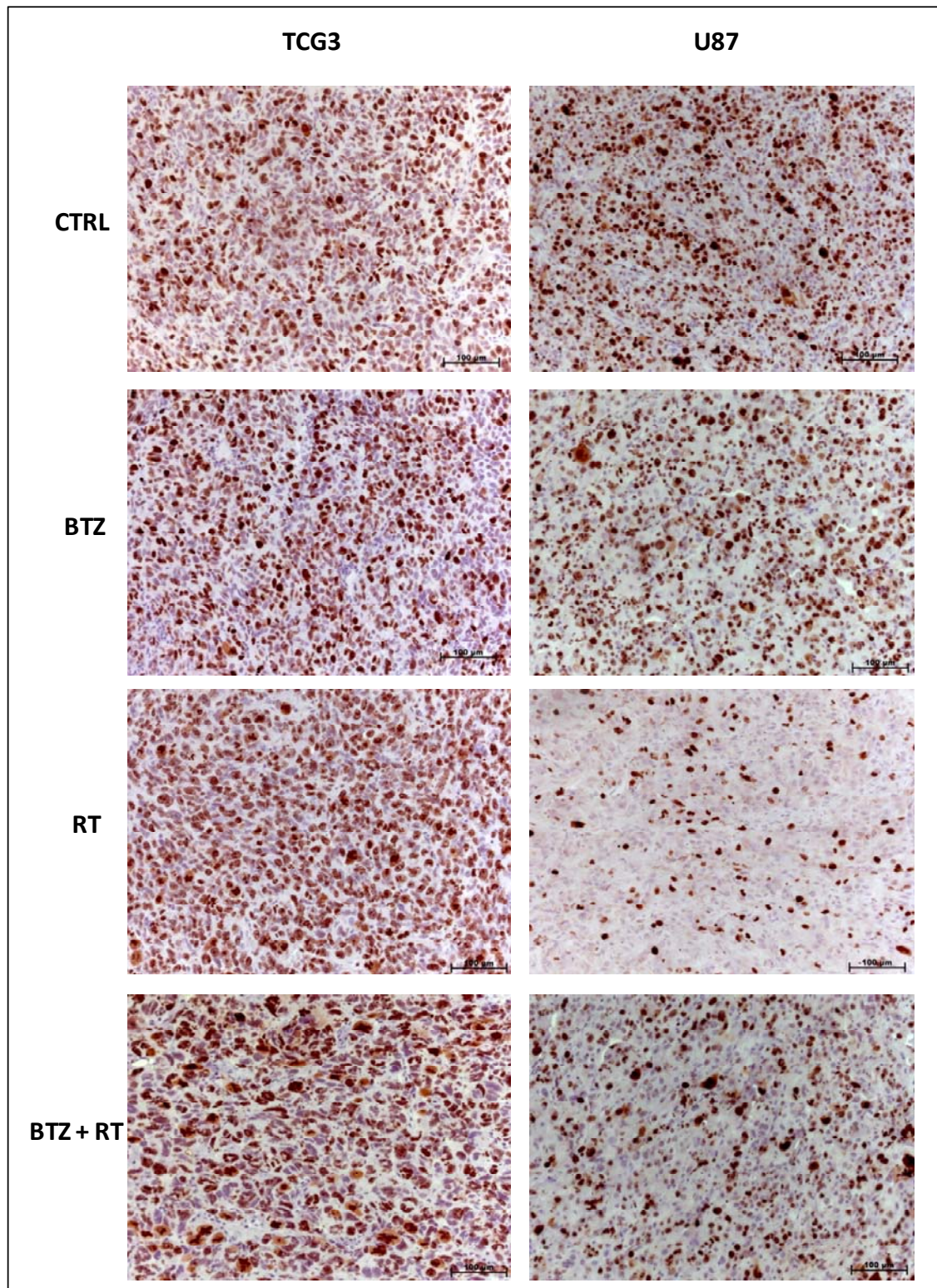


Figure 26 : Effets des traitements fractionnés sur le marquage immunohistochimique de Ki-67. Le noyau des cellules marquées positivement apparaît en brun-rouge. Les photographies présentées sont représentatives de chaque groupe. Grossissement x 200.

L'indice de prolifération, correspondant au nombre de cellules marquées positivement pour l'antigène Ki-67, a été évalué pour 1000 cellules comptées et est exprimé en pourcentage (Figure 27).

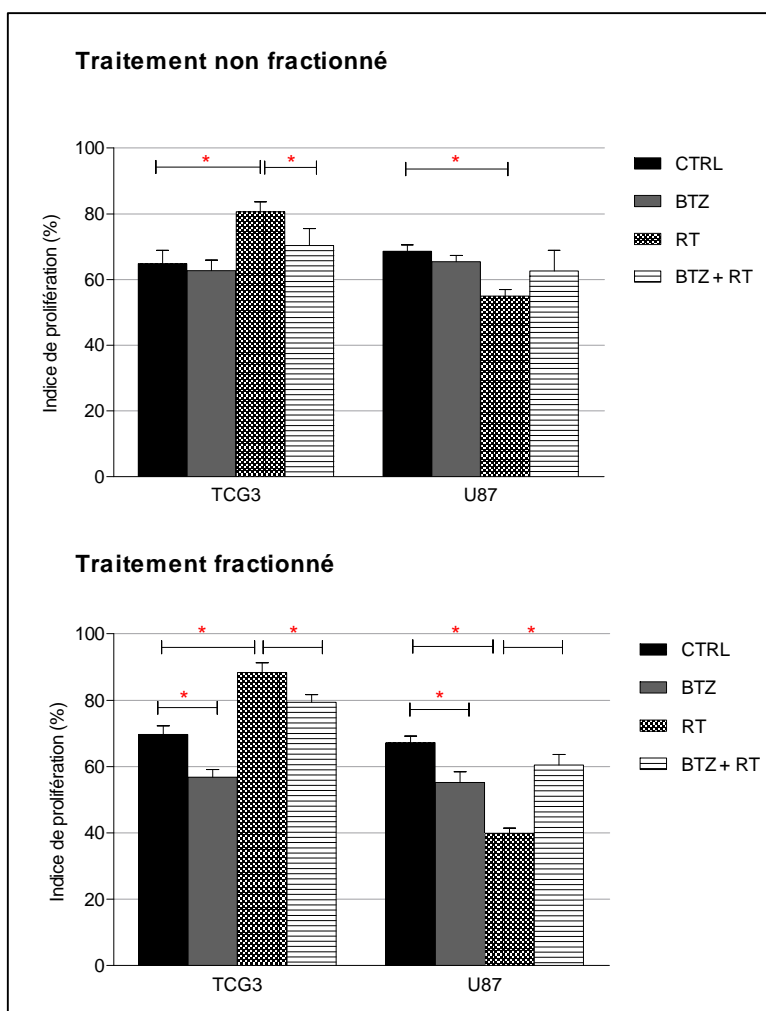


Figure 27 : Impact des traitements sur l'indice de prolifération moyen. Les résultats sont présentés sous la forme "moyenne \pm erreur-standard". n = nombre de tumeurs par groupe, n \geq 4 pour tous les groupes. * $p < 0,05$.

De façon générale, nos données montrent que les deux conditions de fractionnement mises en œuvre dans notre étude conduisent à des évolutions très proches de l'indice de prolifération sous l'effet des traitements par rapport au groupe CTRL, les deux séries d'histogrammes étant

quasi superposables. Les différences entre les deux modes de fractionnement résident dans des variations de l'intensité des effets obtenus pour chaque modalité thérapeutique.

Nos résultats montrent que le bortézomib seul permet de réduire la prolifération cellulaire uniquement lorsqu'il est administré selon le schéma fractionné. En effet, le bortézomib diminue significativement l'indice de prolifération par rapport au groupe CTRL (passage de 70% à 57% pour la lignée TCG3 et passage de 67% à 55% pour la lignée U87). En ce qui concerne le traitement par radiothérapie, nos deux lignées se comportent différemment : la radiothérapie provoque une augmentation significative de l'indice de prolifération pour la lignée TCG3 que le traitement soit fractionné ou non (par exemple pour le traitement fractionné, passage de 70% de cellules marquées positivement pour le groupe CTRL à 88% pour le groupe recevant la radiothérapie). En revanche, la lignée U87 voit son indice de prolifération diminuer significativement lorsque les tumeurs sont traitées par radiothérapie fractionnée ou non (passage de 67% pour le groupe CTRL à 40% pour le groupe RT fractionnée). Enfin, nous constatons que, pour les deux lignées, le traitement par BTZ + RT (fractionné ou non) induit un effet inverse à celui de la radiothérapie seule, la différence entre les groupes RT et BTZ + RT atteignant le seuil de significativité statistique dans trois des quatre conditions de traitement étudiées. Par exemple, pour les tumeurs TCG3 recevant le traitement sous forme fractionnée, l'indice de prolifération passe de 88% pour le groupe RT à 79% pour le groupe BTZ + RT. Pour la lignée U87 dans les mêmes conditions, l'indice de prolifération augmente d'un tiers entre les groupes RT et BTZ + RT (passage de 40% pour le groupe RT à 60% pour le groupe BTZ + RT).

2. Effets des traitements sur la distribution dans le cycle cellulaire et la prolifération

a. Distribution dans le cycle cellulaire

Afin de confirmer et d'affiner les résultats obtenus pour l'indice de prolifération calculé avec le marquage immunohistochimique de la protéine Ki-67, nous avons, dans un second temps, déterminé la distribution des cellules dans le cycle cellulaire après détection en cytométrie en flux de l'iodure de propidium incorporé dans l'ADN. Les résultats que nous avons obtenus sont présentés dans le tableau XXV.

Tableau XXV : Impact des traitements sur la distribution dans le cycle cellulaire. Les résultats sont présentés sous la forme de pourcentages moyens. n = nombre de tumeurs par groupe, n ≥ 4 pour tous les groupes. * $p < 0,05$ par rapport au groupe CTRL.

		Traitement non fractionné			Traitement fractionné		
		G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M
TCG3	CTRL	64,9	22,0	13,1	68,5	23,4	8,2
	BTZ	68,2	23,5	8,3	66,7	25,0	8,3
	RT	27,1*	32,0*	40,9*	55,1*	21,7	23,3*
	BTZ + RT	52,7	27,6	19,8	30,3*	31,2*	38,6*
U87	CTRL	76,0	13,9	10,1	77,5	17,5	5,3
	BTZ	74,2	17,9	7,9	72,4	23,1	4,5
	RT	79,6	17,3	3,2*	79,0	13,8	7,3*
	BTZ + RT	66,7	17,9	15,4*	65,1	20,0	15,0*

Nos résultats montrent que le bortézomib, quels que soient la lignée et le mode de fractionnement considérés, ne modifie pas la distribution des cellules dans le cycle cellulaire par rapport au groupe CTRL. Nos deux lignées se comportent différemment sous l'effet de la radiothérapie, et pour la lignée U87, les arrêts provoqués diffèrent en fonction du fractionnement du traitement.

Distribution dans le cycle cellulaire pour la lignée TCG3

Dans le cas du **traitement non fractionné**, la radiothérapie induit un effet massif sur la distribution dans le cycle cellulaire : nos résultats montrent que le pourcentage de cellules présentes dans chaque phase est significativement différent de ce qui est observé pour le

groupe CTRL. Nos données traduisent un arrêt massif des cellules en phase G2/M (passage de 13,1% pour le groupe CTRL à 40,9%) accompagné d'une augmentation importante des cellules en phase S (passant de 22 à 32%) et d'une diminution du pourcentage de cellules en phase G0/G1 (passage de 64,9 à 27,1%). De façon surprenante, les tumeurs du groupe BTZ + RT présentent une distribution dans le cycle cellulaire relativement proche de celle des tumeurs non traitées du groupe CTRL. Ces données ne signifient pas nécessairement que l'association BTZ + RT est sans effet sur la distribution dans le cycle cellulaire : les arrêts peuvent être plus précoces ou plus tardifs.

Le **fractionnement** de la radiothérapie provoque également un arrêt des cellules en phase G2/M mais cet arrêt est beaucoup moins important que dans le cas du traitement non fractionné. Par exemple, le pourcentage de cellules en phase G2/M atteint seulement 23,3% (vs. 40,9% pour le traitement non fractionné). En revanche, l'association BTZ + RT induit un arrêt massif du cycle cellulaire en phase G2/M (passage de 8,2% pour le groupe CTRL à 38,6%), qui s'accompagne d'une augmentation du pourcentage de cellules en phase S (passage de 23,4 à 31,2%) et une réduction du pourcentage de cellules en phase G0/G1 (passage de 68,5 à 30,3%).

Distribution dans le cycle cellulaire pour la lignée U87

De façon générale, les effets des différents traitements sur la distribution dans le cycle cellulaire sont beaucoup moins marqués que pour la lignée TCG3. Dans le cas du **traitement non fractionné**, la radiothérapie provoque un arrêt des cellules en phase G0/G1 (passage de 76,0% pour le groupe CTRL à 79,6%), qui se traduit par une diminution du pourcentage de cellules en phase G2/M (passage de 10,1 à 3,2%). Le pourcentage de cellules en phase S augmente de 13,9 % pour le groupe CTRL à 17,3% pour le groupe RT. Lors de l'association concomitante BTZ + RT, les tumeurs présentent un arrêt en phase G2/M (passage de 10,1% pour le groupe CTRL à 15,4%). En parallèle, le pourcentage de cellules en phase G0/G1 diminue de 76,0% pour le groupe CTRL à 66,7%.

Pour le **traitement fractionné**, la radiothérapie induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (passage de 5,3% pour le groupe CTRL à 7,3%). Il est également possible que les tumeurs radiothérapées présentent un arrêt en phase G0/G1 (passage de 77,5% pour le groupe CTRL à 79%). L'ensemble de ces deux arrêts conduisent à une réduction du pourcentage de

cellules en phase S par rapport au groupe CTRL (passage de 17,5 à 13,8%). Dans tous les cas, les variations, même si elles atteignent le seuil de significativité statistique par rapport au groupe CTRL pour certains traitements, restent de faible intensité et ne traduisent pas forcément une réalité biologique. Dans le cas du traitement par BTZ + RT, nos résultats montrent un arrêt plus marqué en phase G2/M, le pourcentage de cellules dans cette phase passe de 5,3% pour le groupe CTRL à 15,0% pour les tumeurs recevant l'association. Ceci s'accompagne d'une diminution du pourcentage de cellules en phase G0/G1 (passage de 77,5% pour le groupe CTRL à 65,1%). Le pourcentage de cellules en phase S reste constant par rapport au groupe CTRL (17,5% pour le groupe CTRL vs. 20,0% pour le groupe BTZ + RT).

b. Calcul de l'indice de prolifération

L'analyse du cycle cellulaire nous permet de mettre en évidence les proportions des différentes populations de cellules en fonction de la phase du cycle cellulaire dans lesquelles elles se trouvent (phase G0/G1, phase S, et phase G2/M). A partir de ces pourcentages, il est possible de calculer un indice de prolifération pour chaque type de traitement L'indice de prolifération est obtenu en additionnant les pourcentages de cellules présentes en phase S et en phase G2/M (Figure 28).

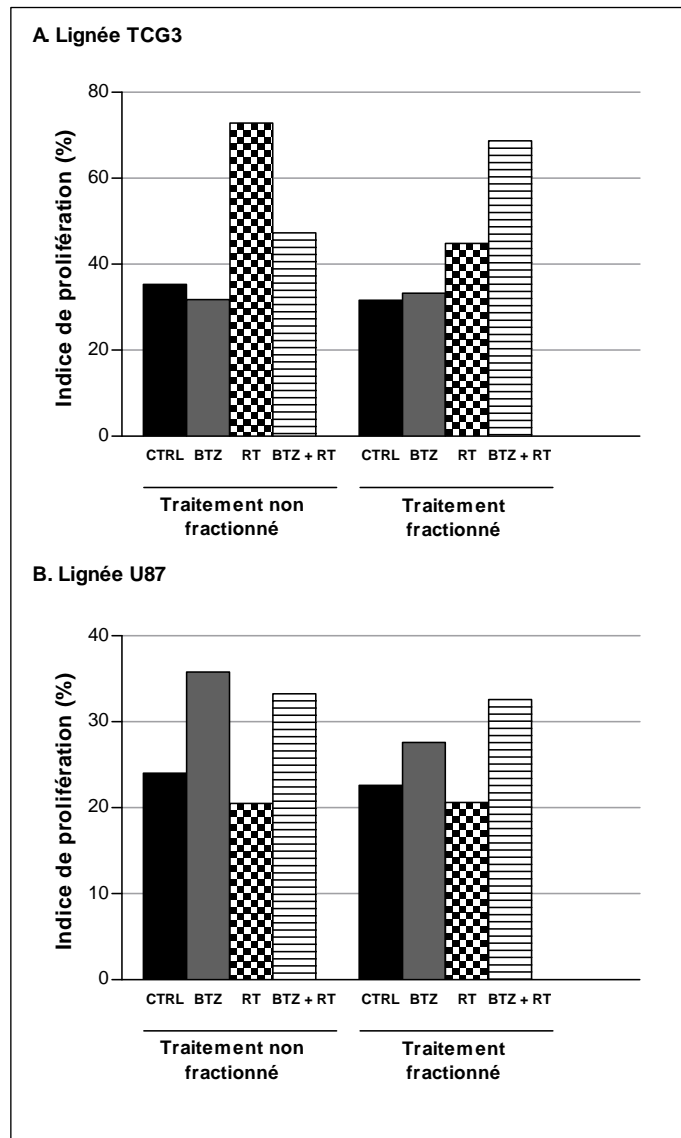


Figure 28 : Effet des traitements sur l'indice de prolifération calculé à partir de la distribution dans le cycle cellulaire. Les résultats correspondent à la somme des pourcentages moyens de cellules en phases S et G2/M, déterminés par cytométrie en flux après incorporation d'iodure de propidium.

Lignée TCG3

Les résultats présentés figure 28 sont corrélés avec la réponse antitumorale globale pour la lignée TCG3 et illustrent la perte de l'effet radiosensibilisant du bortézomib en condition de traitement fractionné. Nos données montrent que le bortézomib administré seul n'induit pas

de variation massive de l'indice de prolifération par rapport au groupe CTRL. En revanche, de façon cohérente avec le marquage immunohistochimique en Ki-67, la radiothérapie (fractionnée ou non) provoque une augmentation de l'indice de prolifération par rapport au groupe CTRL (passage de 35,3% pour le groupe CTRL à 72,9% pour le groupe RT pour le traitement non fractionné). Dans le cas du traitement non fractionné, l'association concomitante du bortézomib conduit à une diminution de l'indice de prolifération radio-induit (47,3% vs. 72,9%). En revanche, lorsque le traitement est fractionné, le groupe BTZ + RT présente un indice de prolifération nettement supérieur à celui induit par la radiothérapie seule (68,7% vs. 44,9%).

Lignée U87

L'étude de l'indice de prolifération calculé à partir de la distribution dans le cycle cellulaire ne permet pas de discriminer l'impact du fractionnement pour la lignée U87. En effet, les variations de l'indice de prolifération sont identiques que le traitement soit fractionné ou non. Dans les deux cas, le bortézomib induit une augmentation de l'indice de prolifération par rapport au groupe CTRL (passage de 24,0% pour le groupe CTRL à 35,8% pour le groupe BTZ dans le cas du traitement non fractionné). Par ailleurs, que la radiothérapie soit fractionnée ou non, nos résultats montrent une diminution légère de l'indice de prolifération par rapport au groupe CTRL (pour le traitement non fractionné, passage de 24,0% pour le groupe CTRL à 20,5% pour le groupe RT). L'adjonction concomitante de bortézomib conduit à une augmentation de l'indice de prolifération radio-induit pour les deux modes de fractionnement (par exemple, passage de 20,5% pour le groupe RT à 33,3% pour le groupe BTZ + RT).

B. Effets des traitements sur l'indice apoptotique

Le bortézomib, comme les autres inhibiteurs de protéasome, est décrit comme un inducteur d'apoptose. En revanche, la radiothérapie ne provoque pas d'apoptose de façon massive. La potentialisation de cette apoptose radio-induite par une molécule sensibilisante peut présenter un intérêt afin d'améliorer la réponse thérapeutique. En outre, Russo, et coll. ont montré que l'association concomitante du bortézomib et de la radiothérapie provoquait une augmentation du pourcentage de cellules apoptotiques dans les tumeurs traitées (203).

Nous avons donc cherché à évaluer les effets des traitements sur l'apoptose et à déterminer si les variations l'apoptose radio-induite permettent d'expliquer la perte du pouvoir radiosensibilisant du bortézomib en conditions fractionnées. Nous avons évalué l'indice apoptotique des tumeurs par détection immunohistochimique de la caspase-3 clivée, déterminé 24h après l'administration de la radiothérapie. Le signal obtenu est cytoplasmique et colore en brun-rouge les cellules en apoptose (Figure 29).

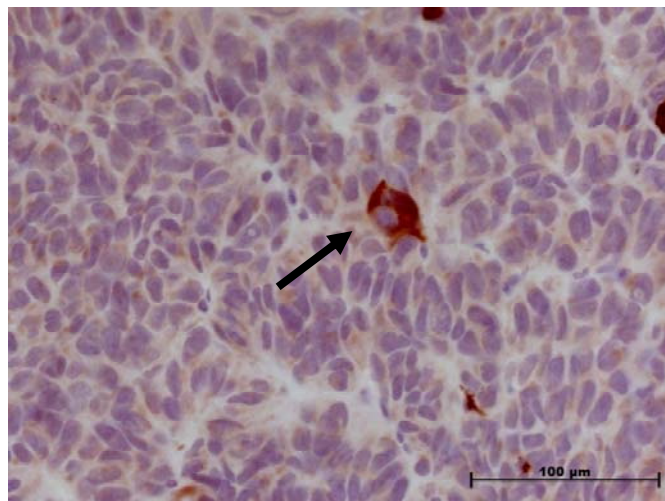


Figure 29 : Photographie représentant le marquage cytoplasmique brun-rouge obtenu après détection immunohistochimique de la caspase-3 clivée. La flèche indique un exemple représentatif de marquage. Grossissement x 400.

Des photographies représentatives de chaque groupe sont présentées figures 30 et 31.

Traitement non fractionné

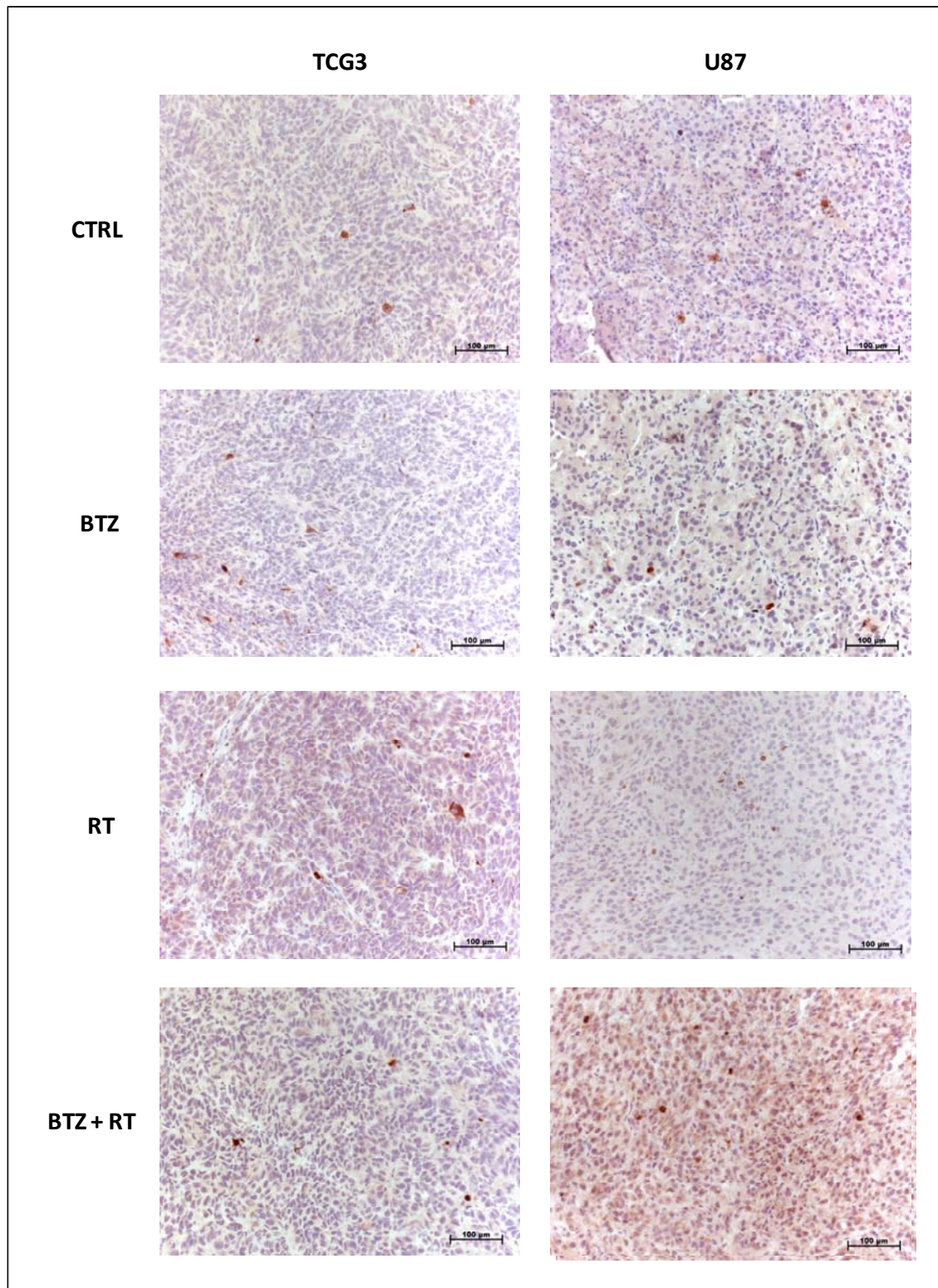


Figure 30 : Effets des traitements non fractionnés sur le marquage immunohistochimique de la caspase-3 clivée. Le cytoplasme des cellules marquées positivement apparaît en brun-rouge. Les photographies présentées sont représentatives de chaque groupe. Grossissement x 200.

Traitement fractionné

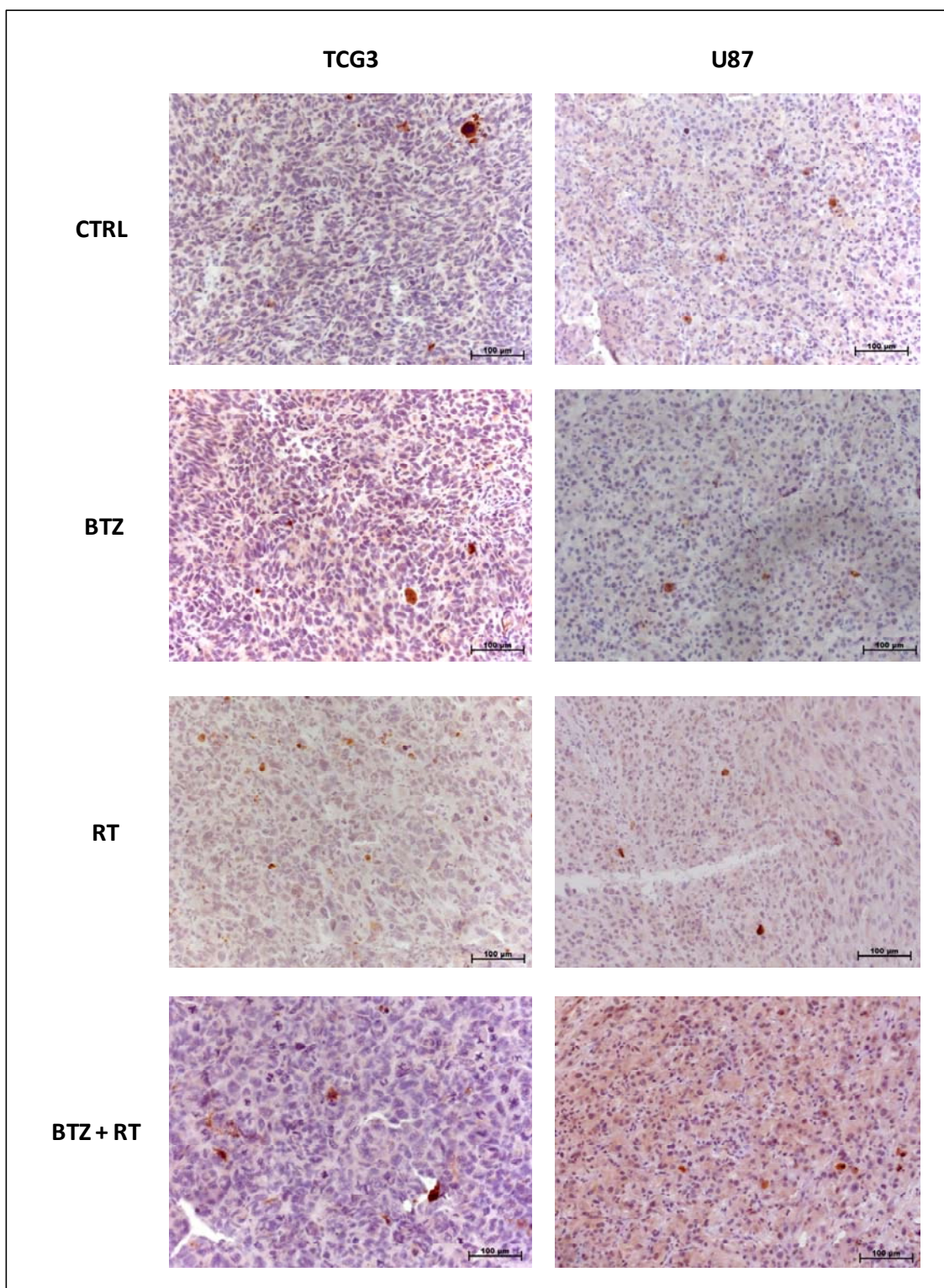


Figure 31 : Effets des traitements fractionnés sur le marquage immunohistochimique de la caspase-3 clivée. Le cytoplasme des cellules marquées positivement apparaît en brun-rouge. Les photographies présentées sont représentatives de chaque groupe. Grossissement x 200.

Pour chaque tumeur, l'indice apoptotique a été déterminé en comptant le nombre de cellules marquées pour 1000 cellules comptées, à l'exclusion des zones de nécrose, comme cela a été préalablement décrit par notre groupe (277). La figure 32 présente les résultats que nous avons obtenus.

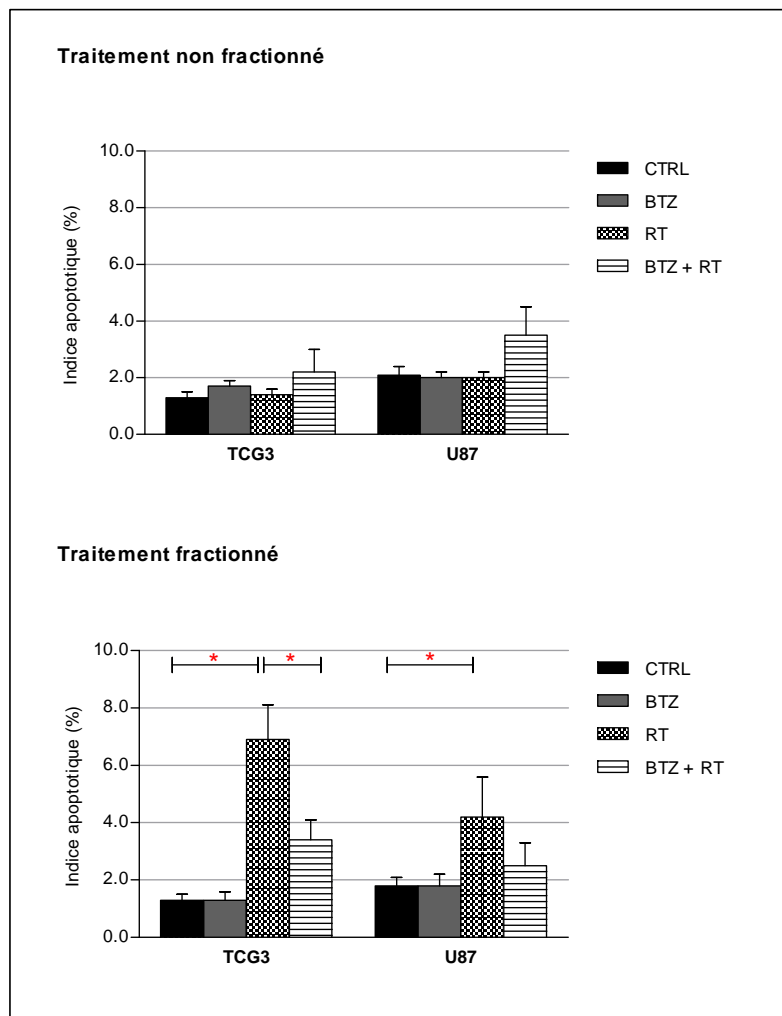


Figure 32 : Impact des traitements sur l'indice apoptotique moyen. Les résultats sont présentés sous la forme "moyenne \pm erreur-standard". n = nombre de tumeurs par groupe, $n \geq 4$ pour tous les groupes.
* $p < 0,05$.

De façon globale, les deux modèles utilisés présentent un indice apoptotique sans traitement très faible, inférieur ou égal à 2% de l'ensemble des cellules tumorales.

Effet du traitement non fractionné

Nos résultats montrent que, quels que soit le traitement administré et la lignée considérée, il n'y a pas de variation de l'indice apoptotique moyen à 24h dans les conditions de traitement non fractionné. Pour les deux lignées, le traitement par l'association BTZ + RT provoque une augmentation de l'indice apoptotique par rapport au groupe CTRL (passage de 1,3% à 2,2% pour la lignée TCG3 et de 2,1% à 3,5% pour la lignée U87), même si la différence entre les groupes BTZ + RT et CTRL n'atteint pas le seuil de significativité statistique.

Effet du traitement fractionné

Pour les deux lignées étudiées, nos résultats montrent que le bortézomib administré seul ne modifie pas l'indice apoptotique (1,3% vs. 1,3% pour la lignée TCG3 et 1,8% vs. 1,8% pour la lignée U87). A l'inverse, la radiothérapie induit une augmentation significative de l'indice apoptotique par rapport à celui des tumeurs CTRL : l'indice apoptotique est de 6,9% et de 4,2% pour les lignées TCG3 et U87, ce qui correspond respectivement à la multiplication par 5,3 et par 2,5 de l'indice apoptotique du groupe CTRL. Nos données montrent également que l'administration concomitante de bortézomib à la radiothérapie diminue l'indice apoptotique par rapport au groupe recevant uniquement la radiothérapie (indice apoptotique à 3,4% et 2,5% pour les lignées TCG3 et U87, respectivement). Cette diminution est même significative dans le cas de la lignée TCG3.

III. Effets des traitements sur l'activité chymotrypsine-like du protéasome

A. Effets du bortézomib sur l'activité chymotrypsine-like du protéasome

1. Etude d'injections uniques

a. Effets du bortézomib sur l'activité chymotrypsine-like du protéasome

Nous avons cherché à évaluer l'effet du bortézomib sur sa cible, à savoir l'activité chymotrypsine-like du protéasome au niveau tumoral en administrant des doses uniques et croissantes de bortézomib à des souris porteuses de tumeurs TCG3 et U87. Au cours de cette étude, nous avons testé trois doses de bortézomib (0,25 - 0,45 - 0,90 mg/kg) et l'activité chymotrypsine-like du protéasome a été évalué 2h et 24h après l'injection (Figure 33).

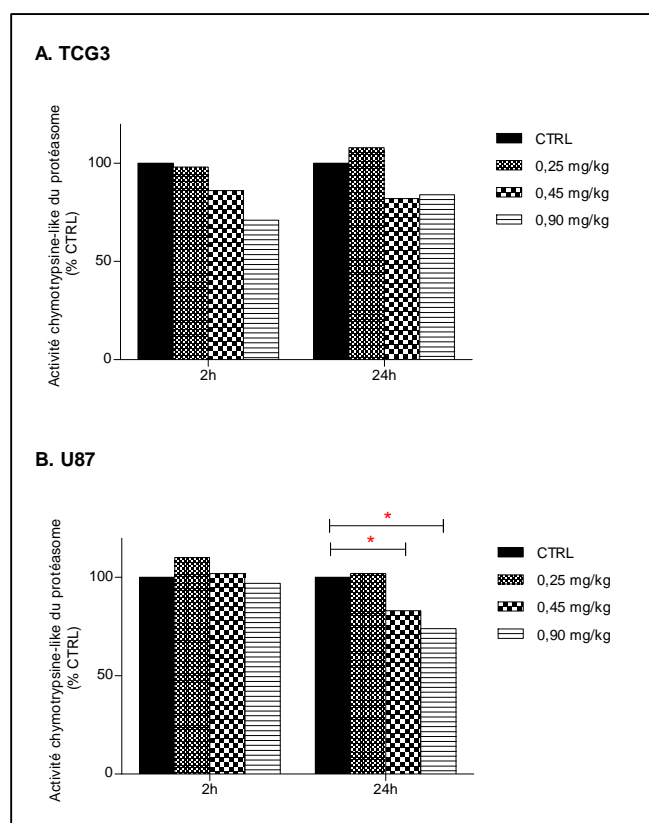


Figure 33 : Effet du bortézomib en injection unique sur l'activité chymotrypsine-like médiane du protéasome au niveau tumoral. n = nombre de tumeurs par groupe $n \geq 4$ pour tous les groupes. * $p < 0,05$. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au groupe CTRL.

Pour les deux lignées étudiées, nos résultats montrent que le bortézomib permet d'obtenir une inhibition dose-dépendante de l'activité chymotrypsine-like du protéasome au niveau tumoral. Dans les deux cas, la dose de 0,25 mg/kg n'a aucun effet sur l'activité du protéasome. Pour la lignée TCG3, la différence entre les groupes traités et le groupe CTRL n'atteint pas le seuil de significativité statistique, quelle que soit la dose de bortézomib considérée. Il est probable que la grande variabilité intra-groupe observée soit responsable de cette absence de différence statistique. Pour la lignée U87, l'activité chymotrypsine-like du protéasome est significativement réduite 24 heures après une injection de bortézomib à la dose de 0,45 ou 0,90 mg/kg. Pour nos deux lignées, nos résultats montrent que le bortézomib, même administré à la dose de 0,90 mg/kg, permet de réduire l'activité basale du protéasome d'environ 30%.

b. Effets du bortézomib sur l'expression des protéines ubiquitinylées

Nous avons cherché dans un second temps à évaluer si les effets du bortézomib sur l'activité chymotrypsine-like du protéasome se répercutaient sur l'expression des protéines ubiquitinylées. Pour cela, nous avons utilisé une approche par western blot en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre l'ubiquitine humaine. Nous avons évalué les effets du BTZ sur l'expression des protéines ubiquitinylées à la dose la plus élevée de bortézomib, soit 0,90 mg/kg (Figure 34).

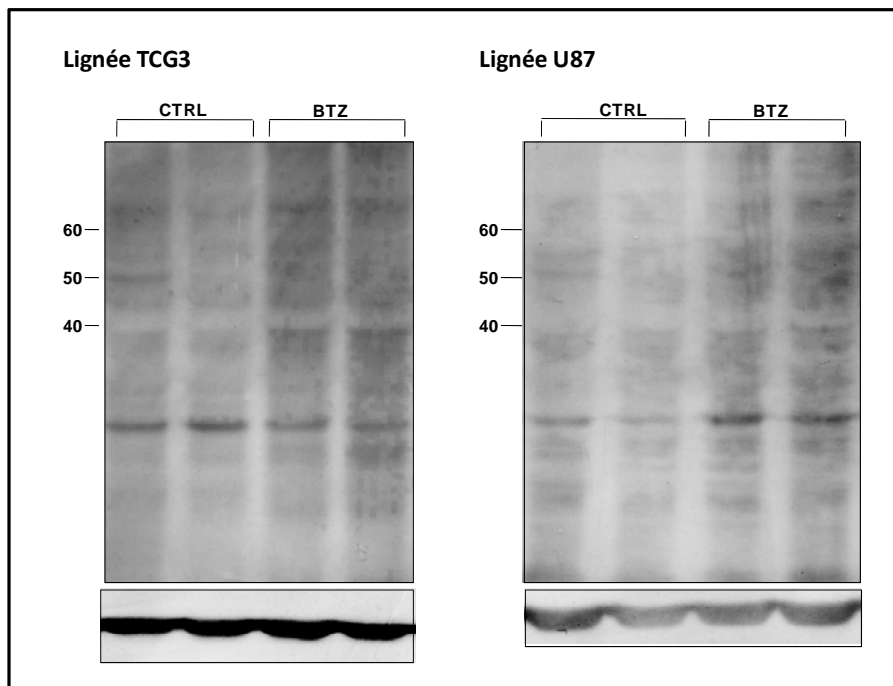


Figure 34 : Effet du bortézomib (0,90 mg/kg x 1) sur l'expression des protéines ubiquitinylées 24h après l'injection de BTZ. Le poids moléculaire (en kDa) est indiqué à gauche des gels

Après numérisation des films photographiques, nous avons effectués une semi-quantification des "traces" obtenues à l'aide du logiciel ImageJ (NIH Image). La figure 35 présente les résultats obtenus.

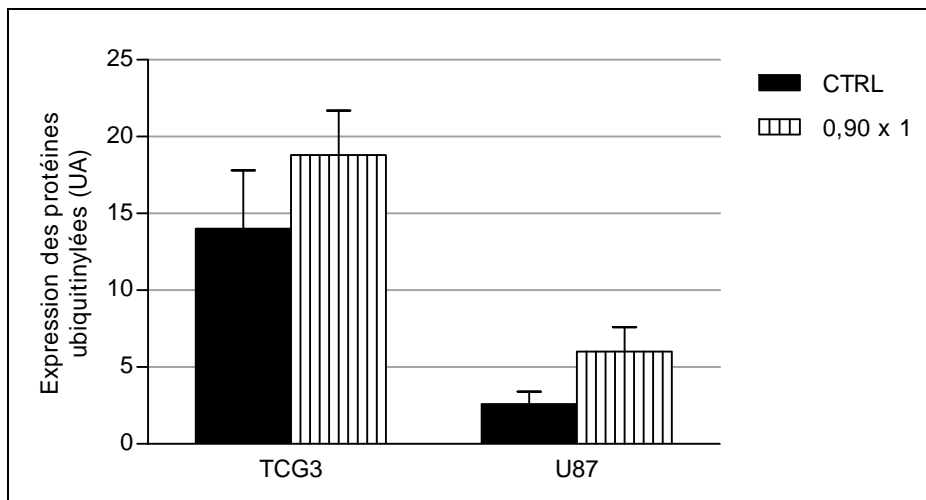


Figure 35 : Expression des protéines ubiquitinylées 24h après une injection iv de BTZ à 0,90 mg/kg. L'intensité de la "trace" correspondant aux protéines ubiquitinylées a été rapportée à l'intensité de la bande de β -actine grâce au logiciel ImageJ. UA : Unités Arbitraires

Pour les deux lignées étudiées, nos résultats montrent une augmentation de l'expression des protéines ubiquitinylées lorsque les tumeurs sont traitées par une injection de bortézomib à 0,90 mg/kg. Ces données sont cohérentes avec celles obtenues lors de l'évaluation de l'activité chymotrypsine-like du protéasome qui montraient une réduction des capacités de protéolyse du protéasome pour une dose de 0,90 mg/kg.

2. Etude d'injections répétées

a. Effets du bortézomib sur l'activité chymotrypsine-like du protéasome

Nous avons ensuite étudié les effets du bortézomib administré en injections répétées selon le schéma suivant : 0,45 mg/kg x 2/semaine (injections iv à J0 et J3 correspondant au schéma utilisé dans l'étude d'efficacité antitumorale). La figure 36 présente les résultats que nous avons obtenus 24 h après la dernière injection pour ce type de traitement (l'effet d'une injection unique à 0,90 mg/kg est donné comme contrôle).

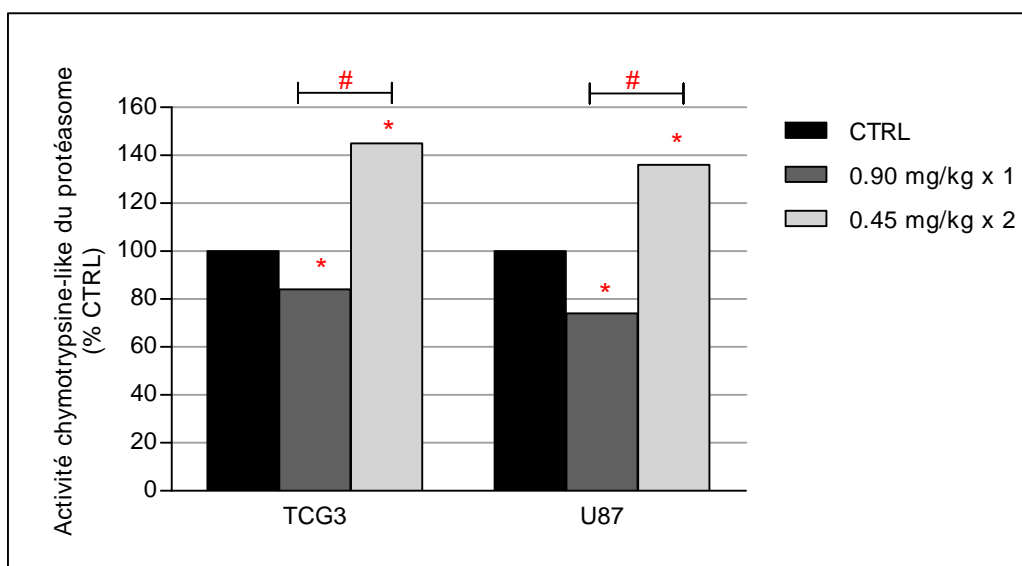


Figure 36 : Effets du fractionnement de la dose de bortézomib sur l'activité chymotrypsine-like médiane du protéasome. n = nombre de tumeurs par groupe n ≥ 4 pour tous les groupes. * p < 0,05. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au groupe CTRL.

Pour les deux lignées étudiées, nos résultats montrent que le fractionnement d'une dose de 0,90 mg/kg en 2 injections à 0,45 mg/kg, administrés selon notre schéma thérapeutique, provoque une augmentation de l'activité chymotrypsine-like du protéasome (entre 30 et 40% de l'activité basale des tumeurs CTRL). Cette augmentation d'activité est significative non seulement par rapport au groupe CTRL mais aussi par rapport aux tumeurs recevant une seule injection à 0,90 mg/kg.

b. Effets du bortézomib sur l'expression des protéines ubiquitinylées

Nous avons ensuite évalué l'expression des protéines ubiquitinylées par western blot pour les groupes CTRL et BTZ (0,45 mg/kg x 2) (Figure 37).

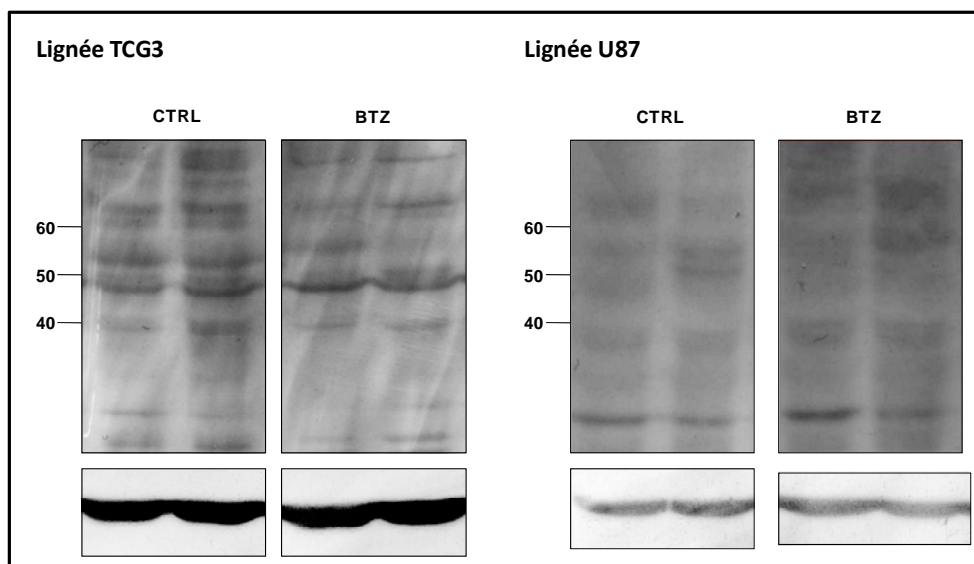


Figure 37 : Effet du bortézomib (0,45 mg/kg x 2) sur l'expression des protéines ubiquitinylées. Le poids moléculaire (en kDa) est indiqué à gauche des gels.

A l'aide du logiciel ImageJ, nous avons semi-quantifié l'expression des protéines ubiquitinylées après numérisation des films autoradiographiques (Figure 38).

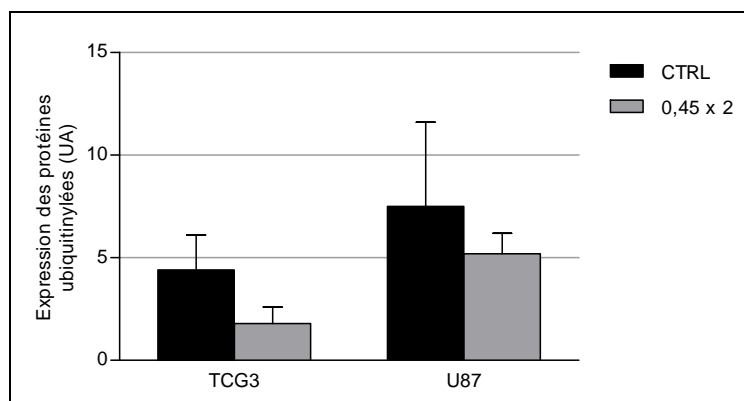


Figure 38 : Expression des protéines ubiquitinylées 24h après deux injections iv de BTZ à 0,45 mg/kg. L'intensité de la "trace" correspondant aux protéines ubiquitinylées a été rapportée à l'intensité de la bande de β -actine. UA : Unités Arbitraires

Nos résultats montrent que, pour les deux lignées étudiées, l'administration du bortézomib selon le schéma fractionné conduit à une diminution de l'expression des protéines

ubiquitinylées. Ces résultats sont cohérents avec les données obtenues en mesurant l'activité chymotrypsine-like du protéasome.

B. Effets de la radiothérapie, associée ou non au bortézomib, sur l'activité chymotrypsine-like du protéasome

1. Effets de la radiothérapie sur l'activité chymotrypsine-like du protéasome

Le protéasome n'est pas considéré comme une cible "classique" des radiations ionisantes. Quelques études dans la littérature rapportent toutefois les effets de la radiothérapie sur l'activité du protéasome. C'est l'équipe de Pajonk, et coll. qui a publié le travail le plus abouti sur ce sujet (79, 280, 281). Nous avons donc évalué l'effet de la radiothérapie sur l'activité chymotrypsine-like du protéasome sur nos deux modèles selon les deux modes d'irradiation choisis (Figure 39).

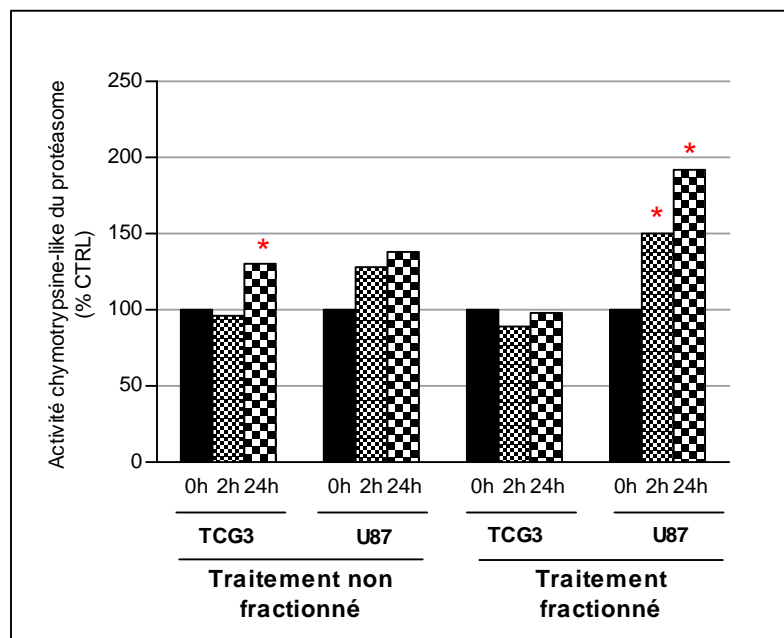


Figure 39 : Effets de la radiothérapie fractionnée ou non sur l'activité chymotrypsine-like médiane du protéasome. n = nombre de tumeurs par groupe n ≥ 4 pour tous les groupes. * p < 0,05. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au groupe CTRL.

Nos résultats montrent que les deux lignées se comportent différemment en termes d'activité chymotrypsine-like du protéasome sous l'effet de la radiothérapie. De façon générale, la radiothérapie se traduit soit par une stabilité, soit par une augmentation de l'activité du protéasome. Dans le cas de la lignée TCG3, l'activité chymotrypsine-like du protéasome est uniquement augmentée au temps 24h après une fraction de 10 Gy. Pour les autres conditions de traitement évaluées, l'activité du protéasome n'est pas significativement différente de celle du groupe CTRL. Les effets les plus marqués de nos expérimentations concernent la lignée U87 recevant 5 fractions consécutives de 2 Gy. Dans ce cas, nous observons une augmentation significative de l'activité chymotrypsine-like du protéasome 2h et 24h après la dernière fraction d'irradiation, l'activité étant presque doublée au temps 24h. Le traitement non fractionné induit également une augmentation de l'activité mais l'intensité des effets est nettement moins importante et le seuil de significativité statistique n'est pas atteint.

2. Effets du bortézomib sur l'activité chymotrypsine-like du protéasome radio-induite

Nous avons ensuite cherché à déterminer si le bortézomib était capable d'atteindre sa cible sur des tumeurs radiothérapées, c'est-à-dire si le bortézomib était susceptible de réduire l'activité chymotrypsine-like du protéasome radio-induite (Figure 40).

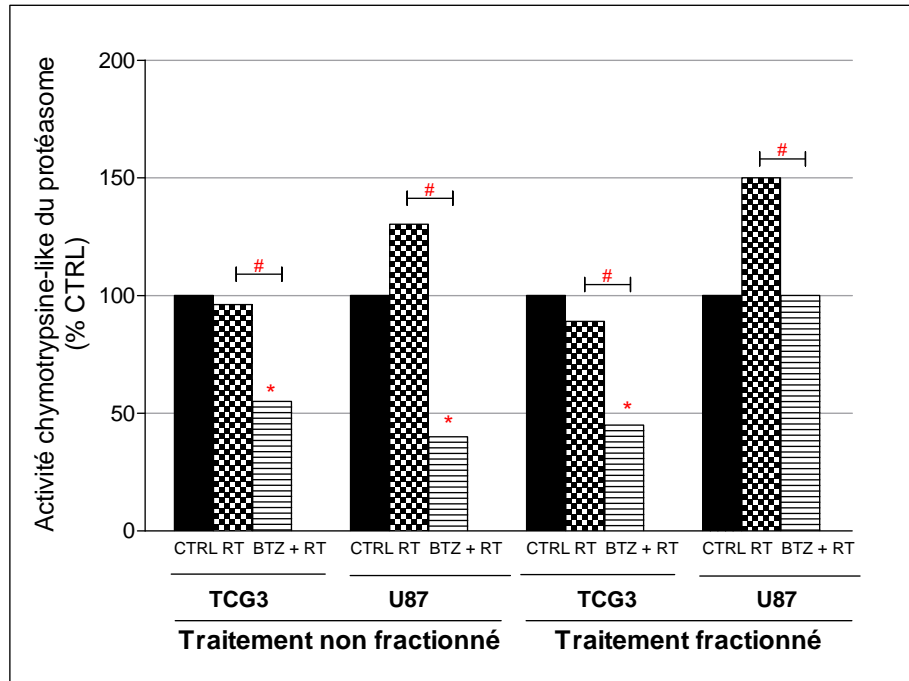


Figure 40 : Effets du bortézomib sur l'activité chymotrypsine-like médiane du protéasome radio-induite 2h après la dernière fraction d'irradiation. n = nombre de tumeurs par groupe $n \geq 4$ pour tous les groupes. * vs. CTRL $p < 0,05$; # vs. RT $p < 0,05$. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au groupe CTRL.

Nos résultats montrent que quels que soient la lignée ou le mode de fractionnement considérés, le bortézomib administré de façon concomitante à la radiothérapie atteint sa cible et provoque une diminution significative de l'activité chymotrypsine-like du protéasome par rapport au groupe RT seule. Cet effet est important puisque l'activité du protéasome est réduite à environ 50% de l'activité du groupe CTRL dans 3 cas sur 4. Ainsi, pour la lignée TCG3 recevant le schéma de traitement fractionné, l'activité chymotrypsine-like du protéasome passe de 89% du CTRL pour le groupe RT à 45% pour le groupe BTZ + RT.

IV. Effets des traitements sur l'activation du facteur de transcription NF- κ B

L'objectif de nos travaux est d'étudier les propriétés radiosensibilisantes du bortézomib sur deux modèles de gliome malin humain. D'après les données de la littérature, le facteur de transcription NF- κ B est une des cibles responsables des phénomènes de radiosensibilisation par les inhibiteurs de protéasome (203, 255, 259). En outre, l'activation de NF- κ B est sous la dépendance directe du protéasome *via* la dégradation de I κ B. Nous avons donc décidé d'étudier l'expression des formes actives de p65 et de p50 sous l'effet de nos différents traitements. Pour cela nous avons utilisé deux kits commercialisés par Active Motif permettant de quantifier l'expression des formes actives de p65 et de p50, c'est-à-dire des formes capables de se fixer à l'ADN. Afin de vérifier l'activité transcriptionnelle des complexes NF- κ B contenant p65 et p50, nous avons ensuite étudié l'expression des transcrits des gènes cibles de NF- κ B par RT-PCR quantitative (TNF α et IL-6).

A. Expression basale des sous-unités p65 et p50 de NF- κ B

Dans un premier temps, nous avons étudié l'état d'activation des sous-unités p65 et p50 du facteur de transcription NF- κ B dans les deux modèles de xénogreffes utilisés par rapport à du tissu cérébral humain sain (Figure 41).

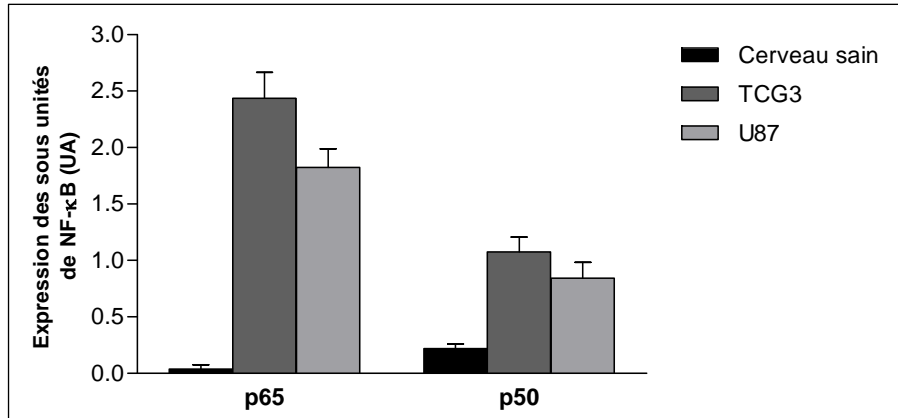


Figure 41 : Expression moyenne de p65 et de p50 sous forme active à l'état basal : comparaison du cerveau humain sain à 2 modèles de gliome malin humain xéno greffés. n = nombre d'organe par groupe ; Cerveau humain sain n = 2 ; TCG3 n = 11 ; U87 n = 10.

Nos résultats montrent que les deux sous-unités de NF-κB sont nettement plus exprimées dans les deux modèles TCG3 et U87, comparativement au cerveau sain normal. Nos lignées présentent des niveaux d'expression comparable pour chacune des deux sous-unités.

B. Effets de la radiothérapie fractionné ou non sur l'activation de NF-κB

Nous avons ensuite exploré les conséquences de la radiothérapie fractionnée ou non sur l'état d'activation de NF-κB. Les animaux ont été sacrifiés 2h ou 24h après la dernière irradiation et les tumeurs ont été immédiatement congelées à -80°C.

1. Expression des formes actives de p65 et p50

Les effets de la radiothérapie sur l'expression des formes actives de p65 et de p50 pour les deux modèles de gliome étudiés sont présentés figure 42.

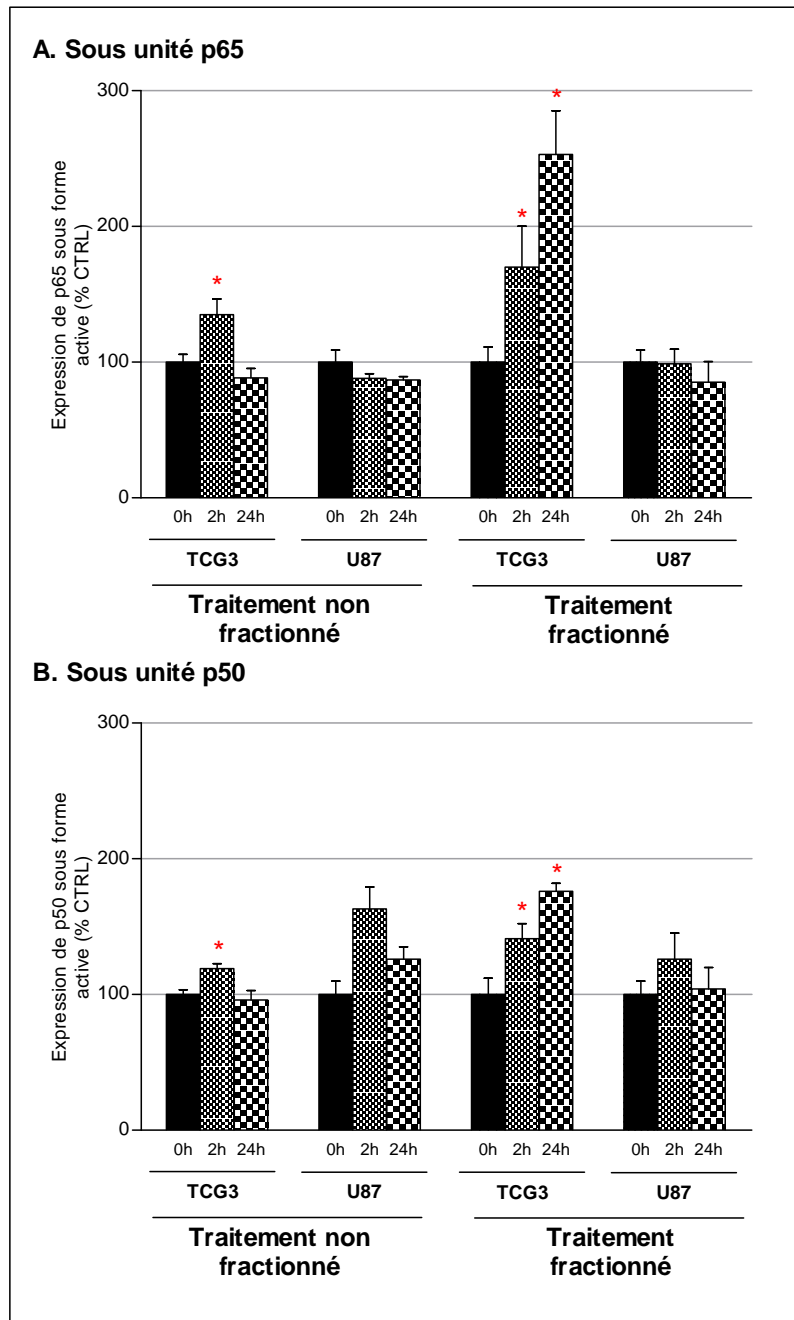


Figure 42 : Effets de la radiothérapie sur l'expression des formes actives de p65 (A) et p50 (B). Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage d'expression moyenne (\pm erreur standard) par rapport au groupe CTRL. $n =$ nombre de tumeurs par groupe $n \geq 4$ pour tous les groupes. * $p < 0,05$.

Expression de p65

Nos résultats montrent que la réponse à la radiothérapie en termes d'expression de p65 sous forme active diffère pour les deux modèles de xénogreffes étudiés. **Pour la lignée TCG3**, nos

résultats montrent que la radiothérapie administrée à raison de 1 fraction de 10 Gy induit une augmentation significative de l'expression de la forme active de p65 au temps 2h (augmentation à 135% par rapport au groupe CTRL) avant de revenir à son taux d'expression basal à 24h. De plus la radiothérapie fractionnée induit une augmentation significative de l'expression de p65 sous forme active par rapport au groupe CTRL. Cette augmentation est présente aussi bien 2h que 24h après la dernière fraction d'irradiation (augmentations respectives à 170% et 250% du taux d'expression de p65 sous forme active par rapport au groupe CTRL). **Pour la lignée U87**, la radiothérapie ne provoque que des modifications non significatives de l'expression de p65 sous forme active par rapport aux tumeurs non traitées.

Expression de p50

En ce qui concerne l'expression de la forme active de p50, nos résultats montrent que les deux modèles se comportent également de façon différente. En effet, **pour la lignée TCG3**, la radiothérapie provoque une augmentation de l'expression de p50. Cette augmentation est transitoire dans le cas du traitement non fractionné et est mise en évidence uniquement au temps 2h (119% par rapport au groupe CTRL). En revanche, l'augmentation de l'expression de la forme active de p50 est plus stable en condition de traitement fractionné (augmentations significatives à 141% et à 176% du niveau d'expression de p50 sous forme active à 2h et 24h par rapport au groupe CTRL). **Dans le cas de la lignée U87**, la radiothérapie induit des réponses très variables en ce qui concerne l'expression de la forme active de p50. Même si nos expérimentations ne mettent en évidence aucune variation significative de cette expression par rapport au groupe CTRL, la réponse générale après radiothérapie dans cette lignée montre plutôt une tendance à l'augmentation de l'expression de p50.

Bilan des effets de la radiothérapie sur l'activation de NF-κB

Pour la lignée TCG3, l'ensemble de nos données, montrant des augmentations parallèles de p65 et de p50, suggère la formation de complexes NF-κB p65-p50 sous l'effet de la radiothérapie. Il semble en outre que cette réponse soit plus intense lorsque le traitement est fractionné selon un schéma "clinique". En revanche, la lignée U87 présente des réponses beaucoup plus discrètes et il semble que la radiothérapie, fractionnée ou non, n'induisse pas de variations majeures de l'activation de NF-κB.

2. Effets de la radiothérapie sur l'expression des gènes cibles de NF- κ B (lignée TCG3)

En raison d'un nombre insuffisant d'échantillons, seule une étude pilote de RT-PCR quantitative a été réalisée sur la lignée U87 et n'a pas montré pas de variation significative de l'expression des gènes cibles de NF- κ B, en cohérence avec les résultats obtenus pour l'expression des formes actives de p65 et p50. Afin de vérifier que les complexes NF- κ B mis en évidence pour la lignée TCG3 sous radiothérapie sont transcriptionnellement actifs, nous avons étudié l'expression des gènes codant pour le TNF α et l'IL-6 par RT-PCR quantitative (Figure 43).

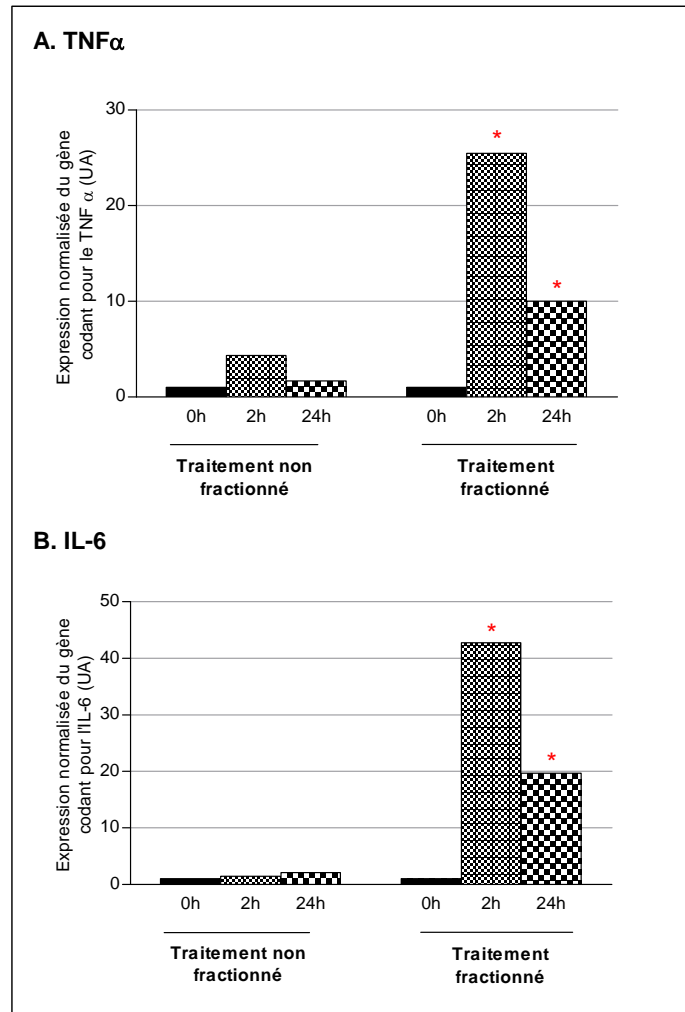


Figure 43 : Effet de la radiothérapie sur l'expression médiane des gènes codant pour le TNF α (A) et l'IL-6 (B). Les résultats sont normalisés par rapport à l'expression du gène de la β -actine. $n =$ nombre de tumeurs par groupe $n \geq 4$ pour tous les groupes ; UA = Unités Arbitraires. * $p < 0,05$ par rapport au groupe CTRL.

Sous l'effet de la radiothérapie non fractionnée, nos résultats montrent que l'expression des gènes cibles de NF- κ B ne varie pas significativement par rapport au groupe CTRL, que l'analyse soit effectuée 2h ou 24h après l'administration de la radiothérapie.

Nos résultats montrent également que l'expression des gènes cibles de NF- κ B augmente significativement sous l'effet de la radiothérapie fractionnée aussi bien 2h que 24h après la dernière fraction d'irradiation. Pour le gène codant pour le TNF α , ces augmentations sont

respectivement de 15 et 9 fois l'expression des gènes des tumeurs CTRL. Pour le gène codant pour l'IL-6, la radiothérapie provoque une augmentation de l'expression jusqu'à 42 fois celle des tumeurs CTRL.

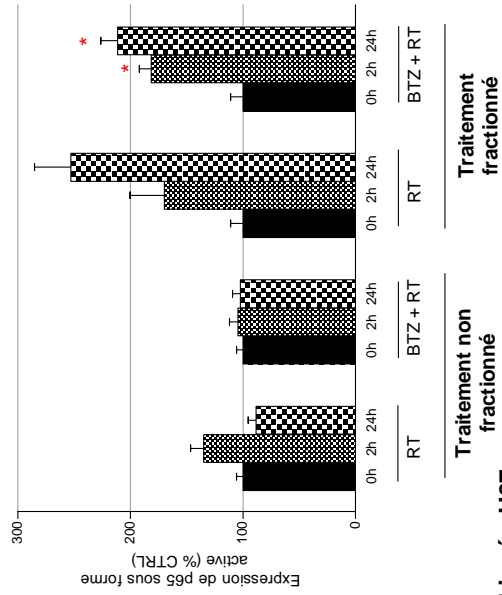
C. Effets de l'association concomitante BTZ + RT sur l'activation de NF- κ B

Le protéasome étant responsable de la dégradation de I κ B, et donc de l'activation de NF- κ B, nous avons étudié l'impact de l'administration concomitante bortézomib-radiothérapie sur l'activation de NF- κ B, à la fois en évaluant les expressions de p65 et de p50 sous forme active et en quantifiant l'expression des gènes codant pour le TNF α et l'IL-6.

1. Expression des formes actives de p65 et p50

La figure 44 présente l'effet de l'association BTZ + RT sur l'expression de p65 et de p50 sous forme active pour les deux lignées étudiées.

A. Lignée TCG3



B. Lignée U87

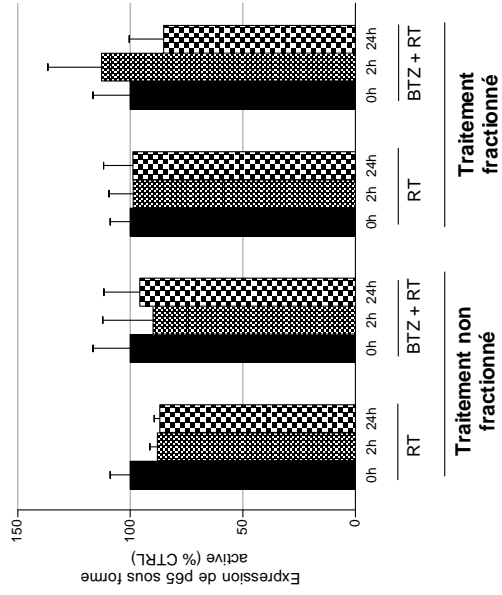


Figure 44 : Effets de la radiothérapie associée ou non au bortézomib sur l'expression des formes actives de p65 et p50 pour les lignées TCG3 (A) et U87 (B). Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage d'expression moyenne (\pm erreur-standard) par rapport au groupe CTRL. n = nombre de tumeurs par groupe n = 4 pour tous les groupes. * vs. CTRL $p < 0,05$; # vs. RT $p < 0,05$.

Lignée TCG3

En ce qui concerne le traitement non fractionné, nos résultats montrent que l'administration concomitante BTZ + RT ne se traduit par aucune variation significative de l'expression de la forme active de p65, par rapport à la fois au groupe CTRL et au groupe RT. En revanche, l'expression de la forme active de la sous-unité p50 augmente de façon significative après l'association BTZ + RT, aussi bien 2h que 24h après l'irradiation (augmentations respectives à 183% et à 226%). Cette augmentation est également significative par rapport au groupe RT : pour le groupe BTZ + RT, l'expression de la forme active de p50 est multipliée par 1,53 à 2h et par 2,35 à 24h par rapport au groupe recevant la radiothérapie seule.

Dans le cas du traitement fractionné, l'expression de la forme active de p65 est augmentée significativement 2h et 24h après la dernière fraction d'irradiation pour le groupe BTZ + RT (augmentations respectives à 182% et à 211%). Toutefois, cette augmentation n'est pas significative par rapport au groupe RT seule. De plus, l'association concomitante bortézomib-radiothérapie provoque une augmentation massive de l'expression de p50 sous forme active (entre 300% et 400% de l'expression des tumeurs du groupe CTRL). Ceci représente une augmentation significative par rapport au groupe traité par RT seule : pour le groupe BTZ + RT, l'expression de la forme active de p50 est multipliée par 2,70 à 2h et par 1,95 à 24h par rapport au groupe RT.

Lignée U87

Dans le cas du traitement non fractionné, nos résultats montrent que la radiothérapie ne provoque aucune variation de l'expression de la forme active de p65 par rapport au groupe CTRL. En revanche, l'association BTZ + RT diminue d'environ 40% l'expression de p50 sous forme active par rapport au groupe CTRL. Cette réduction est également significative par rapport au groupe recevant la radiothérapie seule.

Nos données montrent que le **traitement fractionné** ne provoque aucune modification de l'expression des formes actives des sous-unités p65 et p50 par rapport au groupe CTRL, que l'analyse soit réalisée 2h ou 24h après la dernière irradiation.

Bilan des effets de l'association BTZ + RT sur l'activation de NF- κ B

De façon générale, nos données montrent que l'expression de la forme active de la sous-unité p65 ne varie que faiblement sous l'effet des traitements administrés, comparativement à la sous-unité p50 dont l'expression semble beaucoup plus inductible. En outre, nos deux lignées se comportent différemment sous l'effet des traitements : si les tumeurs de la lignée TCG3 présentent des variations importantes de l'expression des deux sous-unités constitutives de NF- κ B, la lignée U87 se caractérise par une quasi absence d'effets significatifs. En ce qui concerne la lignée TCG3, nos résultats mettent en évidence une augmentation significative de l'expression de la sous-unité p50 par rapport au groupe RT seule, que le traitement soit fractionné ou non. Cette augmentation est beaucoup plus importante dans le cas du traitement fractionné.

2. Effets du bortézomib sur l'expression radio-induite des gènes cibles de NF- κ B (lignée TCG3)

Nous avons ensuite vérifié l'activité transcriptionnelle de NF- κ B pour la lignée TCG3 en quantifiant par RT-PCR en temps réel l'expression des gènes codant pour l'IL-6 et le TNF α (Figure 45). En ce qui concerne la lignée U87, là encore seules des études pilotes ont été réalisées et les résultats obtenus n'ont pas montré de différence significative entre le groupe cTRL et le groupe recevant l'association BTZ + RT.

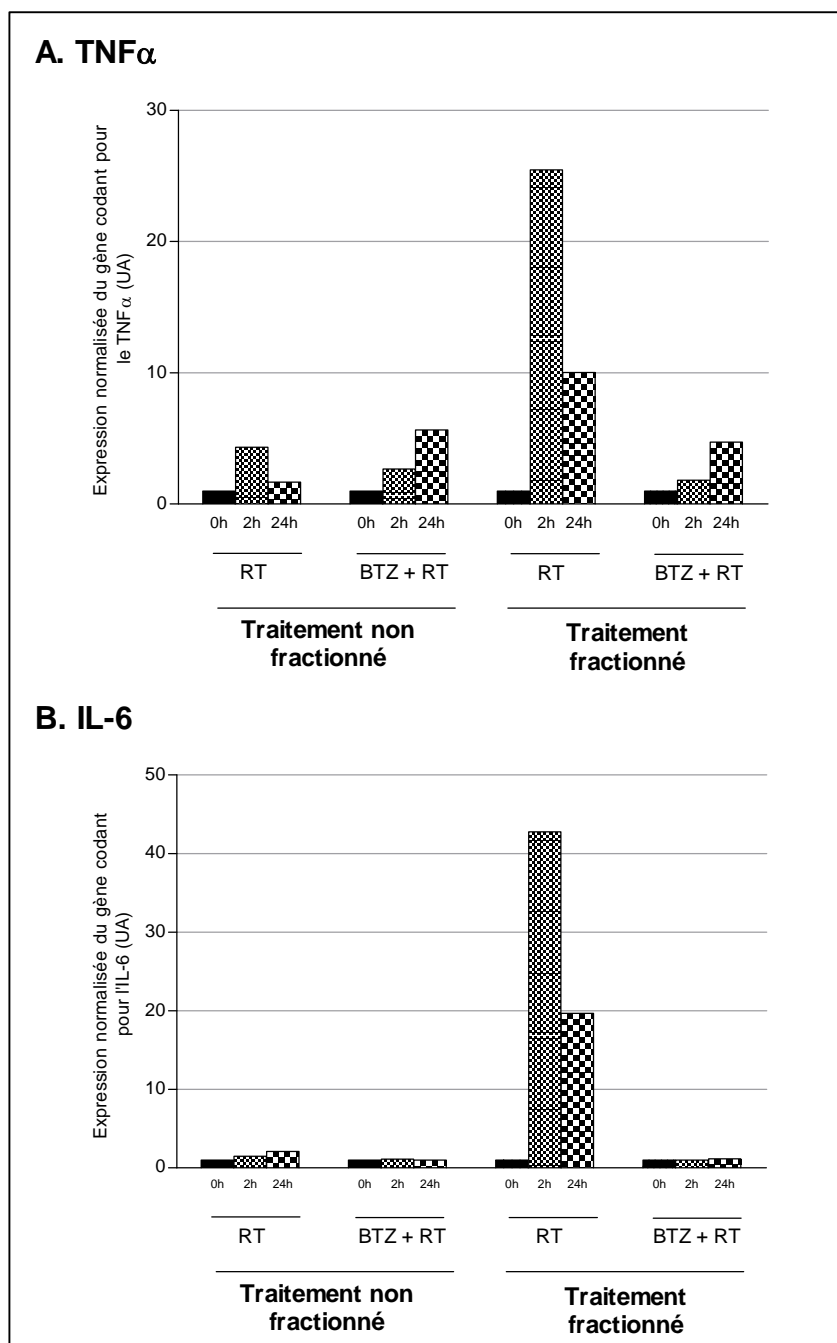


Figure 45 : Effet de la radiothérapie sur l'expression médiane des gènes codant pour le TNF α (A) et l'IL-6 (B). Les résultats sont normalisés par rapport à l'expression du gène de la β -actine. n = nombre de tumeurs par groupe n \geq 4 pour tous les groupes ; UA = Unités Arbitraires.

Nos données montrent que, quels que soit le mode de fractionnement ou le temps d'analyse considérés, l'association BTZ + RT n'induit aucune variation significative de l'expression des gènes cibles de NF- κ B par rapport au temps 0h. Pour le traitement non fractionné, la transcription des gènes codant pour le TNF α et de l'IL-6 n'est pas modifiée, que les tumeurs

soient traitées par radiothérapie seule ou associée au bortézomib. En outre, dans le cas du traitement fractionné, les résultats obtenus dans le groupe BTZ + RT contrastent avec les effets observés après radiothérapie seule. En effet, après radiothérapie seule, nos données montrent une augmentation massive de la transcription des gènes codant pour le TNF α et l'IL-6 par rapport au groupe CTRL. Il semble que l'administration concomitante de bortézomib abolisse la transcription radio-induite des gènes cibles de NF- κ B.

V. Bilan de l'ensemble des résultats

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus au cours de cette étude est récapitulé dans le tableau XXVI.

Tableau XXVI : Bilan de l'ensemble des résultats obtenus

	Traitement non fractionné					Traitement fractionné						
	TCG3			U87		TCG3			U87			
	Variations vs. CTRL			Variations vs. CTRL		Variations vs. CTRL			Variations vs. CTRL			
	BTZ	RT	BTZ + RT	BTZ	RT	BTZ + RT	BTZ	RT	BTZ + RT	BTZ	RT	BTZ + RT
Etude de radiopotentialisation												
RCT médian (jours)	-1,0	50,0	65,5	3,0	42,0	61,0	0,5	45,0	42,0	-1,0	34,0	31,0
Ratio de radiopotentialisation		1,34			1,36		0,92			0,94		
Prolifération cellulaire												
Marquage IHC Ki-67	= (2%)	↗ (16%)	↗ (6%)	= (3,2%)	↘ (13,7%)	= (6%)	↘ (13%)	↗ (19%)	↗ (10%)	↘ (12%)	↘ (27%)	↘ (7%)
Cycle cellulaire	= (4%)	↗ (38%)	↗ (12%)	↗ (12%)	= (4%)	↗ (9%)	= (2%)	↗ (13%)	↗ (37%)	↗ (5%)	= (2%)	↗ (10%)
Apoptose												
Marquage IHC caspase-3 clivée	= (0,4%)	= (0%)	↗ (0,9%) NS	= (0,1%)	= (0,1%)	↗ (1,4%) NS	= (0%)	↗ (5,6%)	↗ (2,1%)	= (0%)	↗ (2,4%)	↗ (0,7%)
Activité du protéasome												
Activité chymotrypsine-like	↘ (16%)	↗ (30%)	↘ (50%)	↘ (26%)	↗ (28%)	= (2%)	↗ (62%)	= (2%)	↘ (43%)	↗ (36%)	↗ (50%)	= (0%)
Voie de NF-κB												
Expression de p65	nd	↗ (35%)	= (5%)	nd	= (12%)	= (10%)	nd	↗ (70%)	↗ (82%)	nd	= (1%)	= (13%)
Expression de p50	nd	↗ (19%) NS	↗ (86%)	nd	↗ (63%)	↘ (43%)	nd	↗ (41%)	↗ (196%)	nd	↗ (26%) NS	↗ (16%)
ARNm TNFα	nd	↗ (334%) NS	↗ (167%) NS	nd	= (3%)	= (3%)	nd	↗ (2448%)	↗ (82%) NS	nd	= (3%)	= (3%)
ARNm IL-6	nd	↗ (48%) NS	= (13%)	nd	= (3%)	= (3%)	nd	↗ (4177%)	= (3%)	nd	= (3%)	= (3%)

nd : non disponible ; NS : Non Significatif ; ↗ ou ↘ : augmentation ou diminution par rapport au groupe CTRL (le nombre de flèche correspond à l'importance de l'effet observé et est indépendant d'une technique à l'autre) ; = : aucune variation significative ; (=) : résultats d'études pilotes.

Chapitre 8 : Discussion

Chapitre 8 : Discussion

I. Choix du modèle et des conditions de traitement

Pour des raisons de coûts et de simplicité, la majorité des études précliniques visant à évaluer l'efficacité antitumorale d'une molécule sont réalisées *in vitro* sur des cultures de cellules tumorales. En dépit de l'importance scientifique des informations ainsi obtenues, les modèles cellulaires ne rendent pas compte de l'hétérogénéité tumorale et de l'environnement (282). En effet, les essais cliniques ont démontré que ces expérimentations *in vitro* étaient susceptibles de conduire à la sélection de molécules qui ne possèdent pas d'activité antitumorale en clinique. Les conditions *in vitro* ne permettent pas de reproduire l'environnement des cellules tumorales, provoquent des altérations dans l'expression génique et l'acquisition de nouvelles mutations. De plus, les lignées de cellules tumorales cultivées pendant de longues périodes (années voire décennies) présentent une expansion clonale de certaines populations cellulaires et sont certainement très différentes des tumeurs qui ont permis de les établir (283). Il est donc nécessaire, avant d'envisager le passage en phase clinique, de réaliser des expérimentations sur des modèles animaux. En oncologie, la mise en œuvre de modèles de tumeurs implantées chez l'animal permet d'obtenir des informations fondamentales en ce qui concerne la tolérance et l'efficacité antitumorale des traitements, en tenant compte des paramètres physiologiques et physiopathologiques de l'animal (284). Le passage au modèle animal est particulièrement important en ce qui concerne la prédictivité de la réponse aux traitements. En effet, Taghian, et coll. ont montré pour des lignées de glioblastome *multiforme* que les radiosensibilités observées *in vitro* et *in vivo* chez l'animal n'étaient pas systématiquement corrélées (285). Il apparaît en effet difficile d'assimiler une culture monocouche de cellules au système hétérogène en trois dimensions que constitue la tumeur. L'utilisation du modèle

animal apparaît donc comme un préalable indispensable à l'évaluation clinique de l'intérêt des nouvelles thérapies.

Aucun modèle animal actuellement disponible ne permet une extrapolation directe à l'Homme des résultats obtenus au cours des études précliniques. Néanmoins, l'animal constitue un modèle intermédiaire qui permet de pallier les limites éthiques et médicales de la recherche clinique puisqu'il offre la possibilité d'évaluer l'activité potentielle des traitements sans toxicité pour le patient. Récemment ont été développés des modèles d'animaux transgéniques, principalement des souris, capables de développer des tumeurs, en particulier des gliomes de haut grade (286). Ces animaux sont issus de manipulations génétiques leur permettant de surexprimer (ou de ne pas exprimer selon les cas) une protéine impliquée dans la gliomagenèse. Ces modèles apportent des résultats particulièrement pertinents en ce qui concerne l'étude des effets d'un traitement sur une voie de signalisation particulière et constituent d'excellents systèmes pour évaluer le potentiel des molécules de thérapie ciblée (287). Parmi leurs inconvénients, on note leur coût, leur difficulté d'obtention et le développement de tumeurs comportant une, voire deux, anomalies génétiques, ce qui ne reflète pas la complexité et l'hétérogénéité classiques d'une tumeur (288, 289). En revanche, les souris *nude*, capables de tolérer les greffes de tissus humains, apparaissent comme des modèles de choix pour étudier les effets des nouveaux agents de chimiothérapie sur des tumeurs d'origine humaine (290). De plus, en dépit des inconvénients des xéno greffes, dans le cas de tumeurs de différents types histologiques (adénocarcinomes du sein et du côlon, carcinomes bronchiques, mélanomes malins et rhabdomyosarcomes pédiatriques), de très bonnes corrélations ont été observées entre les réponses à la chimiothérapie obtenues chez l'Homme et les réponses obtenues sur les mêmes tumeurs xéno greffées chez des rongeurs immunodéficients (291).

Nous avons ainsi choisi de travailler sur deux modèles de gliome de haut grade xéno greffés chez la souris *nude*. Il s'agit de deux gliomes de grade III, les lignées U87 et TCG3 (respectivement, astrocytome anaplasique et oligoastrocytome anaplasique selon la classification de l'OMS). Les xéno greffes d'origine humaine présentent l'avantage majeur de correspondre aux types histologiques d'intérêt, même si des différences subsistent avec la tumeur d'origine chez le patient. En effet, le système vasculaire et le stroma de la tumeur transplantée sont d'origine murine (290). Nous avons choisi de démarrer les traitements lorsque les tumeurs atteignent un volume de $250 \pm 50 \text{ mm}^3$, volume correspondant à une

tumeur "en place", ayant développée un stroma et un réseau vasculaire lui assurant une croissance exponentielle, et volume suffisamment important pour être mesuré sans importante marge d'erreur.

Il est en outre très important d'étudier les effets des traitements à des doses et selon des schémas pertinents au regard de la pratique clinique chez l'Homme. Néanmoins, les conditions de doses et de fractionnement cliniques ne sont que très rarement pratiquées dans les études précliniques. Les effets de hautes doses administrées une seule fois peuvent difficilement être extrapolés aux effets de doses plus faibles et administrées à plusieurs reprises, et ce aussi bien pour la chimiothérapie que pour la radiothérapie (275). En effet, un mode d'administration unique ne permet pas de prendre en compte la réponse des cellules tumorales survivantes et l'influence de cette réponse sur la fraction de traitement suivante. Dans le cas de nos expérimentations, nous avons choisi d'utiliser un fractionnement de la radiothérapie correspondant à celui administré chez l'Homme (2 Gy /j) (38). De même, nous avons choisi de traiter les animaux pendant une durée de deux semaines, tout en respectant les deux jours correspondant au week-end, ce qui correspond au premier tiers du traitement des gliomes malins par radiothérapie chez l'Homme (2 Gy/j, 5 jours/7 pendant 6 semaines, pour une dose totale de 60 Gy). En ce qui concerne le bortézomib, nous avons transposé la dose et le schéma thérapeutique indiqués dans l'AMM de ce médicament pour le traitement des patients atteints de myélome multiple en rechute, soit 1,3 mg/m² x 2/semaine, correspondant à 0,45 mg/kg x 2/semaine chez la souris (167). Les études de radiopotentialisation utilisant le bortézomib rapportées dans la littérature mettent toutes en œuvre des modes d'administration unique, aussi bien pour la chimiothérapie que pour la radiothérapie. Afin de déterminer si le fractionnement des traitements influençait les propriétés radiosensibilisantes du bortézomib, nous avons testé un schéma thérapeutique dit "non fractionné" qui consiste, aussi bien pour le bortézomib que pour la radiothérapie, en la condensation de la dose totale hebdomadaire en une seule administration par semaine. Dans ce cas, les souris reçoivent une seule fraction de radiothérapie (10 Gy) par semaine et une seule injection de bortézomib (0,90 mg/kg) par semaine.

II. Effets du bortézomib *in vivo*

A. Absence d'efficacité antitumorale

Les inhibiteurs de protéasome constituent une nouvelle classe de médicaments anticancéreux. Une seule molécule est actuellement commercialisée (bortézomib, Velcade[®]), mais d'autres produits sont en cours de développement préclinique et clinique (par exemple, en essais cliniques, Salinosporamide A, NEOS H101, CEP18770) (66). Dès son introduction en essai clinique, le bortézomib a montré un potentiel très important chez les patients atteints de myélome multiple (241). Au niveau préclinique, les effets des inhibiteurs de protéasome ont été étudiés sur divers types cellulaires, en particulier sur des lignées de gliomes et de gliosarcomes. Le tableau XXVII rapporte les principales études publiées.

Tableau XXVII : Inhibiteurs de protéasome dans des modèles de gliomes et de gliosarcomes.

Référence	Lignées	Modèle	Inhibiteur de protéasome utilisé	Principales conclusions
Kitagawa, et coll. (292)	U87, T98G	<i>in vitro</i>	Lactacystine, AcLLNal	Induction d'apoptose par les 2 drogues, indépendamment de la voie mitochondriale
Wagenknecht, et coll. (293)	LN-18, LN-229, LN-308	<i>in vitro</i>	Calpaïne inhibitor 1, lactacystine, MG132	Induction d'apoptose indépendante de p53 et p21
Wagenknecht, et coll. (294)	LN-18, LN-308	<i>in vitro</i>	MG132, lactacystine	Induction d'apoptose <i>via</i> la voie mitochondriale
Tani, et coll. (295)	U87, T98G	<i>in vitro</i>	Lactacystine, AcLLNal	Induction d'apoptose <i>via</i> la voie Fas
Laurent, et coll. (296)	gliosarcome 9L, gliome GL15	<i>in vitro et in vivo</i>	Ritonavir	Effets cytotoxique et cytostatique <i>in vitro</i> Pas d'effet <i>in vivo</i>
Yin, et coll. (297)	U87, T98G, U118 et explants de glioblastome	<i>in vitro</i>	Bortézomib	Arrêt du cycle cellulaire en G2/M et induction d'apoptose
Legnani, et coll. (298)	gliosarcome 9L, gliome F98	<i>in vitro et in vivo</i>	Lactacystine	Cytotoxicité <i>in vitro</i> Amélioration de la survie des rats porteurs de tumeurs 9L intracérébrales
Yu, et coll. (299)	U251, D37	<i>in vitro</i>	Bortézomib, MG132	Cytotoxicité synergique avec le sorafenib
Styczynski, et coll. (300)	T98G, U373	<i>in vitro</i>	Bortézomib	Activité cytotoxique du bortézomib (IC50 : 28 nM et 48 nM, respectivement)
La Ferla-Brühl, et coll. (301)	U87, T98G, U118, U138, U373, A172, LN-18, LN-229	<i>in vitro</i>	MG132	Sensibilisation à l'apoptose induite par TRAIL
Koschny, et coll. (302)	LN215, explants d'astrocytomes (grades I à IV)	<i>in vitro</i>	Bortézomib	Sensibilisation à l'apoptose induite par TRAIL
Kardosh, et coll. (303)	LN-229, U251, T98G, U87	<i>in vitro</i>	Bortézomib	Activité cytotoxique du bortézomib (IC50 : 5 nM à 10 nM). Induction d'apoptose par stress du réticulum endoplasmique

Yu, et coll. (304)	U251, U87, D37 + cultures primaires	<i>in vitro</i>	Bortézomib	Induction d'apoptose
--------------------	--	-----------------	------------	----------------------

AcLLNal : Acetyl-Leucinyl-Leucinyl-Norleucinal, TRAIL : TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand

La majorité des études publiées ont été réalisées *in vitro* et décrivent des effets cytotoxiques (principalement *via* une induction d'apoptose) sur divers modèles de tumeurs cérébrales. Seules 2 études rapportent les effets *in vivo* d'un inhibiteur de protéasome sur des xénogreffes de gliome et de gliosarcome (296, 298). Ces deux études rapportent des résultats contradictoires : Laurent, et coll. (296) décrivent une absence d'activité cytotoxique *in vivo* pour le ritonavir, alors que Legnani, et coll. (298) ont démontré que la lactacystine conduisait à une amélioration de la survie de rats porteurs de gliosarcome 9L.

En ce qui concerne le bortézomib, seules 6 études, parmi les 13 recensées, décrivent les effets de cette molécule sur des lignées de gliome malin, uniquement sur des modèles *in vitro* (210, 297, 300, 302-304). Plus particulièrement, Yin, et coll. (297) ont publié l'étude la plus détaillée et décrivent l'exposition au bortézomib de lignées cellulaires (notamment la lignée U87) et d'explants de gliomes malins et s'intéressent aux effets moléculaires et cellulaires provoqués par ce traitement. Ainsi, ces auteurs ont démontré que le bortézomib inhibait la prolifération des lignées de gliomes malins (notamment en bloquant le cycle cellulaire en phase G2/M). De plus, le bortézomib a confirmé ses propriétés pro-apoptotiques sur ces mêmes modèles, induisant l'apoptose pour 40% de la population cellulaire traitée. **A notre connaissance, aucune étude n'a rapporté les effets du bortézomib sur des xénogreffes de gliome malin humain.**

Au cours de nos expérimentations, nous avons montré que le bortézomib, administré selon nos conditions de traitement fractionné, ne possède pas d'efficacité antitumorale sur les xénogreffes de gliomes malins humains que nous avons étudiées : aucun retard de croissance par rapport au groupe CTRL n'a été mis en évidence. Le fractionnement du traitement par bortézomib n'a aucun impact sur l'activité antitumorale du bortézomib. Ces résultats ne confirment pas les données encourageantes obtenues au cours des études *in vitro*. Plusieurs arguments peuvent expliquer ces différences. D'abord, nous avons évalué les effets antitumoraux d'une dose hebdomadaire de bortézomib correspondant à celle prescrite chez l'Homme dans le cadre du traitement des patients atteints de myélome multiple en rechute.

Une augmentation de la dose de bortézomib est difficilement justifiable d'un point de vue clinique. En effet, le schéma indiqué chez l'Homme n'est pas toujours bien toléré par les patients et les effets indésirables du bortézomib (thrombopénie, neuropathies périphériques) nécessitent fréquemment la réduction de la dose de bortézomib (30% des patients), voire l'arrêt total du traitement (140, 163). Ainsi, une intensification de la dose de bortézomib ne semble pas correspondre à une option clinique et ne se justifie donc pas dans le cadre de nos études en recherche translationnelle. Par ailleurs, nos résultats montrent que l'administration d'une dose par semaine de bortézomib n'induit pas de meilleurs résultats au regard de l'efficacité antitumorale. Les gliomes malins sont des tumeurs caractérisées par une grande chimiorésistance (305) et les essais cliniques concernant le bortézomib seul administré chez des patients atteints de tumeurs solides se sont systématiquement révélés négatifs (227). Au vu de ces résultats cliniques négatifs, l'absence de retard de croissance observée au cours de nos expérimentations pour le bortézomib apparaît moins surprenante. Les divergences entre nos résultats et ceux de la littérature *in vitro* concernant l'intérêt du bortézomib dans le traitement des gliomes malins soulignent l'importance de réaliser des études précliniques *in vivo*. Même si nos données, obtenues seulement à partir de 2 modèles de gliome, ne sont pas définitivement généralisables, les études que nous avons réalisées montrent que l'efficacité antitumorale du bortézomib *in vivo* est beaucoup moins satisfaisante que ne le laissaient présager les études *in vitro*.

B. Effets biologiques du bortézomib

L'incapacité du bortézomib à ralentir la croissance tumorale nous a conduits à étudier les effets de cette molécule sur sa cible, à savoir l'activité chymotrypsine-like du protéasome. Les études précliniques et cliniques ont montré que le bortézomib présente une distribution importante et est rapidement éliminé du compartiment vasculaire. Ainsi, la corrélation entre la concentration plasmatique de bortézomib et le degré d'inhibition du protéasome dans les échantillons sanguins n'est pas significative. Un essai pharmacodynamique a donc été développé, qui permet d'évaluer l'activité chymotrypsine-like du protéasome aussi bien au niveau du sang total, que des globules blancs ou des tissus (306).

Nous avons utilisé cet essai afin d'évaluer l'impact du bortézomib sur l'activité chymotrypsine-like du protéasome. Le bortézomib, dans nos conditions de traitement, ne présente qu'un potentiel inhibiteur limité pour les deux modèles de gliome malin étudiés. S'il permet d'obtenir une inhibition dose-dépendante de l'activité du protéasome, l'amplitude de cette inhibition reste faible. En effet, après une injection unique, la réduction de l'activité du protéasome n'atteint au maximum que 30% de l'activité basale dans les tumeurs, et ce avec une dose de 0,90 mg/kg. En outre, nous avons évalué l'expression des protéines ubiquitinyllées par western blot et nos résultats sont cohérents avec les données obtenues avec la mesure de l'activité chymotrypsine-like du protéasome. Il est à noter que la dose de bortézomib à 0,90 mg/kg correspond au double de la dose indiquée chez l'Homme, soit 2,6 mg/m² (167).

D'autres auteurs ont déjà décrit un relativement faible degré d'inhibition du protéasome au niveau tumoral pour plusieurs inhibiteurs de protéasome comparativement aux autres tissus. Ces constatations ont été rapportées aussi bien pour le bortézomib (174, 178), que pour le salinosporamide A (307). Ainsi, au cours de travaux étudiant les effets du bortézomib sur un modèle de myélome multiple xéno greffé sur souris *nude*, Leblanc, et coll. (174) ont montré que, pour une dose de 1 mg/kg, le bortézomib inhibait à 80% l'activité chymotrypsine-like du protéasome dans les organes de la souris (sang total, foie, rate) alors que l'inhibition n'atteignait que 35% pour le tissu tumoral. Toutefois, cette dose de bortézomib induisait une diminution de la croissance tumorale sur le modèle utilisé, en dépit du faible degré d'inhibition de l'activité du protéasome. Dans le cas de nos travaux, nous n'avons constaté aucun effet du bortézomib sur la croissance tumorale des xéno greffes. L'"importance" de l'activité chymotrypsine-like du protéasome dans la survie cellulaire semble type tumoral dépendant.

Au cours de nos expérimentations, nous avons également montré que l'administration successive de deux injections de bortézomib, selon la dose et le schéma thérapeutique pratiqué en clinique (à J0 et J3), conduisait à une augmentation significative de l'activité chymotrypsine-like du protéasome par rapport au groupe CTRL. Ces résultats inattendus ont été retrouvés sur les deux lignées de gliome malin que nous avons utilisées. Les phénomènes de résistance aux inhibiteurs de protéasome ont été rapportés lors d'essais cliniques. Ainsi, plusieurs études cliniques ont montré que des patients initialement répondeurs au bortézomib développaient une résistance à ce produit (68, 73). Les mécanismes impliqués dans la

résistance au bortézomib ne sont pas actuellement entièrement élucidés. Parmi ces mécanismes, un des plus étudiés implique les protéines de choc thermique (notamment Hsp27), qui sont activées en cas d'inhibition du système ubiquitine-protéasome. Les protéines de choc thermique jouent le rôle de chaperones moléculaires et modulent les voies apoptotiques, notamment celles impliquant les mitochondries, ce qui confère une protection vis-à-vis des agents de chimiothérapie (247). D'autres études ont montré que la protéine p38-MAPK pouvait également être impliquée dans les phénomènes de résistance au bortézomib (245). Enfin, Oerlemans, et coll. rapportent que l'exposition chronique de macrophages humains au bortézomib conduit à l'acquisition d'une résistance à ce produit. Le mécanisme sous-jacent repose sur l'induction d'une mutation au niveau de la sous-unité du protéasome ciblée par le bortézomib, associée à une surexpression massive de cette sous-unité (246). Il serait intéressant dans le cadre de nos expérimentations d'évaluer l'expression des protéines de choc thermique de type Hsp27, ainsi que l'expression des différentes sous-unités catalytiques du protéasome afin de déterminer les causes de l'augmentation de l'activité chymotrypsine-like du protéasome.

En outre, des travaux plus fondamentaux rapportent que l'inhibition de l'activité du protéasome induit l'expression des gènes codant pour les différentes sous-unités du protéasome 26S. Ainsi, dans une étude sur des cellules de muscle lisse vasculaire, Meiners, et coll. (308) ont montré que le traitement par des inhibiteurs de protéasome (époxomicine, MG132, ALLM, clasto-lactacystine β lactone) induisait à la fois l'expression des gènes des sous-unités constitutives du protéasome, mais aussi l'expression de protéines impliquées dans la maturation des protéasomes, assurant ainsi la formation *de novo* de protéasomes fonctionnels. Il semble donc que les cellules développent une réponse adaptative au stress causé par l'inhibition, même partielle, du protéasome en induisant la formation de nouveaux protéasomes et en retrouvant ainsi leurs capacités de protéolyse. Des constatations identiques ont été effectuées par Xu, et coll. (309) sur des cellules mammaires humaines tumorales. Ces auteurs ont démontré que le bortézomib et le MG132 provoquaient une augmentation de l'expression des sous-unités protéasomiques.

A notre connaissance, une seule étude dans la littérature rapporte des résultats similaires aux nôtres concernant les effets d'inhibiteurs de protéasome sur l'activité chymotrypsine-like. Dans cette étude, Lee, et coll. (310) ont exposé des cultures primaires de neurones murins et ont constaté que l'utilisation de faibles doses d'inhibiteurs de protéasome (MG132,

époxomicine, clasto-lactacystine β -lactone) induisait une augmentation de l'activité du protéasome et qu'il fallait dépasser un certain seuil de concentration pour obtenir une inhibition du protéasome. Il semble donc que les inhibiteurs de protéasome, au moins pour certains types cellulaires, présentent une réponse biphasique : à faible dose, ils induisent une augmentation de l'activité du protéasome, alors qu'à doses plus importantes, l'inhibiteur joue pleinement son rôle. Les conséquences biologiques (notamment en ce qui concerne l'induction d'apoptose) de cette réponse biphasique ont été étudiées *in vitro* sur différents types cellulaires, tumoraux ou non (Tableau XXVIII).

Tableau XXVIII : Effets dose-dépendants des inhibiteurs de protéasome. Adapté d'après Meiners, *et coll.* (311)

Type cellulaire	Effet de fortes doses	Effet de faibles doses	Références
Cellules tumorales			
Cellules lymphoïdes humaines U937	50 μ M MG132 pendant 7h : induction d'apoptose	Prétraitement avec 1,5 μ M de MG132 pendant 4,5h : protection par rapport à l'apoptose induite par le TNF α	Lin, et coll. 1998
Adénocarcinome de prostate de rat AT-3	20 μ M MG132 : induction d'apoptose dans les cellules infectées ou non par le virus Sindbis (SV)	Prétraitement avec 200 nM de MG132 : inhibition de l'apoptose induite par le SV	Stasiolek, et coll. 2000
Cellules neuronales			
Cellules gliales C6	Lactacystine à doses > 1,7 μ M : inhibition de la production de NO induite par le LPS	Lactacystine à dose comprise entre 50 et 800 nM : stimulation de la production de NO induite par le LPS	Stangl, et coll. 2004
Cellules endothéliales			
Cellules endothéliales d'artère pulmonaire de veau CPAE	MG132 > 0,5 μ M : diminution de l'expression basale des eNOS	MG132 à dose comprise entre 50 et 250 nM : augmentation de l'expression des eNOS	Meiners, et coll. 2006
HUVEC	200 nM MG132 ou 10 nM MG262 pendant 24h : induction d'apoptose	70 nM MG132 ou 4 nM MG262 pendant 24h : réponse protectrice vis-à-vis de l'apoptose	Kisselev, et coll. 2006

Ces études montrent que, à faibles doses, les inhibiteurs de protéasome jouent un rôle protecteur vis-à-vis de l'apoptose induite par d'autres agents, alors qu'à des doses plus importantes, les inhibiteurs retrouvent leur rôle d'inducteurs d'apoptose. Sur nos deux modèles de gliome malin, le bortézomib, quel que soit le mode d'administration, s'est avéré incapable d'augmenter le pourcentage de cellules apoptotiques par rapport aux tumeurs non traitées, ce qui est cohérent avec la superposition des deux courbes représentant l'évolution du volume tumoral pour les groupes CTRL et BTZ.

Par ailleurs, Kisselev, et coll. (89) ont démontré que la mesure de(s) l'activité(s) du protéasome n'était pas corrélée avec la dégradation effective des protéines. Ainsi, sur des cellules Hela, ces auteurs montrent que le traitement par bortézomib permet de réduire de 75% l'activité chymotrypsine-like du protéasome alors que le taux de protéines effectivement dégradées n'est diminué que de 10-30%. Ces données concordent avec celles déjà rapportées par Bence, et coll. (312). En outre, Kisselev, et coll. ont montré qu'il est nécessaire d'inhiber deux des activités du protéasome afin de réduire de plus de 50% la dégradation des protéines (157). Il n'en reste pas moins que, dans le cas des cellules de myélome, le bortézomib arrête la croissance et provoque l'apoptose, en dépit de cette dégradation des protéines relativement limitée. Ceci peut s'expliquer par le fait que le protéasome joue un rôle prépondérant dans le myélome, non seulement en participant à l'activation de NF- κ B, indispensable à la survie de ces cellules, mais également en éliminant les immunoglobulines produites de façon aberrante (157). Dans le cadre de nos expérimentations, il serait intéressant d'évaluer l'effet du bortézomib sur les deux autres activités du protéasome.

Enfin, même s'ils sont rapides et facile à mettre en œuvre, les essais utilisant des substrats fluorogéniques présentent un certain nombre d'inconvénients. En effet, ils ne permettent pas de distinguer les différences entre activités constitutives du protéasome et activités de l'immunoprotéasome. En outre, ces essais nécessitent, préalablement à la mesure de l'activité, une étape de lyse cellulaire qui est susceptible d'interférer avec les mécanismes régulateurs modulant l'activité du protéasome dans les cellules intactes (313, 314). C'est pour ces raisons que de nouveaux essais plus spécifiques ont été développés. Ces tests sont basés sur l'association d'un inhibiteur irréversible et spécifique d'une des activités du protéasome avec un fluorophore. Ce système permet, après une étape d'électrophorèse la détection dans un gel des différentes sous-unités du protéasome. Ce type d'essais a été évalué aussi bien sur des cultures cellulaires que *in vivo* (315-317). De plus, Kraus, et coll. (314) ont utilisé un essai de

ce type sur des cellules leucémiques humaines. Leurs travaux démontrent que l'activité du protéasome est augmentée dans certains, mais pas tous, prélèvements de patients atteints de leucémie. Ces données contrastent par rapport à ce qui est classiquement décrit dans la littérature où les tumeurs sont présentées comme possédant des activités du protéasome accrues par rapport aux tissus sains correspondants (73, 169). Enfin, ces auteurs ont évalué l'effet du bortézomib sur les trois activités du protéasome et leurs résultats démontrent que le *ratio* entre l'activité chymotrypsine-like et la somme des activités trypsine-like et caspase-like reflètent la sensibilité de lignées leucémiques humaines au bortézomib. Ainsi, il semble que la mesure unique de l'activité chymotrypsine-like du protéasome ne puisse être corrélée à la sensibilité au bortézomib, les deux autres activités étant capables de compenser la perte d'une des activités protéolytiques. Ceci participerait à l'émergence de résistances secondaires chez des patients traités avec de faibles doses de bortézomib sur de longues périodes.

III. Intérêt du bortézomib comme agent radiosensibilisant

A. Impact négatif du fractionnement sur les propriétés radiosensibilisantes du bortézomib

Les gliomes malins sont une pathologie incurable et aucune amélioration véritablement significative de la survie n'a été mise en évidence au cours des dernières décennies (318). De nouvelles stratégies thérapeutiques et/ou le perfectionnement des traitements existants sont donc nécessaires afin d'améliorer la survie des patients, limitée actuellement à environ 15 mois (18). Le type histologique le plus malin (glioblastome *multiforme*) est caractérisé par une invasion à distance : des cellules tumorales sont retrouvées jusqu'à plusieurs centimètres dans le parenchyme cérébral sain (2), ce qui rend d'autant plus difficile l'obtention d'une guérison grâce à la chirurgie et à la radiothérapie qui sont des traitements focalisés. Parmi l'ensemble des stratégies en cours d'évaluation, l'utilisation de protocoles de radiochimiothérapie concomitante semble prometteuse. En effet, la radiothérapie fait partie intégrante de la prise en charge thérapeutique des gliomes malins. Lors de la récurrence, la progression tumorale a lieu dans 80 % des cas dans une marge de 2-3 cm par rapport à la lésion initiale, ce qui correspond également à la zone cérébrale ayant reçu la radiothérapie (2, 319). Ceci suggère que l'efficacité de la radiothérapie, aux doses classiquement utilisées, n'est

pas suffisante pour stériliser totalement le lit tumoral. Une augmentation des doses de radiothérapie est difficilement envisageable, du fait de la toxicité des radiations ionisantes sur le parenchyme cérébral sain chez l'adulte et encore plus chez l'enfant (39, 320, 321). Ainsi une stratégie associant un agent radiosensibilisant au schéma classique de radiothérapie est susceptible d'améliorer le contrôle local et de retarder la survenue de la récurrence.

Depuis 2005, l'introduction du témozolomide dans le standard thérapeutique des gliomes de haut grade constitue une nouvelle étape dans la prise en charge des patients (43). Auparavant, la chimiothérapie, principalement à base de nitroso-urées, était administrée en tant que thérapie adjuvante et son intérêt en termes d'amélioration de la survie était soumis à controverse (38). L'AMM accordée au témozolomide administré concomitamment à la radiothérapie a "officialisé" l'intérêt des associations radio-chimiothérapie concomitantes pour le traitement des gliomes de haut grade. Néanmoins, le bénéfice ainsi apporté reste modeste et des efforts sont à poursuivre dans ce domaine.

L'inhibition du protéasome est un nouveau concept thérapeutique en oncologie : la mise sur le marché du bortézomib, seule molécule commercialisée de cette nouvelle famille, date de 2003 (172). L'efficacité de cette molécule a considérablement amélioré le pronostic des patients atteints de myélome multiple (163). En outre, diverses études précliniques ont montré que les inhibiteurs de protéasome en général, et le bortézomib en particulier, possédaient des propriétés radiosensibilisantes (203, 259, 264, 267). Nous avons donc choisi d'évaluer l'intérêt d'associer bortézomib et radiothérapie de façon concomitante sur des greffes de gliomes malins humains chez la souris *nude*.

Dans les conditions de traitement non fractionné, nos résultats montrent que le bortézomib améliore de façon très marquée l'efficacité antitumorale de la radiothérapie sur les deux modèles de gliome malin utilisés. En effet, les *ratios* de radiopotentialisation atteignent respectivement 1,34 et 1,36 pour les lignées TCG3 et U87, ce qui reflète les propriétés radiosensibilisantes du bortézomib. En revanche, dans les conditions de traitement fractionné, le bortézomib s'est avéré incapable de potentialiser l'efficacité antitumorale de la radiothérapie (*ratios* de radiopotentialisation de 0,92 et 0,94 pour les lignées TCG3 et U87, respectivement), la survie des animaux étant même légèrement réduite dans le cas de l'association BTZ + RT par rapport aux souris traitées par radiothérapie seule. L'ensemble de nos résultats contraste avec les données de la littérature qui décrivent systématiquement un

potentiel radiosensibilisant pour les inhibiteurs de protéasome, aussi bien *in vivo* et qu'*in vitro*.

A notre connaissance, l'impact négatif du fractionnement des traitements sur les propriétés radiosensibilisantes d'une molécule n'a jamais été rapporté dans la littérature. En revanche, notre équipe a préalablement démontré que le fractionnement de la radiothérapie permettait de restaurer le potentiel radiosensibilisant du topotécan sur des xénogreffes de gliomes malins (61).

Il est intéressant de souligner que, pour l'étude *in vivo* rapportant l'association concomitante du bortézomib avec les radiations ionisantes sur un modèle de carcinome colorectal (203), la radiothérapie a été administrée en une seule fraction et la dose utilisée (6 Gy) était nettement supérieure aux doses quotidiennes habituellement prescrites en radiothérapie (1,8 à 3 Gy/fraction) (38). L'impact du fractionnement des traitements n'a pas été étudié au cours de ces travaux. En outre, une analyse plus fine de cette étude apporte des éléments intéressants. En effet, Russo, et coll. (203) ont évalué l'impact de l'association concomitante bortézomib - radiothérapie sur un modèle de cancer colorectal humain (LOVO). Si l'association des deux traitements permet d'augmenter de façon très importante le pourcentage de cellules apoptotiques (CTRL : 4% ; BTZ : 26% ; RT : 18% ; BTZ + RT : 72%), les auteurs ne rapportent aucune différence de volume tumoral entre les différents groupes. Dans les conditions de traitement non fractionné, nos résultats montrent que l'association BTZ + RT conduit à une augmentation (non significative) de l'indice apoptotique par rapport à chaque thérapie prise isolément. Il serait intéressant d'étudier les effets des traitements sur l'induction d'apoptose à des délais plus importants que 24h après la fin des traitements (la très faible intensité des effets observés ne peut expliquer l'amplitude des retards de croissance obtenus lors des études de radiopotentialisation). Cette augmentation modeste ne peut être comparée à celle observée par l'équipe de Russo et reflète l'importante différence de sensibilité du modèle utilisé (carcinome colorectal) par rapport aux nôtres. Les gliomes malins sont en effet décrits comme des tumeurs particulièrement résistantes à l'apoptose (322, 323). Néanmoins, en conditions de traitement fractionné, nous avons constaté que le bortézomib réduisait l'apoptose induite par la radiothérapie sur les deux lignées étudiées. Il est possible que nos tumeurs se trouvent dans la situation où le bortézomib exerce un effet protecteur vis-à-vis de l'apoptose. Celui-ci s'exercerait dès qu'une apoptose est susceptible d'être induite, comme c'est le cas pour le groupe BTZ + RT. Cet effet protecteur est, certainement pour partie, en

lien avec l'augmentation de l'activité chymotrypsine-like du protéasome que nous avons observée après deux injections de bortézomib.

Par ailleurs, Lee, et coll. (310) ont démontré que l'exposition de neurones murins à de faibles concentrations d'inhibiteurs de protéasome diminuait la sensibilité de ces neurones à un stress oxydatif. Il est possible qu'un phénomène identique ait lieu dans le cas de nos xénogreffes, le bortézomib induisant une réponse protectrice vis-à-vis des effets cytotoxiques de la radiothérapie. Dans les conditions de traitement non fractionné, le bortézomib ne provoquerait plus cette réponse protectrice, autorisant l'interaction synergique avec les radiations ionisantes.

Nous avons étudié l'impact des traitements sur l'indice de prolifération des tumeurs TCG3 et U87 par détection immunohistochimique de la protéine Ki-67, comme cela est réalisable en diagnostic clinique (324). Nos résultats montrent, pour les deux lignées étudiées, que ce marquage ne permet pas de mettre en évidence l'impact du fractionnement des traitements sur l'indice de prolifération. En effet, que le traitement soit fractionné ou non, l'administration concomitante de bortézomib conduit systématiquement à un effet inverse de celui de la radiothérapie seule. Pour la lignée TCG3, le pourcentage de cellules positivement marquées pour la protéine Ki-67 diminue par rapport à la radiothérapie, alors qu'il augmente pour la lignée U87. La protéine Ki-67 est exprimée lors des phases G1, S et G2 du cycle cellulaire, ainsi qu'au cours de la mitose. En revanche, les cellules quiescentes (en G0) n'expriment pas Ki-67. Nous avons donc complété nos travaux par une étude de la distribution dans le cycle cellulaire par détection en cytométrie en flux de l'incorporation d'iodure de propidium dans l'ADN. Ces résultats nous ont permis de calculer l'indice de prolifération et apportent des données intéressantes en ce qui concerne la lignée TCG3. En effet, pour cette lignée, nous observons une prolifération accrue par rapport à la radiothérapie dans le cas du traitement fractionné. En revanche, l'association concomitante BTZ + RT administrée de façon non fractionnée provoque une réduction de l'indice de prolifération. Ces résultats sont cohérents avec les données obtenues lors des études de radiopotentialisation. En revanche, pour la lignée U87, la distribution dans le cycle cellulaire n'est pas significativement différente entre les deux conditions de fractionnement. Nous n'avons pas d'explication concernant ces divergences entre les deux lignées. Il est important de souligner que les deux lignées présentent une réponse très différente en terme de prolifération après radiothérapie quelles

que soient les conditions de traitement et que ces phénomènes participent certainement aux différences observées entre les deux modèles.

Seule l'étude de Grimes, et coll. (266) rapporte une étude radiopotentialisation mettant en œuvre un schéma de radiothérapie fractionnée (10 fractions de 3 Gy). Ces travaux réalisés sur un modèle de cancer du poumon non à petites cellules démontrent une synergie d'action pour le groupe recevant l'association MG-132 + radiothérapie, même si la différence de volume tumoral entre les groupes recevant la radiothérapie seule ou associée au bortézomib est difficile à mettre en évidence. Nos résultats en conditions de traitement fractionné sont en contradiction avec cette étude, mais cette divergence peut s'expliquer à la fois par l'utilisation d'un type tumoral et d'un inhibiteur de protéasome différents.

La seule étude de la littérature rapportant des résultats négatifs d'un inhibiteur de protéasome utilisé comme agent radiosensibilisant est celle de Pajonk, et coll. (263) qui décrit une augmentation de la radiorésistance de cellules de carcinome du col de l'utérus en conditions d'hypoxie lorsqu'elles sont traitées de façon concomitante avec le MG-132. Les raisons de cet effet "radioprotecteur" du MG-132 ne sont pas élucidées. Les gliomes malins sont des tumeurs hypoxiques et il a été démontré que cette hypoxie participait à la radiorésistance tumorale (325, 326). En effet, les dommages à l'ADN provoqués par les radiations ionisantes, et notamment les coupures double-brin qui induiront secondairement la mort cellulaire, résultent en grande partie de l'interaction avec des espèces réactives de l'oxygène provenant de la radiolyse de l'eau (327, 328). En présence d'oxygène moléculaire, ces dommages à l'ADN sont stabilisés et difficilement réparables. L'efficacité de la radiothérapie dépend donc de la pression partielle en oxygène au niveau de la tumeur (329). La radiothérapie provoque des modifications de cette hypoxie tumorale. La destruction des cellules tumorales par les radiations ionisantes entraîne une amélioration de l'oxygénation tumorale par effet stérique et conduit ainsi à une meilleure sensibilité des cellules résiduelles à la radiothérapie (50). Au vu des courbes de volume tumoral que nous avons obtenues lors des études de radiopotentialisation, le traitement par radiothérapie non fractionnée provoque une mort cellulaire beaucoup plus importante que lorsque l'irradiation est administré selon un fractionnement clinique (en cours de traitement). Il est donc possible que les tumeurs recevant le traitement non fractionné soient mieux ré-oxygénées que les tumeurs traitées par radiothérapie fractionnée. Une étude de la pression partielle en oxygène au niveau tumoral serait opportune dans ce cas. Il est possible que le bortézomib joue un rôle cytoprotecteur vis-

à-vis des effets de la radiothérapie sur nos modèles de xénogreffes de tumeurs recevant le traitement fractionné. En revanche, en condition de traitement non fractionné, la probable meilleure oxygénation des tumeurs participerait à la radiopotentialisation observée sur les deux modèles.

A un niveau plus moléculaire, nos résultats en RT-PCR quantitative montrent que l'association BTZ + RT ne provoque pas l'induction des gènes cibles de NF- κ B, que le traitement soit fractionné ou non. Il semble donc que le facteur de transcription NF- κ B ne participe pas à la radiopotentialisation provoquée par le bortézomib sur nos deux modèles de gliome malin. Ces données contrastent avec les résultats de Russo, et coll. (203) qui décrivent l'implication de l'inhibition de l'expression de NF- κ B dans l'effet radiosensibilisant du bortézomib sur un modèle de carcinome colorectal. En revanche, Pajonk, et coll. (255) ont démontré que l'absence d'effet du MG-132 sur l'expression de NF- κ B n'empêchait pas la radiosensibilisation par un inhibiteur de protéasome. Kamer, et coll. (265) ont en outre montré sur des modèles de carcinome du col de l'utérus que seules les tumeurs dont la radiosensibilité est dépendante de NF- κ B sont susceptibles d'être radiosensibilisées par le bortézomib. Il est probable que la radiosensibilité des deux modèles de gliome malin utilisés dans notre étude ne soit pas exclusivement dépendante de NF- κ B et que d'autres mécanismes expliquent les phénomènes de radiosensibilisation que nous avons observés dans les conditions de traitement non fractionné. Kurland, et coll. (256) ont montré que la fonctionnalité de la protéine p53 est indispensable à la radiosensibilisation par des inhibiteurs de protéasome sur des cultures cellulaires de lymphome. En ce qui concerne nos modèles, la protéine p53 est normale pour la lignée U87 alors qu'elle est mutée pour la lignée TCG3. Nos deux lignées présentent toutefois la même radiosensibilisation par le bortézomib. L'hypothèse de la fonctionnalité de la protéine p53 n'explique donc pas les phénomènes de radiosensibilisation et de radioprotection que nous avons observés au cours de nos expérimentations.

En conclusion, les causes de la perte du pouvoir radiosensibilisant du bortézomib lors du fractionnement des traitements sont sans doute multiples et difficiles à élucider. Il est très probable que les phénomènes impliqués dans la radioréponse ne soient plus les mêmes ou ne présentent plus la même importance lorsqu'un fractionnement "clinique" est utilisé. Ainsi, Criswell, et coll. (275) soulèvent le problème de la radioréponse (plus précisément la nature des facteurs de transcription radio-induits) des cellules de Mammifères soumises à des doses de radiothérapie pertinentes au regard de la clinique. Ces auteurs ont effectué une revue de la

littérature et concluent que la majorité des études ont été réalisées à des doses supraléthales de radiothérapie et que les conclusions ainsi obtenues ont été généralisées à l'ensemble des doses de radiothérapie. Ils démontrent également que ce type d'extrapolation est incorrect pour tous les facteurs de transcription étudiés et qu'une étude spécifique des effets des faibles doses (≤ 2 Gy) est nécessaire afin de déterminer les événements radio-inductibles.

B. Réponses des tumeurs à la radiothérapie

Nous avons étudié les effets de la radiothérapie tant en termes d'effets sur le volume tumoral que d'effets biologiques et cellulaires. Pour chaque paramètre, nous avons cherché à évaluer l'impact du fractionnement de la radiothérapie. En effet, des études comparant la survie des cellules tumorales *in vitro* après des doses uniques de radiations ionisantes avec la réponse clinique *in vivo* n'ont pas montré de corrélation, rendant indispensable les études des effets de la radiothérapie en condition de traitement fractionné (285, 330).

1. Impact du fractionnement de la radiothérapie sur le volume tumoral

Nous avons étudié l'effet de la radiothérapie sur la croissance tumorale de nos deux modèles de xénogreffes. Nous avons observé, quels que soient la lignée et le mode de fractionnement considéré, qu'après une période de latence au cours de laquelle les tumeurs se stabilisent ou poursuivent leur croissance, le volume tumoral régresse, atteignant même un volume inférieur au volume de début de traitement. Il est possible que l'instabilité génomique provoquée par les radiations ionisantes conduise à une mort cellulaire tardive parmi les générations cellulaires descendantes des cellules ayant survécu à l'irradiation (331, 332).

La phase de recroissance que nous observons à la fin de la période de mesure des tumeurs est le résultat d'une reprise de la prolifération tumorale. Celle-ci peut provenir de l'absence d'élimination des cellules souches tumorales. En effet, une cellule souche tumorale se définit comme une cellule possédant les capacités d'auto-renouvellement et de génération de tous les types cellulaires présents dans la tumeur. Cette définition implique qu'une thérapie anticancéreuse peut guérir une tumeur uniquement si elle permet d'éliminer toutes les cellules

souches tumorales (333). Une étude des cellules souches tumorales et de leur devenir sous l'effet de la radiothérapie serait opportune dans le cadre de nos études.

Il serait également intéressant d'évaluer l'impact du fractionnement de la radiothérapie sur le nombre de cellules souches. En effet, nos résultats montrent que le fractionnement de la radiothérapie induit des effets délétères en termes de retard de croissance tumorale sur nos deux lignées. En effet, pour la lignée TCG3, le RCT passe de 50 à 45 jours sous l'effet du fractionnement. Pour la lignée U87, cette perte d'efficacité est encore plus marquée, le RCT passant de 42 à 34 jours. En théorie, le traitement par multiples fractions de radiothérapie est bénéfique en ce qui concerne le contrôle tumoral. Parmi les paramètres radiobiologiques participant à la réponse globale des tumeurs, les plus importants sont les 4Rs :

- la repopulation de la tumeur en cours de traitement par les cellules survivantes
- la réoxygénation des cellules tumorales hypoxiques
- la redistribution des cellules dans le cycle cellulaire
- la réparation des dommages induits par la radiothérapie entre les fractions.

Les bénéfices apportés par le fractionnement de la radiothérapie sont les suivants : (i) un plus grand nombre de dommages non réparables est induit par unité de dose dans les cellules tumorales ; (ii) la réoxygénation tumorale peut avoir lieu entre chaque fraction ; (iii) la redistribution des cellules tumorales survivantes dans des phases plus radiosensibles du cycle cellulaire peut intervenir (334). La réalité pratique semble toutefois plus complexe. En effet, des études portant sur l'effet du fractionnement de la radiothérapie ont rapporté aussi bien de meilleurs résultats en faveur de l'irradiation unique qu'un bénéfice du fractionnement de la radiothérapie (334). D'autres auteurs enfin ont montré sur plusieurs lignées cellulaires qu'il n'y avait pas de différence de survie, que la radiothérapie soit fractionnée ou non (330). Il semble que le statut p53 intervienne dans ces phénomènes, mais cela est dépendant du type cellulaire considéré. Tsai, et coll. ont étudié l'impact du fractionnement de la radiothérapie (1 fraction de 10 Gy vs. 5 fraction de 2 Gy) sur les profils d'expression génique de cellules de carcinome mammaire, de carcinome prostatique et de gliosarcome (334). Les résultats obtenus montrent que le fractionnement de la radiothérapie non seulement diminue l'efficacité globale de l'irradiation, mais également conduit à un profil d'expression génique complètement différent du schéma d'irradiation unique. Enfin, ces travaux ont montré que la même étude réalisée *in vivo* permettait d'observer la surexpression d'autres gènes et les

auteurs insistent sur l'importance d'utiliser des schémas d'irradiation fractionnée afin de mieux définir les paramètres qui gouvernent la radioréponse. En effet, seuls ces schémas prennent en compte la réparation des dommages subléthaux et les phénomènes de repopulation cellulaire qui interviennent entre les fractions (335).

Par ailleurs, les paramètres des 4Rs interviennent sans doute pour toutes les cellules tumorales, mais ils prennent une importance particulière en termes de contrôle tumoral après irradiation lorsqu'ils affectent les cellules souches tumorales (333). De plus, le maintien, en conditions de traitement fractionné, d'une production importante d'espèces réactives de l'oxygène est susceptible d'induire la transcription de gènes conférant des propriétés radioprotectrices aux cellules (328, 336).

Enfin, Tomita, et coll. (337) ont démontré qu'en conditions d'irradiation fractionnée au moins deux phénomènes opposés se mettent en place. D'une part, la réoxygénation de la tumeur entre les fractions est susceptible d'accroître l'efficacité antitumorale. D'autre part, la réparation des dommages subléthaux entre les fractions risque d'augmenter la résistance à la radiothérapie. Le résultat en termes d'efficacité de la radiothérapie dépend de la rapidité avec laquelle les deux phénomènes se mettent en place.

2. Activité chymotrypsine-like du protéasome en tant que cible de la radiothérapie

Un certain nombre d'arguments expérimentaux suggèrent que le système ubiquitine-protéasome intervient dans les réponses moléculaires et cellulaires à l'irradiation, notamment *via* l'implication de ce système dans le contrôle du cycle cellulaire, de la mort cellulaire radio-induite et de la réparation de l'ADN (79). Néanmoins, l'importance et le degré d'intervention du système ubiquitine-protéasome dans la radioréponse restent mal connus. Au cours de nos expérimentations, nous avons évalué les effets de la radiothérapie sur l'activité chymotrypsine-like du protéasome. Nos résultats montrent que l'activité du protéasome est soit inchangée, soit augmentée en fonction de la lignée et des conditions d'irradiation considérées. Les effets de la radiothérapie sur l'activité du protéasome sont très peu documentés dans la littérature. Nos résultats contrastent avec les données de Pajonk, et coll. (281). En effet, sur des cellules de carcinome de vessie humain (ECV 304), ces auteurs ont

montré que les radiations ionisantes provoquaient l'inhibition de l'activité chymotrypsine-like du protéasome (réduction d'environ 40% de l'activité basale), pour des irradiations aussi bien de faible intensité (≤ 2 Gy) que d'intensité plus importante (20 Gy). Ces résultats ont été confirmés sur des cellules de carcinome de prostate par Pervan, et coll. (338). Cette même équipe a évalué l'impact de la radiothérapie sur diverses lignées tumorales in vitro et les résultats obtenus montrent systématiquement une réduction de l'activité chymotrypsine-like du protéasome (*Pajonk, données non publiées*). En revanche, récemment, Kim, et coll. ont montré que la transfection de l'EGFRvIII dans des cellules U87 provoquait une augmentation de l'activité du protéasome sous l'effet de la radiothérapie et que l'expression de ce variant provoquait une radiorésistance accrue des cellules U87 (339). Les causes de ces effets sont encore mal élucidées. Une des explications possibles concernant l'inhibition de l'activité du protéasome après irradiation est l'augmentation de l'expression des inhibiteurs endogènes de l'activité protéolytique du protéasome, comme par exemple Hsp90 (*Heat Shock Protein*). Néanmoins, les expérimentations menées ne montrent pas de modifications majeures de l'expression de ces inhibiteurs. Une autre hypothèse concerne les dommages effectués par les radicaux libres aux molécules associées au protéasome et qui induisent une inhibition de la dégradation des substrats. Il semble que le système ubiquitine-protéasome dans son ensemble soit sensible aux modifications de potentiel redox dans les cellules (79).

Nous avons ensuite étudié l'impact de l'association concomitante bortézomib – radiothérapie sur l'activité chymotrypsine-like du protéasome. Nos résultats démontrent que le bortézomib, dans toutes les conditions de traitement étudiées, est capable de diminuer l'activité du protéasome radio-induite. A notre connaissance, aucune équipe n'a rapportée l'effet de l'association de la radiothérapie et d'un inhibiteur de protéasome sur l'activité chymotrypsine-like. Dans le cas de nos expérimentations, il semble que le bortézomib soit capable d'atteindre sa cible et de l'inhiber. Jacquemont, et coll. (254) ont montré que le protéasome participe à la réponse aux dommages à l'ADN induits par la radiothérapie à plusieurs niveaux, en participant, entre autres, à la phosphorylation d'ATM et l'activation des *checkpoint* CHK1. Ces mécanismes expliqueraient pour partie la radiosensibilisation classiquement observée avec les inhibiteurs de protéasome. Néanmoins, dans le cadre de nos expérimentations, le bortézomib produit les mêmes effets sur l'activité du protéasome, que les traitements soient fractionnés ou non et les conséquences moléculaires, notamment en terme d'activation de NF- κ B, ne sont pas corrélées.

3. Place de NF- κ B dans la réponse à la radiothérapie

a. Activation constitutive et cible pertinente dans le cadre des gliomes malins

Pour Hanahan et Weinberg (340), la tumorigénèse implique six altérations dans la physiologie cellulaire normale, à savoir, l'auto-suffisance vis-à-vis des facteurs de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, l'échappement à l'apoptose, l'immortalisation, la néo-angiogenèse, et l'invasion tissulaire locale et à distance (formation de métastases). Le facteur de transcription NF- κ B, par l'intermédiaire des gènes dont il induit la transcription, est susceptible de participer à plusieurs de ces altérations. En effet, les gènes cibles de NF- κ B appartiennent à 4 classes :

- régulation négative de la voie de signalisation : I κ B α , I κ B β ...
- réponse immunitaire : cytokines, chimiokines, molécules d'adhésion, COX2...
- inhibition de l'apoptose : cIAPs, A1/BFL1, BCL-X_L, c-FLIP¹ ...
- prolifération : cycline D1, c-MYC... (270)

Ainsi, une activité aberrante de NF- κ B a été mise en évidence dans divers types tumoraux (341-343) et cette activité participerait à la prolifération cellulaire incontrôlée, à la résistance à l'apoptose ainsi qu'à l'augmentation des potentiels angiogéniques et métastatiques des tumeurs (270, 344). Les mécanismes conduisant à cette activité aberrante sont multiples et encore incomplètement compris. Parmi ces mécanismes, peuvent être citées des mutations touchant I κ B, une activation anormale des récepteurs à tyrosine kinase (dont l'EGFR), la perte des effets inhibiteurs de certains gènes suppresseurs de tumeurs (PTEN) ou l'activation d'autres voies de signalisation (voie des MAPK, voie de Ras) (274, 343, 345, 346). Smith, et coll. (347) ont démontré que le facteur de transcription NF- κ B contrôlait la croissance des lignées de gliomes malins U118 et U87, une inhibition par siRNA de NF- κ B réduisant de 90% la croissance cellulaire, ce qui semble indiquer que ce facteur de transcription joue un rôle central dans la croissance des glioblastomes.

Nous nous sommes donc intéressés à ce facteur de transcription et nous avons quantifié l'expression des formes actives de p65 et p50 sur les xénogreffes TCG3 et U87, ainsi que sur

¹ COX2 : CYcloOXygénase 2 ; c-FLIP : *FADD Like Interleukin 1 β converting enzyme Inhibitory Protein*.

du tissu cérébral humain sain. Nos résultats montrent une expression significativement plus importante de ces deux protéines dans les xénogreffes par rapport au cerveau sain. Ces données sont en cohérence avec différents travaux de la littérature. Ainsi, une des premières études réalisées a mis en évidence sur des échantillons cliniques (gliomes de bas et de haut grade) une activation constitutive de p50 et de p65 (348). En 2002, Nagai, et coll. (349) ont confirmé ces résultats en travaillant à la fois sur des échantillons cliniques d'astrocytomes de haut grade et sur des lignées de gliomes établies à partir de prélèvements cliniques. Ces auteurs ont démontré, par immunohistochimie et par gel-shift, que NF- κ B était constitutivement activé à la fois sur les lignées de gliomes et sur les échantillons cliniques. Enfin, l'étude la plus complète a été rapportée par Wang, et coll. (350). Dans cette étude, les auteurs ont évalué l'état d'activation de NF- κ B par immunohistochimie et gel-shift sur 259 biopsies ou pièces d'exérèse de tumeurs gliales. Cette étude a démontré que le facteur de transcription NF- κ B est surexprimé et constitutivement activé dans les gliomes, tous grades confondus. De plus, il a été montré qu'il existe une corrélation positive entre le niveau d'activation de NF- κ B et le grade histologique de l'échantillon considéré. Par exemple, la sous-unité p65 est surexprimée dans 81% des glioblastomes, dans 65% des astrocytomes anaplasiques et dans seulement 14% des astrocytomes de bas grade.

Le facteur de transcription NF- κ B apparaît donc comme constitutivement activé dans les gliomes de haut grade et nos résultats concernant les expressions de p65 et de p50 sous forme active confirment une situation identique sur nos modèles de gliome xénogreffés. Cette caractéristique commune aux gliomes de haut grade a conduit un certain nombre d'équipes à utiliser l'inhibition de NF- κ B comme stratégie thérapeutique. Ainsi, Nagai, et coll. (349) ont montré qu'il était possible de réduire significativement la synthèse d'ADN et la croissance cellulaire sur 7 lignées de gliomes traitées par un oligonucleotide antisens dirigé contre p65. De même, la curcumine (inhibiteur non sélectif de NF- κ B) a montré un potentiel intéressant en bloquant la prolifération cellulaire et en induisant l'apoptose de lignées d'astrocytomes humains (351). Par ailleurs, l'utilisation de sulfasalazine (classiquement utilisée comme anti-inflammatoire dans les maladies inflammatoires chroniques) permet non seulement de bloquer l'activation de NF- κ B mais aussi de diminuer significativement le volume de tumeurs U87 implantées en orthotopique chez la souris (352) Enfin, Li, et coll. (353) ont abouti aux mêmes conclusions sur un modèle similaire (U87 implanté en orthotopique) en utilisant une approche de thérapie génique visant à bloquer spécifiquement la protéine p65. Toutes ces données font

que le facteur de transcription NF- κ B apparait comme une cible potentiellement intéressante dans le traitement des gliomes malins.

b. NF- κ B et radiothérapie

La principale raison invoquée afin d'expliquer la potentialisation de l'efficacité antitumorale de la radiothérapie par les inhibiteurs de protéasome est l'inhibition de l'activation radio-induite du facteur de transcription NF- κ B. NF- κ B peut être activé sous l'effet de différents stimuli, dont la radiothérapie (354). Une des premières études décrivant ces effets est celle de Brach, et coll. (355) qui ont démontré que les radiations ionisantes augmentaient l'expression et les capacités de fixation à l'ADN de NF- κ B sur des cellules myéloïdes humaines KG-1. Ce phénomène était détectable à 2 Gy et atteignait son maximum entre 5 et 20 Gy. Une revue récente de Criswell, et coll. (275) présente les facteurs de transcription activés par les radiations ionisantes et établit que NF- κ B fait partie des 3 principaux facteurs activés après irradiation à doses cliniques dans les cellules de Mammifères. Ces travaux justifient du choix de NF- κ B comme cible en radiosensibilisation.

Nous avons donc étudié l'effet de la radiothérapie administrée dans des conditions de fractionnement clinique sur l'état d'activation de p65 et de p50 sur les lignées TCG3 et U87. Nos résultats montrent que nos deux lignées se comportent différemment. La lignée TCG3 présente une expression accrue des formes actives de p65 et p50 que la radiothérapie soit fractionnée ou non. L'augmentation de l'expression de ces deux protéines suggère la formation de complexes NF- κ B p65-p50, ce qui se traduit par l'induction de l'expression des gènes cibles de NF- κ B, TNF α et IL-6. Ces effets sont majeurs dans le cas de la radiothérapie fractionnée, par rapport au traitement non fractionné. En revanche, la lignée U87 traitée par radiothérapie, fractionnée ou non, ne montre aucune variation significative de l'expression des formes actives de p65 et p50. Le mécanisme moléculaire par lequel la radiothérapie active NF- κ B a été décrit par Huang, et coll. (356). Les cassures double brin induites par la radiothérapie provoquent le recrutement de la kinase ATM qui phosphoryle la protéine NEMO (*NF- κ B Essential MODulator*). Ceci conduit au passage de NEMO dans le cytoplasme où il va se fixer sur les complexes IKK et induit ainsi la dégradation de I- κ B.

Nos résultats pour la lignée U87 montrent que le facteur de transcription NF- κ B n'est pas systématiquement activé après radiothérapie. Les raisons expliquant cette différence de comportement entre nos deux lignées ne sont pas clairement élucidées et plusieurs hypothèses sont possibles. Tout d'abord, il serait intéressant de vérifier la fonctionnalité de la voie ATM-NEMO-IKK à la recherche d'un déficit éventuel expliquant l'absence d'activation sous radiothérapie pour la lignée U87. Une étude des possibilités d'activation de NF- κ B par l'intermédiaire d'autres stimuli (TNF α , IL-6...) est également une perspective intéressante dans ce cadre.

Par ailleurs, si les données de la littérature s'accordent sur l'activation radio-induite de NF- κ B, même à des doses aussi faibles que 2 Gy, très peu d'intérêt a été accordé à la répétition de cette même dose. A notre connaissance, une seule étude a été consacrée aux conséquences de l'administration à un jour d'intervalle de deux fractions de radiothérapie (357). Cette étude, réalisée sur des cultures primaires d'astrocytes, a montré que, si la première fraction d'irradiation activait le facteur de transcription NF- κ B, la seconde fraction était incapable d'avoir un effet similaire, le niveau d'activation de NF- κ B restant identique à celui de cellules non irradiées. Les auteurs ont montré que la première fraction de radiothérapie provoque une augmentation de la transcription du gène codant pour I κ B, ce qui met les cellules dans l'incapacité de répondre à une nouvelle stimulation de la cascade IKK-NF- κ B. La durée de cette "désensibilisation" semble dose-dépendante, mais les auteurs ont montré que cette durée pouvait atteindre 24h pour une dose de 1,5 Gy. Aucun effet similaire n'a été décrit pour des cellules tumorales ou pour des xénogreffes. Il est possible que ce type de "désensibilisation" se produise dans le cas de la lignée U87, ceci pourrait expliquer l'absence d'activation de NF- κ B par la radiothérapie observée pour cette lignée.

Nous avons ensuite étudié l'impact de l'association bortézomib – radiothérapie sur l'expression des formes actives de p65 et p50. Nos résultats montrent que ces expressions restent stables ou augmentent pour l'association par rapport à celle du groupe recevant la radiothérapie seule pour la lignée TCG3. Il est possible que cette augmentation résulte de l'augmentation de l'activité du protéasome que nous avons obtenue après deux injections de bortézomib. En revanche, la lignée U87 ne présente aucune modification d'expression des formes actives de p65 et de p50, quel que soit le traitement reçu. Une étude de l'expression de I κ B et de I κ B phosphorylé permettrait d'obtenir le lien direct entre activité du protéasome et expression des formes actives de p65 et p50.

De façon surprenante, nos expérimentations en RT-PCR quantitative pour la lignée TCG3 n'ont pas montré d'augmentation de la transcription des gènes cibles de NF- κ B, que le traitement soit fractionné ou non. Dans le cas du traitement fractionné, le groupe recevant l'association BTZ + RT présente même une expression génique du TNF α et de l'IL-6 réduite par rapport au groupe traité par radiothérapie seule. Nous n'avons pas d'explications claires concernant ces résultats. Il serait intéressant d'étudier les effets des injections répétées de bortézomib sur l'expression des formes actives de p65 et de p50 active ainsi que que l'expression des transcrits du TNF α et de l'IL-6. En outre, Sung, et coll. ont montré sur des cellules de carcinome de la tête et du cou que le bortézomib induisait une réponse complexe en ce qui concerne l'activation de NF- κ B et la transcription de ses gènes cibles. Une approche dynamique de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B est nécessaire afin de véritablement caractériser les effets de cette molécule (358). Une autre hypothèse est possible : la protéine p50, ne possédant pas de domaine de transactivation, doit être complexée soit avec p65, soit avec RelB ou c-Rel pour induire la transcription génique (270). Il est possible que le traitement par l'association bortézomib-radiothérapie provoque le recrutement de complexes NF- κ B p50-p50 ne possédant pas de domaine de transactivation : dans ce cas, NF- κ B joue un rôle d'inhibiteur de la transcription (272). Il est possible qu'un phénomène de ce type ait lieu lors de l'association BTZ + RT, étant donné l'augmentation très importante de l'expression de la sous-unité p50 sous forme active. En revanche, nous n'avons aucun élément expliquant pourquoi le traitement par radiothérapie seule entraîne le recrutement de complexes différents.

4. Effets cellulaires de la radiothérapie

Nous avons étudié les effets de la radiothérapie fractionnée ou non en termes de prolifération à l'issue de la première semaine de traitement. De façon surprenante, nos résultats montrent que pour la lignée TCG3, la radiothérapie provoque une augmentation de l'indice de prolifération alors que la lignée U87 présente un indice de prolifération diminué pour un traitement identique. Dans les deux cas, les résultats sont significatifs par rapport au groupe CTRL. Le fractionnement de la radiothérapie induit une amplification des effets observés pour le traitement non fractionné. Cette différence de comportement entre les deux lignées est corrélée à la différence de réponse en termes d'activation de NF- κ B pour les deux lignées. Le facteur de transcription NF- κ B est connu pour induire la transcription de gènes favorisant la

prolifération cellulaire, et il est possible que l'activation de NF- κ B participe à l'augmentation du nombre de cellules en prolifération pour la lignée TCG3. En revanche, la radiothérapie n'induit pas d'activation de NF- κ B pour la lignée U87.

Nos résultats pour la lignée TCG3 ne traduisent pas une agressivité accrue des xénogreffes après radiothérapie, ce traitement induisant un retard de croissance tumorale marqué. Il est possible que l'augmentation du marquage pour la protéine Ki-67 soit le résultat d'un arrêt dans le cycle cellulaire. La radiothérapie est connue pour induire des arrêts dans le cycle cellulaire, notamment en phase G2/M (359, 360). Si cet arrêt est suffisamment long, les cellules quiescentes entrent en cycle, alors qu'aucune cellule ne passera en phase G0. Dans ce cas, on peut observer une augmentation "artificielle" du marquage par des anticorps anti-Ki-67. Nos résultats sur la distribution dans le cycle cellulaire confirment cette hypothèse. En effet, nous observons un important arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M dans le cas de la lignée TCG3. En revanche pour la lignée U87, les arrêts dans le cycle cellulaire sont très peu marqués et n'expliquent pas les variations importantes du pourcentage de cellules positivement marquées pour la protéine Ki-67.

Il est également possible que l'augmentation du nombre de cellules positivement marquées pour la protéine Ki-67 dans le cas de la lignée TCG3 soit due à la repopulation cellulaire qui se produit lors du traitement par radiothérapie fractionnée (335, 361, 362). Classiquement, l'induction de la mort cellulaire par radiothérapie conduit à un phénomène compensateur de prolifération. Un des mécanismes contributifs les plus pertinents est la "sélection", par le traitement radiothérapique, des cellules les plus radiorésistantes, susceptibles de recoloniser la tumeur. Il est probable que les cellules souches tumorales jouent un rôle dans ce phénomène de repopulation. Bao et coll. (30) ont montré que l'exposition de fragments de gliomes à une irradiation de 2 Gy entraînait la multiplication par 3 à 4 du pourcentage de cellules dites "souches" ou progénitrices. Des résultats similaires ont été rapportés par Kang, et coll. (33). Cette augmentation de cellules hautement proliférantes participe certainement à l'augmentation de l'indice de prolifération radio-induit obtenu pour la lignée TCG3. Toutefois, nous observons également une augmentation de la prolifération lorsque les tumeurs de la lignée TCG3 reçoivent un traitement par radiothérapie non fractionné et aucun élément n'explique pourquoi la lignée U87 ne présente pas ce phénomène de repopulation cellulaire.

Dans le cas de la lignée TCG3, les effets pro-prolifératifs de la radiothérapie sont corrélés avec l'activation de la transcription des gènes cibles de NF- κ B. Il est possible de réitérer cette corrélation pour le groupe BTZ + RT qui ne présentait aucune modification de l'expression des gènes cibles de NF- κ B par rapport au groupe CTRL.

Il n'en reste pas moins que la différence de comportement très marquée entre les lignées TCG3 et U87 en termes de prolifération ne conduit pas à des différences flagrantes en termes de sensibilité à la radiothérapie. Les délais de croissance tumorale nécessaires pour atteindre 3 fois le volume initial sont respectivement de 50 et 41 jours pour les tumeurs TCG3 et U87 respectivement dans le cas du traitement fractionné (pour le traitement non fractionné 57 et 54 jours pour les lignées TCG3 et U87 respectivement). L'effet précoce des traitements (24h après la dernière fraction d'irradiation) sur l'indice de prolifération ne semble donc pas rendre compte directement de l'effet macroscopique obtenu ultérieurement. Une étude réalisée plus tardivement par rapport à la fin des traitements serait intéressante afin de mieux corréler effets cellulaires et macroscopiques. La même remarque peut être effectuée en ce qui concerne les effets des traitements sur la mort cellulaire. Ainsi, la mort mitotique est une des voies prépondérantes de mort cellulaire après radiothérapie, et les cellules sont alors susceptibles de mourir après plusieurs mitoses (363). Il est donc difficile dans nos conditions d'analyse de différencier les cellules tumorales viables de celles qui mourront à l'issue de plusieurs mitoses. Dans ce cas également, une étude des effets du traitement effectuée plus tardivement serait opportune.

IV. Conclusions

Un certain nombre de travaux ont montré que l'inhibition de l'activité du protéasome permettait d'obtenir une radiosensibilisation sur divers modèles de tumeurs *in vitro* (266, 364-367). Nous avons montré que sur deux modèles de gliome malin xéno greffé chez la souris *nude*, le bortézomib augmentait massivement l'efficacité de la radiothérapie. A l'inverse, nos travaux mettent également en évidence une absence de potentialisation des effets de la radiothérapie par le bortézomib lorsque les traitements sont fractionnés selon des doses et un schéma directement inspirés de la pratique clinique. Les investigations que nous avons menées sur nos modèles nous permettent d'avancer plusieurs explications :

- les effets "délétères" du bortézomib administré en injections répétées sur nos modèles : non seulement les tumeurs perdent leur sensibilité aux effets inhibiteurs du bortézomib mais elles présentent une activité du protéasome accrue ;
- l'effet protecteur du bortézomib sur l'apoptose radio-induite sur nos modèles : cet effet est sans doute lié à l'augmentation de l'activité du protéasome après deux injections consécutives ;
- la place discutable du facteur de transcription NF- κ B dans la radiorésistance des gliomes malins : la majorité des études rapportant une radiopotentialisation par un inhibiteur de protéasome invoque des effets inhibiteurs sur le facteur de transcription NF- κ B. Notre étude démontre non seulement que ce facteur n'est pas systématiquement activé après radiothérapie mais que son rôle dans la réponse à la radiothérapie reste à définir. En effet, les expérimentations en RT-PCR quantitative montrent que la suppression de la transcription des gènes cibles de NF- κ B (lors de l'association BTZ + RT) ne se traduit pas forcément par une amélioration de la réponse globale des xéno greffes. Un certain nombre d'études récentes s'interrogent d'ailleurs sur un rôle potentiel de NF- κ B en tant que suppresseur de tumeur (368, 369).

Par ailleurs, un nombre croissant d'équipes s'intéresse à la résistance aux inhibiteurs de protéasome utilisés dans le traitement des tumeurs solides. D'une part, des travaux montrent que les résistances peuvent être dues à l'incapacité du bortézomib à inhiber l'activation de NF- κ B, ces résultats étant obtenus sur divers types tumoraux (370-372). Allen, et coll. ont

également montré sur des prélèvements cliniques de cancer de la tête et du cou que le bortézomib était capable d'inhiber la voie classique d'activation de NF- κ B, mais qu'il n'inhibait pas la voie alternative (373). D'autre part, dans des cellules de carcinome mammaire, Shi, et coll. ont montré que l'inhibition du protéasome s'accompagnait de l'inhibition de l'activité pro-apoptotique de JNK (374). L'équipe de Sloss, et coll. (375) rapporte également que l'inhibition du protéasome par le bortézomib ou le NPI-0052 dans des cellules de cancer pancréatique conduit à la stimulation des voies mitogéniques impliquant l'EGFR, ERK1/2, Akt et JNK. Ces études montrent que la stimulation de ces voies limite, voire supprime, le potentiel pro-apoptotique des inhibiteurs de protéasome. Etant donné l'importance de la voie de signalisation impliquant le récepteur à l'EGF dans les gliomes malins, il serait intéressant d'étudier les effets du bortézomib sur nos lignées dans ce cadre. Enfin, ces exemples illustrent la complexité des relations du protéasome avec les voies de signalisation intracellulaire, résultat de la place centrale qu'occupe le système ubiquitine-protéasome au sein de la cellule. Il est aisé de supposer que les réponses complexes que génèrent la radiothérapie et l'inhibition du protéasome rendent difficile toutes extrapolations et que ce type d'association doit être évalué pour chaque type tumoral d'intérêt.

Au final, même s'il existe un rationnel théorique fort justifiant du potentiel radiosensibilisant du bortézomib, relativement peu d'études précliniques ont rapporté des résultats en radiosensibilisation (6 études publiées depuis 2001). Sur le plan clinique, seule l'étude de Van Waes, et coll. réalisée sur seulement 7 patients évaluable a été publiée (268). Les autres données cliniques rapportées consistent en des "case report" décrivant des effets toxiques lors d'irradiation ponctuelle chez des patients traités par bortézomib (376), même si ces effets n'ont pas été mis en évidence par tous les investigateurs (377). Il semble qu'en conditions de fractionnement clinique, le bortézomib ne présente pas d'intérêt en association avec la radiothérapie et les propriétés radiosensibilisantes des inhibiteurs de protéasome mériteraient d'être étudiées dans des conditions plus proches de la pratique clinique.

Chapitre 9 : Conclusions et perspectives

Chapitre 9 : Conclusions et perspectives

La radiothérapie fait partie intégrante du traitement indiqué chez les patients atteints de gliome malin et a démontré depuis plusieurs décennies sa capacité à améliorer significativement la survie des malades. Néanmoins, la faible espérance de vie des patients atteints des formes les plus malignes nécessitent le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à améliorer le contrôle tumoral. Depuis 2005, l'administration concomitante d'un agent de chimiothérapie (témozolomide) à la radiothérapie est devenue un standard thérapeutique, officialisant l'intérêt des associations radiothérapie-chimiothérapie concomitantes dans le traitement des gliomes de haut grade. Toutefois, la faible amélioration de survie ainsi apportée reste insuffisante et la mise au point de nouvelles associations radio-chimiothérapie concomitante est à poursuivre.

Dans ce cadre, les objectifs de ce travail étaient d'étudier l'intérêt d'associer à la radiothérapie un inhibiteur de protéasome, le bortézomib sur des xénogreffes de gliome malin humain chez la souris nude et de comprendre l'interaction entre ces deux modalités thérapeutiques. Les inhibiteurs de protéasome constituent une nouvelle classe d'agents anticancéreux à mécanisme d'action original. Le bortézomib (Velcade[®]), chef de file de cette classe, est actuellement indiqué dans le traitement du myélome multiple en rechute. Plusieurs études précliniques *in vitro* ont montré que le bortézomib, comme d'autres inhibiteurs de protéasome, présentait des propriétés pro-apoptotiques et anti-prolifératives sur des lignées cellulaires de gliomes. En outre, les propriétés radiosensibilisantes des inhibiteurs de protéasome ont été mises en évidence sur divers types tumoraux.

Une des problématiques majeures des études portant sur les effets de la radiothérapie est le très faible nombre de travaux consacrés à l'évaluation des conséquences de l'irradiation délivrée selon des doses et des schémas thérapeutiques calqués sur la pratique clinique. Il est établi que les effets de fortes doses délivrées en une seule fois ne peuvent être extrapolés aux effets de doses plus faibles administrées de façon répétée. Notre approche a donc consisté à utiliser des schémas de traitement proches de ceux pratiqués chez l'Homme afin d'apporter des éléments rationnels forts permettant d'évaluer au mieux l'intérêt de proposer cette association en essai clinique. Nous avons systématiquement comparé ces effets à ceux de fortes doses délivrées en administration unique.

Les études de radiopotentialisation que nous avons réalisées montrent d'une part que le bortézomib est un radiosensibilisant puissant sur nos deux modèles de gliome malin lorsqu'il est administré selon des schémas de traitement non fractionnés. D'autre part, lorsque la chimiothérapie et la radiothérapie sont fractionnées selon des schémas cliniques, le bortézomib perd son potentiel radiosensibilisant. La perte du pouvoir radiosensibilisant suite au fractionnement des traitements n'a jamais été rapportée dans la littérature pour le type tumorale et la molécule étudiés.

Nos travaux nous ont également mené à étudier les effets cellulaires et moléculaires des traitements. Nous avons montré que le bortézomib, administré en injections répétées induisait une augmentation de l'activité du protéasome. Ce phénomène particulier participe sans doute à la perte de l'effet radiosensibilisant observé dans les études d'efficacité antitumorale. Quel que soit le mode d'administration, le bortézomib s'est avéré incapable de ralentir la croissance tumorale des deux modèles de gliome malin étudiés, ce qui contraste avec les espoirs suscités par cette molécule sur des cultures cellulaires de gliome. Les nouveaux inhibiteurs de protéasome actuellement en cours de développement sont plus spécifiques et inhibent de façon irréversible les trois activités catalytiques du protéasome, ce qui leur confère une efficacité potentielle accrue. Leur évaluation sur des xénogreffes de gliome malin devrait permettre de déterminer si cette classe thérapeutique est susceptible de trouver sa place dans l'arsenal thérapeutique du neuro-oncologue.

Nous avons également focalisé nos investigations sur les effets de la radiothérapie sur les xénogreffes de gliome malin. Nous avons montré que les deux modèles étudiés présentaient des réponses moléculaires et cellulaires très différentes, en dépit de réponses globales similaires. Nos travaux montrent que les deux modes d'administration utilisés conduisent également à des effets très différents, voire opposés. Nos études interrogent enfin sur la place du facteur de transcription NF- κ B dans la réponse à la radiothérapie sur des modèles de gliome malin, ce facteur ne semblant pas jouer un rôle déterminant dans le devenir des tumeurs post-irradiation. Ces données, comme celles obtenues lors du traitement par bortézomib, sont à valider sur des modèles orthotopiques, où la tumeur cérébrale évolue dans son environnement d'origine. Nos travaux illustrent également la complexité de la réponse cellulaire et moléculaire à la radiothérapie, complexité encore accrue lors de l'association avec un inhibiteur de protéasome dont les effets vont s'intriquer avec ceux de la radiothérapie. Il est donc nécessaire d'évaluer systématiquement les schémas de traitement selon les possibilités pratiques de la situation clinique afin d'apporter des éléments les plus rationnels possibles pour l'initiation d'essais cliniques pertinents.

En conclusion, les éléments apportés par nos travaux ne plaident pas en faveur de l'utilisation du bortézomib en tant qu'agent radiosensibilisant dans le traitement des gliomes malins. De plus, le fait d'utiliser des modèles tumoraux *in vivo* et de fractionner les traitements conduits à des effets moléculaires et cellulaires différents de ceux obtenus lorsque les traitements sont administrés en dose unique. En dépit de la lourdeur des expérimentations menées *in vivo* et utilisant des schémas thérapeutiques cliniques, ce type d'approche est indispensable afin d'évaluer aussi bien la pertinence des cibles thérapeutiques que l'efficacité potentielle des traitements. Ceci constitue un point fondamental afin d'apporter le plus rapidement possible de nouvelles solutions thérapeutiques efficaces pour les patients

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Bauchet L, Rigau V, Mathieu-Daude H, *et al.* French brain tumor data bank: Methodology and first results on 10,000 cases. *J Neurooncol* 2007;84(2):189-99.
2. Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, Delattre JY. Primary brain tumours in adults. *Lancet* 2003;361(9354):323-31.
3. Legler JM, Ries LA, Smith MA, *et al.* Cancer surveillance series [corrected]: brain and other central nervous system cancers: recent trends in incidence and mortality. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(16):1382-90.
4. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 2005;109(1):93-108.
5. DeAngelis LM. Brain tumors. *N Engl J Med* 2001;344(2):114-23.
6. Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol* 2006;2(9):494-503; quiz 1 p following 16.
7. Hoang-Xuan K, Sanson M, Delattre JY. Biologie des gliomes : acquis et perspectives cliniques. *Médecine/Sciences* 1999;15:1075-7.
8. Figarella-Branger D, Bouvier C. [Histological classification of human gliomas: state of art and controversies]. *Bull Cancer* 2005;92(4):301-9.
9. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114(2):97-109.

10. Gilles FH, Brown WD, Leviton A, *et al.* Limitations of the World Health Organization classification of childhood supratentorial astrocytic tumors. Children Brain Tumor Consortium. Cancer 2000;88(6):1477-83.
11. Pollack IF, Hamilton RL, James CD, *et al.* Rarity of PTEN deletions and EGFR amplification in malignant gliomas of childhood: results from the Children's Cancer Group 945 cohort. J Neurosurg 2006;105(5 Suppl):418-24.
12. Daumas-Duport C, Beuvon F, Varlet P, Fallet-Bianco C. [Gliomas: WHO and Sainte-Anne Hospital classifications]. Ann Pathol 2000;20(5):413-28.
13. Hoang-Xuan K, Idhahbi A, Mokhtari K, Sanson M. [Towards a molecular classification of gliomas]. Bull Cancer 2005;92(4):310-6.
14. Houillier C, Lejeune J, Benouaich-Amiel A, *et al.* Prognostic impact of molecular markers in a series of 220 primary glioblastomas. Cancer 2006;106(10):2218-23.
15. <http://groups.eortc.be/brain/html/trials.html>.
16. Stupp R, Hottinger AF. Management of malignant glioma--quo vadis? Onkologie 2008;31(6):300-2.
17. Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, *et al.* Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. Genes Dev 2001;15(11):1311-33.
18. Ohgaki H. Genetic pathways to glioblastomas. Neuropathology 2005;25(1):1-7.
19. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, *et al.* Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. Genes Dev 2007;21(21):2683-710.
20. Lefranc F, Sadeghi N, Camby I, Metens T, Dewitte O, Kiss R. Present and potential future issues in glioblastoma treatment. Expert Rev Anticancer Ther 2006;6(5):719-32.
21. Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. N Engl J Med 2005;353(8):811-22.

22. Galderisi U, Cipollaro M, Giordano A. Stem cells and brain cancer. *Cell Death Differ* 2006;13(1):5-11.
23. Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* 2006;6(6):425-36.
24. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, *et al.* Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(25):15178-83.
25. Ogden AT, Waziri AE, Lochhead RA, *et al.* Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas. *Neurosurgery* 2008;62(2):505-14; discussion 14-5.
26. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003;63(18):5821-8.
27. Liu G, Yuan X, Zeng Z, *et al.* Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 2006;5:67.
28. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432(7015):396-401.
29. Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, *et al.* Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res* 2008;14(1):123-9.
30. Bao S, Wu Q, McLendon RE, *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006;444(7120):756-60.
31. Hambardzumyan D, Becher OJ, Rosenblum MK, Pandolfi PP, Manova-Todorova K, Holland EC. PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma in vivo. *Genes Dev* 2008;22(4):436-48.
32. Johannessen TC, Bjerkvig R, Tysnes BB. DNA repair and cancer stem-like cells - Potential partners in glioma drug resistance? *Cancer Treat Rev* 2008.
33. Kang MK, Hur BI, Ko MH, Kim CH, Cha SH, Kang SK. Potential identity of multi-potential cancer stem-like subpopulation after radiation of cultured brain glioma. *BMC Neurosci* 2008;9:15.

34. Martin-Villalba A, Okuducu AF, von Deimling A. The evolution of our understanding on glioma. *Brain Pathol* 2008;18(3):455-63.
35. Tunici P, Bissola L, Lualdi E, *et al.* Genetic alterations and in vivo tumorigenicity of neurospheres derived from an adult glioblastoma. *Mol Cancer* 2004;3:25.
36. Murat A, Migliavacca E, Gorlia T, *et al.* Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *J Clin Oncol* 2008;26(18):3015-24.
37. Castro MG, Cowen R, Williamson IK, *et al.* Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors. *Pharmacol Ther* 2003;98(1):71-108.
38. Frappaz D, Chinot O, Bataillard A, *et al.* [Standards, Options and Recommendations 2002 for the management of adult patients with intracranial gliomas (summary report)]. *Bull Cancer* 2003;90(10):873-86.
39. Grill J, Renaux VK, Bulteau C, *et al.* Long-term intellectual outcome in children with posterior fossa tumors according to radiation doses and volumes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;45(1):137-45.
40. Deeken JF, Loscher W. The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan horses. *Clin Cancer Res* 2007;13(6):1663-74.
41. Chinot O. [New place of the chemotherapy in gliomas]. *Bull Cancer* 2005;92(4):343-54.
42. van den Bent MJ, Hegi ME, Stupp R. Recent developments in the use of chemotherapy in brain tumours. *Eur J Cancer* 2006;42(5):582-8.
43. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352(10):987-96.
44. Taillandier L. Un modèle de xénogreffes de gliomes humains et son utilisation en recherches précliniques biologique et thérapeutique. Nancy: Université Henri Poincaré Nancy 1; 2003.
45. Carpentier AF. [New therapeutic approaches in glioblastomas]. *Bull Cancer* 2005;92(4):355-9.

46. ASCO Annual Meeting Proceedings 2008.
47. Sathornsumetee S, Reardon DA, Desjardins A, Quinn JA, Vredenburgh JJ, Rich JN. Molecularly targeted therapy for malignant glioma. *Cancer* 2007;110(1):13-24.
48. van den Bent MJ. The role of chemotherapy in brain metastases. *Eur J Cancer* 2003;39(15):2114-20.
49. Favaudon V, Noel G. [Biological basis for concomitant chemoradiotherapy in carcinomas]. *Bull Cancer* 2005;92(12):1027-31.
50. Bourhis J, Mornex F. Bases biologiques de la chimioradiothérapie. In: Mornex F MJ, Droz JP, Marty M, editor. *Chimioradiothérapie concomitante : présent et futur*. Paris: Elsevier; 1999. p. 17-27.
51. Robert J. Bases pharmacologiques des associations radiothérapie-chimiothérapie. Enjeux et médicaments utilisés. In: Lagrange JL, Pignol JP, Bensadoun RJ, editors. *Optimisation de l'intensité thérapeutique : les associations radiothérapie-chimiothérapie*. Paris: John Libbey Eurotext; 1997. p. 23-30.
52. Seiwert TY, Salama JK, Vokes EE. The concurrent chemoradiation paradigm--general principles. *Nat Clin Pract Oncol* 2007;4(2):86-100.
53. Pinel S, Barberi-Heyob M, Cohen-Jonathan E, *et al.* Erythropoietin-induced reduction of hypoxia before and during fractionated irradiation contributes to improvement of radioresponse in human glioma xenografts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;59(1):250-9.
54. Hennequin C, Favaudon V. Biological basis for chemo-radiotherapy interactions. *Eur J Cancer* 2002;38(2):223-30.
55. Benouaich-Amiel A, Simon JM, Delattre JY. [Concomitant radiotherapy with chemotherapy in patients with glioblastoma]. *Bull Cancer* 2005;92(12):1065-72.
56. Westphal M, Hilt DC, Bortey E, *et al.* A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro Oncol* 2003;5(2):79-88.

57. Skov K, MacPhail S. Interaction of platinum drugs with clinically relevant x-ray doses in mammalian cells: a comparison of cisplatin, carboplatin, iproplatin, and tetraplatin. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991;20(2):221-5.
58. Durand RE, Goldie JH. Interaction of etoposide and cisplatin in an in vitro tumor model. *Cancer Treat Rep* 1987;71:673-9.
59. Giocanti N, Hennequin C, Balosso J, Mahler M, Favaudon V. DNA repair and cell cycle interactions in radiation sensitization by the topoisomerase II poison etoposide. *Cancer Res* 1993;53(9):2105-11.
60. Chastagner P, Merlin JL, Marchal C, *et al.* In vivo potentiation of radiation response by topotecan in human rhabdomyosarcoma xenografted into nude mice. *Clin Cancer Res* 2000;6(8):3327-33.
61. Pinel S, Chastagner P, Merlin JL, Marchal C, Taghian A, Barberi-Heyob M. Topotecan can compensate for protracted radiation treatment time effects in high grade glioma xenografts. *J Neurooncol* 2006;76(1):31-8.
62. Bernier-Chastagner V, Grill J, Doz F, *et al.* Topotecan as a radiosensitizer in the treatment of children with malignant diffuse brainstem gliomas: results of a French Society of Paediatric Oncology Phase II Study. *Cancer* 2005;104(12):2792-7.
63. Fisher B, Won M, Macdonald D, Johnson DW, Roa W. Phase II study of topotecan plus cranial radiation for glioblastoma multiforme: results of Radiation Therapy Oncology Group 9513. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;53(4):980-6.
64. Donson AM, Addo-Yobo SO, Handler MH, Gore L, Foreman NK. MGMT promoter methylation correlates with survival benefit and sensitivity to temozolomide in pediatric glioblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 2007;48(4):403-7.
65. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, *et al.* MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352(10):997-1003.
66. <http://www.clinicaltrials.gov>.

67. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002;82(2):373-428.
68. Mani A, Gelmann EP. The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(21):4776-89.
69. Mitsiades CS, Mitsiades N, Hideshima T, Richardson PG, Anderson KC. Proteasome inhibition as a therapeutic strategy for hematologic malignancies. *Expert Rev Anticancer Ther* 2005;5(3):465-76.
70. Stenesh J. Dictionary of biochemistry and molecular biology. New York: John Wiley & sons; 1989.
71. Ciechanover A, Ben-Saadon R. N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends Cell Biol* 2004;14(3):103-6.
72. Ciechanover A. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006:1-12, 505-6.
73. Burger AM, Seth AK. The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications. *Eur J Cancer* 2004;40(15):2217-29.
74. Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2004;4(8):592-603.
75. Ferrara P, Acquaviva C, Bossis G, Piechaczyk M, Jariel-Encontre I. Protéolyse intracellulaire et tumorigenèse. *Médecine/Sciences* 2001;17(1):5-13.
76. Wang J, Maldonado MA. The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol* 2006;3(4):255-61.
77. Benaroudj N. [Proteasome, a cellular machinery for protein degradation]. *Med Sci (Paris)* 2005;21(2):115-6.
78. Borissenko L, Groll M. Diversity of proteasomal missions: fine tuning of the immune response. *Biol Chem* 2007;388(9):947-55.

79. McBride WH, Iwamoto KS, Syljuasen R, Pervan M, Pajonk F. The role of the ubiquitin/proteasome system in cellular responses to radiation. *Oncogene* 2003;22(37):5755-73.
80. Dahlmann B. Role of proteasomes in disease. *BMC Biochem* 2007;8 Suppl 1:S3.
81. Coux O, Piechaczyk M. Le système ubiquitine/protéasome : un ensemble (de) complexe(s) pour dégrader les protéines. *Médecine/Sciences* 2000;16(5):623-9.
82. Groll M, Ditzel L, Lowe J, *et al.* Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 1997;386(6624):463-71.
83. Brooks P, Fuertes G, Murray RZ, *et al.* Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem J* 2000;346(Pt 1):155-61.
84. Goldberg AL. Introduction to the proteasome and its inhibitors. *Biochemistry and cell biology*. In: Adams J, editor. *Proteasome inhibitors in cancer therapy*. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 2004. p. 17-38.
85. Wolf DH, Hilt W. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta* 2004;1695(1-3):19-31.
86. Demarchi F, Brancolini C. Altering protein turnover in tumor cells: new opportunities for anti-cancer therapies. *Drug Resist Updat* 2005;8(6):359-68. Epub 2006 Jan 6.
87. Groll M, Huber R. Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach. *Biochim Biophys Acta* 2004;1695(1-3):33-44.
88. Heinemeyer W, Ramos PC, Dohmen RJ. The ultimate nanoscale mincer: assembly, structure and active sites of the 20S proteasome core. *Cell Mol Life Sci* 2004;61(13):1562-78.
89. Kisselev AF, Callard A, Goldberg AL. Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J Biol Chem* 2006;281(13):8582-90.
90. Kloetzel PM. The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim Biophys Acta* 2004;1695(1-3):225-33.

91. Farras R, Bossis G, Andermarcher E, Jariel-Encontre I, Piechaczyk M. Mechanisms of delivery of ubiquitylated proteins to the proteasome: new target for anti-cancer therapy? *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;54(1):31-51.
92. Esser C, Alberti S, Hohfeld J. Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system. *Biochim Biophys Acta* 2004;1695(1-3):171-88.
93. Hoyt MA, Coffino P. Ubiquitin-free routes into the proteasome. *Cell Mol Life Sci* 2004;61(13):1596-600.
94. Wilkinson KD. Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin Cell Dev Biol* 2000;11(3):141-8.
95. Passmore LA, Barford D. Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem J* 2004;379(Pt 3):513-25.
96. Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer* 2004;4(5):349-60.
97. Staub O, Rotin D. Role of ubiquitylation in cellular membrane transport. *Physiol Rev* 2006;86(2):669-707.
98. Dikic I, Crosetto N, Calatroni S, Bernasconi P. Targeting ubiquitin in cancers. *Eur J Cancer* 2006;42(18):3095-102.
99. Andermarcher E, Bossis G, Farras R, Jariel-Encontre I, Piechaczyk M. La dégradation protéasomique. De l'adressage des protéines aux nouvelles perspectives thérapeutiques. *Médecine/Sciences* 2005;21(2):141-9.
100. Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 2007;315(5809):201-5.
101. Weissman AM. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(3):169-78.
102. Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6(8):599-609.

103. Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J* 2000;19(1):94-102.
104. Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2004;1695(1-3):55-72.
105. King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 1996;274(5293):1652-9.
106. Willems AR, Schwab M, Tyers M. A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochim Biophys Acta* 2004;1695(1-3):133-70.
107. Ravid T, Hochstrasser M. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008.
108. Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* 2000;22(5):442-51.
109. McClellan AJ, Tam S, Kaganovich D, Frydman J. Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations. *Nat Cell Biol* 2005;7(8):736-41.
110. Amerik AY, Hochstrasser M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2004;1695(1-3):189-207.
111. Chung CH, Baek SH. Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;266(3):633-40.
112. Nencioni A, Grunebach F, Patrone F, Ballestrero A, Brossart P. Proteasome inhibitors: antitumor effects and beyond. *Leukemia* 2007;21(1):30-6.
113. Kaganovich D, Kopito R, Frydman J. Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* 2008;454(7208):1088-95.
114. Hartmann-Petersen R, Gordon C. Proteins interacting with the 26S proteasome. *Cell Mol Life Sci* 2004;61(13):1589-95.

115. Tanaka K, Suzuki T, Hattori N, Mizuno Y. Ubiquitin, proteasome and parkin. *Biochim Biophys Acta* 2004;1695(1-3):235-47.
116. Sherman MY, Goldberg AL. Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* 2001;29(1):15-32.
117. Smith DM, Benaroudj N, Goldberg A. Proteasomes and their associated ATPases: a destructive combination. *J Struct Biol* 2006;156(1):72-83.
118. Lam YA, Lawson TG, Velayutham M, Zweier JL, Pickart CM. A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* 2002;416(6882):763-7.
119. Husnjak K, Elsasser S, Zhang N, *et al.* Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature* 2008;453(7194):481-8.
120. Saeki Y, Tanaka K. Cell biology: two hands for degradation. *Nature* 2008;453(7194):460-1.
121. Pagano M, Benmaamar R. When protein destruction runs amok, malignancy is on the loose. *Cancer Cell* 2003;4(4):251-6.
122. Hilt W. Targets of programmed destruction: a primer to regulatory proteolysis in yeast. *Cell Mol Life Sci* 2004;61(13):1615-32.
123. Pines J, Lindon C. Proteolysis: anytime, any place, anywhere? *Nat Cell Biol* 2005;7(8):731-5.
124. Forster A, Hill CP. Proteasome degradation: enter the substrate. *Trends Cell Biol* 2003;13(11):550-3.
125. Chen ZJ. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* 2005;7(8):758-65.
126. Rape M, Jentsch S. Productive RUPTure: activation of transcription factors by proteasomal processing. *Biochim Biophys Acta* 2004;1695(1-3):209-13.
127. Dou QP, Li B. Proteasome inhibitors as potential novel anticancer agents. *Drug Resist Updat* 1999;2(4):215-23.

128. Ellgaard L, Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4(3):181-91.
129. Tsai B, Ye Y, Rapoport TA. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(4):246-55.
130. Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 2002;110(10):1389-98.
131. Ahner A, Brodsky JL. Checkpoints in ER-associated degradation: excuse me, which way to the proteasome? *Trends Cell Biol* 2004;14(9):474-8.
132. Kostova Z, Wolf DH. For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *Embo J* 2003;22(10):2309-17.
133. Kopito RR. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* 2000;10(12):524-30.
134. Wojcik C, DeMartino GN. Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35(5):579-89.
135. Rechsteiner M, Realini C, Ustrell V. The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation. *Biochem J* 2000;345(Pt 1):1-15.
136. Hanada K, Yewdell JW, Yang JC. Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature* 2004;427(6971):252-6.
137. Naujokat C, Hoffmann S. Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab Invest* 2002;82(8):965-80.
138. Adams J. The proteasome in cell-cycle regulation. In: Adams J, editor. *Proteasome inhibitors in cancer therapy*. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 2004. p. 77-84.
139. Yamasaki L, Pagano M. Cell cycle, proteolysis and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16(6):623-8.

140. Ludwig H, Khayat D, Giaccone G, Facon T. Proteasome inhibition and its clinical prospects in the treatment of hematologic and solid malignancies. *Cancer* 2005;104(9):1794-807.
141. Zheng N, Schulman BA, Song L, *et al.* Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* 2002;416(6882):703-9.
142. Sun SC, Xiao G. Deregulation of NF-kappaB and its upstream kinases in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22(4):405-22.
143. Soussi T. Cycle cellulaire et apoptose : le gène suppresseur de tumeur p53. *Médecine/Sciences* 2000;16(4):469-72.
144. Hoeller D, Hecker CM, Dikic I. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 2006;6(10):776-88.
145. Sakamoto KM. Ubiquitin-dependent proteolysis: its role in human diseases and the design of therapeutic strategies. *Mol Genet Metab* 2002;77(1-2):44-56.
146. Ardley HC, Hung CC, Robinson PA. The aggravating role of the ubiquitin-proteasome system in neurodegeneration. *FEBS Lett* 2005;579(3):571-6.
147. Friguet B, Bulteau AL, Chondrogianni N, Conconi M, Petropoulos I. Protein degradation by the proteasome and its implications in aging. *Ann N Y Acad Sci* 2000;908:143-54.
148. McNaught KS, Belizaire R, Isacson O, Jenner P, Olanow CW. Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2003;179(1):38-46.
149. McNaught KS, Jenner P. Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2001;297(3):191-4.
150. Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's diseases. *Exp Neurol* 2005;191(Suppl 1):S17-27.
151. Corti O, Brice A. La maladie de Parkinson : que nous apprennent les gènes responsables des formes familiales ? *Médecine/Sciences* 2003;19:613-9.

152. Lim KL, Tan JM. Role of the ubiquitin proteasome system in Parkinson's disease. *BMC Biochem* 2007;8 Suppl 1:S13.
153. Kim KB, Crews CM. Natural product and synthetic proteasome inhibitors. In: Adams J, editor. *Proteasome inhibitors in cancer therapy*. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 2004. p. 47-63.
154. Almond JB, Cohen GM. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 2002;16(4):433-43.
155. Dorsey BD, Iqbal M, Chatterjee S, *et al.* Discovery of a potent, selective, and orally active proteasome inhibitor for the treatment of cancer. *J Med Chem* 2008;51(4):1068-72.
156. Garcia-Echeverria C. Recent advances in the identification and development of 20S proteasome inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 2002;2(3):247-59.
157. Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* 2001;8(8):739-58.
158. Guedat P, Colland F. Patented small molecule inhibitors in the ubiquitin proteasome system. *BMC Biochem* 2007;8(Suppl 1):S14.
159. Ahn KS, Sethi G, Chao TH, *et al.* Salinosporamide A (NPI-0052) potentiates apoptosis, suppresses osteoclastogenesis, and inhibits invasion through down-modulation of NF-kappaB regulated gene products. *Blood* 2007;110(7):2286-95.
160. Chauhan D, Hideshima T, Anderson KC. A novel proteasome inhibitor NPI-0052 as an anticancer therapy. *Br J Cancer* 2006;95(8):961-5.
161. Orłowski RZ, Dees EC. The role of the ubiquitination-proteasome pathway in breast cancer: applying drugs that affect the ubiquitin-proteasome pathway to the therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2003;5(1):1-7.
162. Holbeck SL, Sausville EA. The proteasome and the COMPARE algorithm. In: Adams J, editor. *Proteasome inhibitors in cancer therapy*. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 2004. p. 99-107.
163. Rajkumar SV, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(3):630-9.

164. Williams SA, McConkey DJ. Proteasome inhibition and apoptosis. In: Adams J, editor. Proteasome inhibitors in cancer therapy. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 2004. p. 85-98.
165. Pajonk F, McBride WH. The proteasome in cancer biology and therapy. In: J A, editor. Proteasome inhibitors in cancer therapy. Totowa: Humana Press; 2004. p. 111-22.
166. Dalton WS. The proteasome. *Semin Oncol* 2004;31(6 Suppl 16):3-9; discussion 33.
167. Adams J, Elliott PJ, Bouchard P. Preclinical development of bortezomib (VELCADE™). In: Adams J, editor. Proteasome inhibitors in cancer therapy. Totowa, NJ; 2004. p. 233-69.
168. Voorhees PM, Dees EC, O'Neil B, Orlowski RZ. The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2003;9(17):6316-25.
169. Chen L, Madura K. Increased proteasome activity, ubiquitin-conjugating enzymes, and eEF1A translation factor detected in breast cancer tissue. *Cancer Res* 2005;65(13):5599-606.
170. Lee DH, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* 1998;8(10):397-403.
171. Yang W, Gao X, Wang B. Boronic acid compounds as potential pharmaceutical agents. *Med Res Rev* 2003;23(3):346-68.
172. Kane RC, Farrell AT, Sridhara R, Pazdur R. United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy. *Clin Cancer Res* 2006;12(10):2955-60.
173. Boccadoro M, Morgan G, Cavenagh J. Preclinical evaluation of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer therapy. *Cancer Cell Int* 2005;5(1):18.
174. LeBlanc R, Catley LP, Hideshima T, *et al.* Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model. *Cancer Res* 2002;62(17):4996-5000.
175. Satou Y, Nosaka K, Koya Y, Yasunaga JI, Toyokuni S, Matsuoka M. Proteasome inhibitor, bortezomib, potently inhibits the growth of adult T-cell leukemia cells both in vivo and in vitro. *Leukemia* 2004;18(8):1357-63.

176. Tan C, Waldmann TA. Proteasome inhibitor PS-341, a potential therapeutic agent for adult T-cell leukemia. *Cancer Res* 2002;62(4):1083-6.
177. Teicher BA, Ara G, Herbst R, Palombella VJ, Adams J. The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 1999;5(9):2638-45.
178. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, *et al.* Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 1999;59(11):2615-22.
179. Williams SA, McConkey DJ. The proteasome inhibitor bortezomib stabilizes a novel active form of p53 in human LNCaP-Pro5 prostate cancer cells. *Cancer Res* 2003;63(21):7338-44.
180. Bold RJ, Virudachalam S, McConkey DJ. Chemosensitization of pancreatic cancer by inhibition of the 26S proteasome. *J Surg Res* 2001;100(1):11-7.
181. Nawrocki ST, Bruns CJ, Harbison MT, *et al.* Effects of the proteasome inhibitor PS-341 on apoptosis and angiogenesis in orthotopic human pancreatic tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* 2002;1(14):1243-53.
182. Shah SA, Potter MW, McDade TP, *et al.* 26S proteasome inhibition induces apoptosis and limits growth of human pancreatic cancer. *J Cell Biochem* 2001;82(1):110-22.
183. Sunwoo JB, Chen Z, Dong G, *et al.* Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7(5):1419-28.
184. Cusack JC, Jr., Liu R, Houston M, *et al.* Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor-kappaB inhibition. *Cancer Res* 2001;61(9):3535-40.
185. Uddin S, Ahmed M, Bavi P, *et al.* Bortezomib (Velcade) induces p27Kip1 expression through S-phase kinase protein 2 degradation in colorectal cancer. *Cancer Res* 2008;68(9):3379-88.
186. Shanker A, Brooks AD, Tristan CA, *et al.* Treating metastatic solid tumors with bortezomib and a tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor agonist antibody. *J Natl Cancer Inst* 2008;100(9):649-62.

187. Brignole C, Marimpietri D, Pastorino F, *et al.* Effect of bortezomib on human neuroblastoma cell growth, apoptosis, and angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(16):1142-57.
188. Hamner JB, Dickson PV, Sims TL, *et al.* Bortezomib inhibits angiogenesis and reduces tumor burden in a murine model of neuroblastoma. *Surgery* 2007;142(2):185-91.
189. Bazzaro M, Lee MK, Zoso A, *et al.* Ubiquitin-proteasome system stress sensitizes ovarian cancer to proteasome inhibitor-induced apoptosis. *Cancer Res* 2006;66(7):3754-63.
190. Amiri KI, Horton LW, LaFleur BJ, Sosman JA, Richmond A. Augmenting chemosensitivity of malignant melanoma tumors via proteasome inhibition: implication for bortezomib (VELCADE, PS-341) as a therapeutic agent for malignant melanoma. *Cancer Res* 2004;64(14):4912-8.
191. Esseltine DW, Schenkein DP. Phase I trials. In: Adams J, editor. *Proteasome inhibitors in cancer therapy*. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 2004. p. 271-82.
192. Jagannath S, Barlogie B, Berenson J, *et al.* A phase 2 study of two doses of bortezomib in relapsed or refractory myeloma. *Br J Haematol* 2004;127(2):165-72.
193. Cusack JC. Rationale for the treatment of solid tumors with the proteasome inhibitor bortezomib. *Cancer Treat Rev* 2003;29(Suppl 1):21-31.
194. Adams J. Development of the proteasome inhibitor PS-341. *Oncologist* 2002;7(1):9-16.
195. Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, *et al.* The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 2001;61(7):3071-6.
196. Ma BB, Bristow RG, Kim J, Siu LL. Combined-modality treatment of solid tumors using radiotherapy and molecular targeted agents. *J Clin Oncol* 2003;21(14):2760-76.
197. Mitsiades N, Mitsiades CS, Richardson PG, *et al.* The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood* 2003;101(6):2377-80.

198. Kamat AM, Karashima T, Davis DW, *et al.* The proteasome inhibitor bortezomib synergizes with gemcitabine to block the growth of human 253JB-V bladder tumors in vivo. *Mol Cancer Ther* 2004;3(3):279-90.
199. Small GW, Shi YY, Edmund NA, Somasundaram S, Moore DT, Orlowski RZ. Evidence that mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 induction by proteasome inhibitors plays an antiapoptotic role. *Mol Pharmacol* 2004;66(6):1478-90.
200. Nawrocki ST, Sweeney-Gotsch B, Takamori R, McConkey DJ. The proteasome inhibitor bortezomib enhances the activity of docetaxel in orthotopic human pancreatic tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* 2004;3(1):59-70.
201. Chauhan D, Singh A, Brahmandam M, *et al.* Combination of proteasome inhibitors bortezomib and NPI-0052 trigger in vivo synergistic cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood* 2008;111(3):1654-64.
202. Pervan M, Pajonk F, Sun JR, Withers HR, McBride WH. Molecular pathways that modify tumor radiation response. *Am J Clin Oncol* 2001;24(5):481-5.
203. Russo SM, Tepper JE, Baldwin AS, Jr., *et al.* Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition: implications for a role of NF-kappaB. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;50(1):183-93.
204. Mitsiades CS, Treon SP, Mitsiades N, *et al.* TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 2001;98(3):795-804.
205. Sayers TJ, Brooks AD, Koh CY, *et al.* The proteasome inhibitor PS-341 sensitizes neoplastic cells to TRAIL-mediated apoptosis by reducing levels of c-FLIP. *Blood* 2003;102(1):303-10.
206. Mimnaugh EG, Xu W, Vos M, *et al.* Simultaneous inhibition of hsp 90 and the proteasome promotes protein ubiquitination, causes endoplasmic reticulum-derived cytosolic vacuolization, and enhances antitumor activity. *Mol Cancer Ther* 2004;3(5):551-66.
207. Denlinger CE, Rundall BK, Jones DR. Proteasome inhibition sensitizes non-small cell lung cancer to histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis through the generation of reactive oxygen species. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;128(5):740-8.

208. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, *et al.* Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(2):540-5.
209. Pei XY, Dai Y, Grant S. Synergistic induction of oxidative injury and apoptosis in human multiple myeloma cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitors. *Clin Cancer Res* 2004;10(11):3839-52.
210. Yu C, Rahmani M, Conrad D, Subler M, Dent P, Grant S. The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis in Bcr/Abl+ cells sensitive and resistant to STI571. *Blood* 2003;102(10):3765-74.
211. Duan J, Friedman J, Nottingham L, Chen Z, Ara G, Van Waes C. Nuclear factor-kappaB p65 small interfering RNA or proteasome inhibitor bortezomib sensitizes head and neck squamous cell carcinomas to classic histone deacetylase inhibitors and novel histone deacetylase inhibitor PXD101. *Mol Cancer Ther* 2007;6(1):37-50.
212. Sun K, Welniak LA, Panoskaltsis-Mortari A, *et al.* Inhibition of acute graft-versus-host disease with retention of graft-versus-tumor effects by the proteasome inhibitor bortezomib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(21):8120-5.
213. Brahimi-Horn C, Pouyssegur J. When hypoxia signalling meets the ubiquitin-proteasomal pathway, new targets for cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;53(2):115-23.
214. San Miguel J, Blade J, Boccadoro M, *et al.* A practical update on the use of bortezomib in the management of multiple myeloma. *Oncologist* 2006;11(1):51-61.
215. Papandreou CN, Logothetis CJ. Bortezomib as a potential treatment for prostate cancer. *Cancer Res* 2004;64(15):5036-43.
216. Dy GK, Thomas JP, Wilding G, *et al.* A phase I and pharmacologic trial of two schedules of the proteasome inhibitor, PS-341 (bortezomib, velcade), in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(9):3410-6.
217. Hegewish-Becker S, Sterneck M, Schubert U, *al. E.* Phase I/II trial of bortezomib in patients with unresectable hepatocellular carcinoma (HCC). *Proc Am Soc Clin Oncol*; 2004; 2004. p. Abst 4089.

218. Messersmith WA, Baker SD, Lassiter L, *et al.* Phase I trial of bortezomib in combination with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2006;12(4):1270-5.
219. Shapiro CL, Ramaswamy B, Young D, *al. E.* Phase I trial of brotezomib (Velcade) in combination with paclitaxel in advanced solid tumor patients. *Proc Am Soc Clin Oncol*; 2005; 2005. p. Abst 3104.
220. Ryan DP, O'Neil BH, Supko JG, *et al.* A Phase I study of bortezomib plus irinotecan in patients with advanced solid tumors. *Cancer* 2006;107(11):2688-97.
221. Hayslip J, Chaudhary U, Green M, *et al.* Bortezomib in combination with celecoxib in patients with advanced solid tumors: a phase I trial. *BMC Cancer* 2007;7:221.
222. Ryan DP, Appleman LJ, Lynch T, *et al.* Phase I clinical trial of bortezomib in combination with gemcitabine in patients with advanced solid tumors. *Cancer* 2006;107(10):2482-9.
223. Iqbal S, Cole S, Yang D, *al. E.* Phase I study of PS-341 (bortezomib) with 5-fluorouracil/leucovorin (5-FU/LV) in advanced solid tumors: A Californian Cancer Consortium study. *Proc Am Soc Clin Oncol*; 2004; 2004. p. Abst 2057.
224. Cohen SJ, Engstrom PF, Lewis NL, *et al.* Phase I study of capecitabine and oxaliplatin in combination with the proteasome inhibitor bortezomib in patients with advanced solid tumors. *Am J Clin Oncol* 2008;31(1):1-5.
225. Davies AM, Ruel C, Lara PN, *et al.* The proteasome inhibitor bortezomib in combination with gemcitabine and carboplatin in advanced non-small cell lung cancer: a California Cancer Consortium Phase I study. *J Thorac Oncol* 2008;3(1):68-74.
226. Aghajanian C, Dizon DS, Sabbatini P, Raizer JJ, Dupont J, Spriggs DR. Phase I trial of bortezomib and carboplatin in recurrent ovarian or primary peritoneal cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(25):5943-9.
227. Milano A, Iaffaioli RV, Caponigro F. The proteasome: a worthwhile target for the treatment of solid tumours? *Eur J Cancer* 2007;43(7):1125-33.
228. Markovic SN, Geyer SM, Dawkins F, *et al.* A phase II study of bortezomib in the treatment of metastatic malignant melanoma. *Cancer* 2005;103(12):2584-9.

229. Maki RG, Kraft AS, Scheu K, *et al.* A multicenter Phase II study of bortezomib in recurrent or metastatic sarcomas. *Cancer* 2005;103(7):1431-8.
230. Shah MH, Young D, Kindler HL, *et al.* Phase II study of the proteasome inhibitor bortezomib (PS-341) in patients with metastatic neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res* 2004;10(18 Pt 1):6111-8.
231. Mackay H, Hedley D, Major P, *et al.* A phase II trial with pharmacodynamic endpoints of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(15):5526-33.
232. Kondagunta GV, Drucker B, Schwartz L, *et al.* Phase II trial of bortezomib for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2004;22(18):3720-5.
233. Davis NB, Taber DA, Ansari RH, *et al.* Phase II trial of PS-341 in patients with renal cell cancer: a University of Chicago phase II consortium study. *J Clin Oncol* 2004;22(1):115-9.
234. Brown J, Von Roenn J, O'Reagan R, *al. E.* A phase II study of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with metastatic breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol*; 2004; 2004. p. Abst 546.
235. Yang CH, Gonzalez-Angulo AM, Reuben JM, *et al.* Bortezomib (VELCADE) in metastatic breast cancer: pharmacodynamics, biological effects, and prediction of clinical benefits. *Ann Oncol* 2006;17(5):813-7.
236. Engel RH, Brown JA, Von Roenn JH, *et al.* A phase II study of single agent bortezomib in patients with metastatic breast cancer: a single institution experience. *Cancer Invest* 2007;25(8):733-7.
237. Dragovich T, Lenz HJ, Lima CMS, *al. E.* Bortezomib +/- irinotecan in relapsed/refractory colorectal cancer: Interim analysis results from phase 2b study. *Proc Am Soc Clin Oncol*; 2004; 2004. p. Abst 3591.
238. Alberts SR, Foster NR, Morton RF, *et al.* PS-341 and gemcitabine in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma: a North Central Cancer Treatment Group (NCCTG) randomized phase II study. *Ann Oncol* 2005;16(10):1654-61.

239. Fanucchi MP, Fossella FV, Belt R, *et al.* Randomized phase II study of bortezomib alone and bortezomib in combination with docetaxel in previously treated advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006;24(31):5025-33.
240. Awada A, Albanell J, Canney PA, *et al.* Bortezomib/docetaxel combination therapy in patients with anthracycline-pretreated advanced/metastatic breast cancer: a phase I/II dose-escalation study. *Br J Cancer* 2008;98(9):1500-7.
241. Dicato M, Boccadoro M, Cavenagh J, *et al.* Management of multiple myeloma with bortezomib: experts review the data and debate the issues. *Oncology* 2006;70(6):474-82.
242. Attar EC, De Angelo DJ, Supko JG, *et al.* Phase I and pharmacokinetic study of bortezomib in combination with idarubicin and cytarabine in patients with acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 2008;14(5):1446-54.
243. Hamilton AL, Eder JP, Pavlick AC, *et al.* Proteasome inhibition with bortezomib (PS-341): a phase I study with pharmacodynamic end points using a day 1 and day 4 schedule in a 14-day cycle. *J Clin Oncol* 2005;23(25):6107-16.
244. Argyriou AA, Iconomou G, Kalofonos HP. Bortezomib-induced peripheral neuropathy in multiple myeloma: a comprehensive review of the literature. *Blood* 2008.
245. Hideshima T, Bradner JE, Chauhan D, Anderson KC. Intracellular protein degradation and its therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 2005;11(24 Pt 1):8530-3.
246. Oerlemans R, Franke NE, Assaraf YG, *et al.* Molecular basis of bortezomib/Velcade(R) resistance: proteasome subunit {beta}5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood* 2008.
247. Orłowski RZ. The ubiquitin proteasome pathway from bench to bedside. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2005:220-5.
248. Chauhan D, Li G, Shringarpure R, *et al.* Blockade of Hsp27 overcomes Bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 resistance in lymphoma cells. *Cancer Res* 2003;63(19):6174-7.

249. Fernandez Y, Miller TP, Denoyelle C, *et al.* Chemical blockage of the proteasome inhibitory function of bortezomib: impact on tumor cell death. *J Biol Chem* 2006;281(2):1107-18.
250. Wojcik C. Regulation of apoptosis by the ubiquitin and proteasome pathway. *J Cell Mol Med* 2002;6(1):25-48.
251. Orlowski RZ. Anthracyclines and bortezomib. In: Adams J, editor. *Anthracyclines and bortezomib*. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 2004. p. 171-80.
252. Papageorgiou A, Kamat A, Benedict WF, Dinney C, McConkey DJ. Combination therapy with IFN-alpha plus bortezomib induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human bladder cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006;5(12):3032-41.
253. Hideshima T, Mitsiades C, Akiyama M, *et al.* Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood* 2003;101(4):1530-4.
254. Jacquemont C, Taniguchi T. Proteasome function is required for DNA damage response and fanconi anemia pathway activation. *Cancer Res* 2007;67(15):7395-405.
255. Pajonk F, Pajonk K, McBride WH. Apoptosis and radiosensitization of hodgkin cells by proteasome inhibition. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47(4):1025-32.
256. Kurland JF, Meyn RE. Protease inhibitors restore radiation-induced apoptosis to Bcl-2-expressing lymphoma cells. *Int J Cancer* 2001;96(6):327-33.
257. Pajonk F, Himmelsbach J, Riess K, Sommer A, McBride WH. The human immunodeficiency virus (HIV)-1 protease inhibitor saquinavir inhibits proteasome function and causes apoptosis and radiosensitization in non-HIV-associated human cancer cells. *Cancer Res* 2002;62(18):5230-5.
258. Munshi A, Kurland JF, Nishikawa T, Chiao PJ, Andreeff M, Meyn RE. Inhibition of constitutively activated nuclear factor-kappaB radiosensitizes human melanoma cells. *Mol Cancer Ther* 2004;3(8):985-92.
259. Goel A, Dispenzieri A, Greipp PR, Witzig TE, Mesa RA, Russell SJ. PS-341-mediated selective targeting of multiple myeloma cells by synergistic increase in ionizing radiation-induced apoptosis. *Exp Hematol* 2005;33(7):784-95.

260. Pajonk F, van Ophoven A, Weissenberger C, McBride WH. The proteasome inhibitor MG-132 sensitizes PC-3 prostate cancer cells to ionizing radiation by a DNA-PK-independent mechanism. *BMC Cancer* 2005;5(1):76.
261. Warren G, Grimes K, Xu Y, Kudrimoti M, St Clair W. Selectively enhanced radiation sensitivity in prostate cancer cells associated with proteasome inhibition. *Oncol Rep* 2006;15(5):1287-91.
262. Achanta G, Modzelewska A, Feng L, Khan SR, Huang P. A boronic-chalcone derivative exhibits potent anticancer activity through inhibition of the proteasome. *Mol Pharmacol* 2006;70(1):426-33.
263. Pajonk F, Grumann T, McBride WH. The proteasome inhibitor MG-132 protects hypoxic SiHa cervical carcinoma cells after cyclic hypoxia/reoxygenation from ionizing radiation. *Neoplasia* 2006;8(12):1037-41.
264. Weber CN, Cerniglia GJ, Maity A, Gupta AK. Bortezomib sensitizes human head and neck carcinoma cells SQ20B to radiation. *Cancer Biol Ther* 2007;6(2):156-9.
265. Kamer S, Ren Q, Dicker AP. Differential radiation sensitization of human cervical cancer cell lines by the proteasome inhibitor velcade (bortezomib, PS-341). *Arch Gynecol Obstet* 2008.
266. Grimes KR, Daosukho C, Zhao Y, Meigooni A, St Clair W. Proteasome inhibition improves fractionated radiation treatment against non-small cell lung cancer: an antioxidant connection. *Int J Oncol* 2005;27(4):1047-52.
267. Goel A, Dispenzieri A, Geyer SM, Greiner S, Peng KW, Russell SJ. Synergistic activity of the proteasome inhibitor PS-341 with non-myeloablative ¹⁵³Sm-EDTMP skeletally targeted radiotherapy in an orthotopic model of multiple myeloma. *Blood* 2006;107(10):4063-70.
268. Van Waes C, Chang AA, Lebowitz PF, *et al.* Inhibition of nuclear factor-kappaB and target genes during combined therapy with proteasome inhibitor bortezomib and reirradiation in patients with recurrent head-and-neck squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;63(5):1400-12.

269. Hoffmann C, Tabrizian S, Wolf E, *et al.* Survival of AIDS patients with primary central nervous system lymphoma is dramatically improved by HAART-induced immune recovery. *Aids* 2001;15(16):2119-27.
270. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002;2(4):301-10.
271. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002;3(3):221-7.
272. May MJ, Ghosh S. Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol* 1997;8(2):63-73.
273. Ahmed KM, Li JJ. NF-kappa B-mediated adaptive resistance to ionizing radiation. *Free Radic Biol Med* 2008;44(1):1-13.
274. Richmond A. Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat Rev Immunol* 2002;2(9):664-74.
275. Criswell T, Leskov K, Miyamoto S, Luo G, Boothman DA. Transcription factors activated in mammalian cells after clinically relevant doses of ionizing radiation. *Oncogene* 2003;22(37):5813-27.
276. <http://www.patentstorm.us/patents/5994529/description.html>.
277. Bressenot A. Effet antitumoral du bortezomib dans un modèle pré clinique de gliome malin chez la souris nude [Médecine]. Nancy: Université Henri Poincaré Nancy 1; 2006.
278. Kremer S, Pinel S, Vedrine PO, *et al.* Ferumoxtran-10 enhancement in orthotopic xenograft models of human brain tumors: an indirect marker of tumor proliferation? *J Neurooncol* 2007;83(2):111-9.
279. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 2006;1(2):581-5.
280. McBride WH, Pajonk F, Chiang CS, Sun JR. NF-kappa B, cytokines, proteasomes, and low-dose radiation exposure. *Mil Med* 2002;167(2 Suppl):66-7.

281. Pajonk F, McBride WH. Ionizing radiation affects 26s proteasome function and associated molecular responses, even at low doses. *Radiother Oncol* 2001;59(2):203-12.
282. Rich JN. Cancer stem cells in radiation resistance. *Cancer Res* 2007;67(19):8980-4.
283. Fomchenko EI, Holland EC. Mouse models of brain tumors and their applications in preclinical trials. *Clin Cancer Res* 2006;12(18):5288-97.
284. Frese KK, Tuveson DA. Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer* 2007;7(9):654-8.
285. Taghian A, DuBois W, Budach W, Baumann M, Freeman J, Suit H. In vivo radiation sensitivity of glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;32(1):99-104.
286. Holland EC, Celestino J, Dai C, Schaefer L, Sawaya RE, Fuller GN. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet* 2000;25(1):55-7.
287. Carver BS, Pandolfi PP. Mouse modeling in oncologic preclinical and translational research. *Clin Cancer Res* 2006;12(18):5305-11.
288. Becher OJ, Holland EC. Genetically engineered models have advantages over xenografts for preclinical studies. *Cancer Res* 2006;66(7):3355-8, discussion 8-9.
289. Weiss WA, Banerjee A. Can mouse models for brain tumors inform treatment in pediatric patients? *Semin Cancer Biol* 2004;14(1):71-7.
290. Taghian AG, Chastagner P. Les modèles animaux dans la recherche de transfert en radiothérapie. In: Mornex F MJ, Droz JP, Marty M, editor. *Chimioradiothérapie concomitante : présent et futur*. Paris: Elsevier; 1999. p. 28-44.
291. Houghton PJ, Cheshire PJ, Myers L, Stewart CF, Synold TW, Houghton JA. Evaluation of 9-dimethylaminomethyl-10-hydroxycamptothecin against xenografts derived from adult and childhood solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 1992;31(3):229-39.
292. Kitagawa H, Tani E, Ikemoto H, Ozaki I, Nakano A, Omura S. Proteasome inhibitors induce mitochondria-independent apoptosis in human glioma cells. *FEBS Lett* 1999;443(2):181-6.

293. Wagenknecht B, Hermisson M, Eitel K, Weller M. Proteasome inhibitors induce p53/p21-independent apoptosis in human glioma cells. *Cell Physiol Biochem* 1999;9(3):117-25.
294. Wagenknecht B, Hermisson M, Groscurth P, Liston P, Krammer PH, Weller M. Proteasome inhibitor-induced apoptosis of glioma cells involves the processing of multiple caspases and cytochrome c release. *J Neurochem* 2000;75(6):2288-97.
295. Tani E, Kitagawa H, Ikemoto H, Matsumoto T. Proteasome inhibitors induce Fas-mediated apoptosis by c-Myc accumulation and subsequent induction of FasL message in human glioma cells. *FEBS Lett* 2001;504(1-2):53-8.
296. Laurent N, de Bouard S, Guillamo JS, *et al.* Effects of the proteasome inhibitor ritonavir on glioma growth in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 2004;3(2):129-36.
297. Yin D, Zhou H, Kumagai T, *et al.* Proteasome inhibitor PS-341 causes cell growth arrest and apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM). *Oncogene* 2005;24(3):344-54.
298. Legnani FG, Pradilla G, Thai QA, *et al.* Lactacystin exhibits potent anti-tumor activity in an animal model of malignant glioma when administered via controlled-release polymers. *J Neurooncol* 2006;77(3):225-32.
299. Yu C, Friday BB, Lai JP, *et al.* Cytotoxic synergy between the multikinase inhibitor sorafenib and the proteasome inhibitor bortezomib in vitro: induction of apoptosis through Akt and c-Jun NH2-terminal kinase pathways. *Mol Cancer Ther* 2006;5(9):2378-87.
300. Styczynski J, Olszewska-Slonina D, Kolodziej B, Napieraj M, Wysocki M. Activity of bortezomib in glioblastoma. *Anticancer Res* 2006;26(6B):4499-503.
301. La Ferla-Bruhl K, Westhoff MA, Karl S, *et al.* NF-kappaB-independent sensitization of glioblastoma cells for TRAIL-induced apoptosis by proteasome inhibition. *Oncogene* 2007;26(4):571-82. Epub 2006 Aug 7.
302. Koschny R, Holland H, Sykora J, *et al.* Bortezomib sensitizes primary human astrocytoma cells of WHO grades I to IV for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Clin Cancer Res* 2007;13(11):3403-12.

303. Kardosh A, Golden EB, Pyrko P, *et al.* Aggravated endoplasmic reticulum stress as a basis for enhanced glioblastoma cell killing by bortezomib in combination with celecoxib or its non-coxib analogue, 2,5-dimethyl-celecoxib. *Cancer Res* 2008;68(3):843-51.
304. Yu C, Friday BB, Yang L, *et al.* Mitochondrial Bax translocation partially mediates synergistic cytotoxicity between histone deacetylase inhibitors and proteasome inhibitors in glioma cells. *Neuro Oncol* 2008;10(3):309-19.
305. Lu C, Shervington A. Chemoresistance in gliomas. *Mol Cell Biochem* 2008.
306. Lightcap ES, McCormack TA, Pien CS, Chau V, Adams J, Elliott PJ. Proteasome inhibition measurements: clinical application. *Clin Chem* 2000;46(5):673-83.
307. Williamson MJ, Blank JL, Bruzzese FJ, *et al.* Comparison of biochemical and biological effects of ML858 (salinosporamide A) and bortezomib. *Mol Cancer Ther* 2006;5(12):3052-61.
308. Meiners S, Heyken D, Weller A, *et al.* Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of Mammalian proteasomes. *J Biol Chem* 2003;278(24):21517-25.
309. Xu H, Ju D, Jarois T, Xie Y. Diminished feedback regulation of proteasome expression and resistance to proteasome inhibitors in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2007;13:13.
310. Lee CS, Tee LY, Warmke T, *et al.* A proteasomal stress response: pre-treatment with proteasome inhibitors increases proteasome activity and reduces neuronal vulnerability to oxidative injury. *J Neurochem* 2004;91(4):996-1006.
311. Meiners S, Ludwig A, Stangl V, Stangl K. Proteasome inhibitors: Poisons and remedies. *Med Res Rev* 2007;19:19.
312. Bence NF, Sampat RM, Kopito RR. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 2001;292(5521):1552-5.
313. Crawford LJ, Walker B, Irvine AE. Proteasome inhibitors: a therapeutic strategy for haematological malignancy. *Front Biosci* 2008;13:4285-96.

314. Kraus M, Ruckrich T, Reich M, *et al.* Activity patterns of proteasome subunits reflect bortezomib sensitivity of hematologic malignancies and are variable in primary human leukemia cells. *Leukemia* 2007;21(1):84-92.
315. Berkers CR, van Leeuwen FW, Groothuis TA, *et al.* Profiling proteasome activity in tissue with fluorescent probes. *Mol Pharm* 2007;4(5):739-48.
316. Ovaa H. Active-site directed probes to report enzymatic action in the ubiquitin proteasome system. *Nat Rev Cancer* 2007;7(8):613-20.
317. Verdoes M, Florea BI, Menendez-Benito V, *et al.* A fluorescent broad-spectrum proteasome inhibitor for labeling proteasomes in vitro and in vivo. *Chem Biol* 2006;13(11):1217-26.
318. Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL. Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin* 2007;25(4):867-90, vii.
319. Lee SW, Fraass BA, Marsh LH, *et al.* Patterns of failure following high-dose 3-D conformal radiotherapy for high-grade astrocytomas: a quantitative dosimetric study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;43(1):79-88.
320. Kiehna EN, Mulhern RK, Li C, Xiong X, Merchant TE. Changes in attentional performance of children and young adults with localized primary brain tumors after conformal radiation therapy. *J Clin Oncol* 2006;24(33):5283-90.
321. Laack NN, Brown PD. Cognitive sequelae of brain radiation in adults. *Semin Oncol* 2004;31(5):702-13.
322. Steinbach JP, Weller M. Apoptosis in gliomas: molecular mechanisms and therapeutic implications. *J Neurooncol* 2004;70(2):245-54.
323. Ziegler DS, Kung AL, Kieran MW. Anti-apoptosis mechanisms in malignant gliomas. *J Clin Oncol* 2008;26(3):493-500.
324. Faria MH, Goncalves BP, do Patrocinio RM, de Moraes-Filho MO, Rabenhorst SH. Expression of Ki-67, topoisomerase IIalpha and c-MYC in astrocytic tumors: correlation with the histopathological grade and proliferative status. *Neuropathology* 2006;26(6):519-27.

325. Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, Matheny SL, Brat DJ, Van Meir EG. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro Oncol* 2005;7(2):134-53.
326. Vaupel P. Blood flow and metabolic microenvironment of brain tumors. *J Neurooncol* 1994;22(3):261-7.
327. Bonnefont-Rousselot D. [Oxidation of lipoproteins and mechanism of action of antioxidants : contribution of gamma radiolysis]. *Ann Biol Clin (Paris)* 1999;57(4):409-16.
328. Matsumoto H, Hamada N, Takahashi A, Kobayashi Y, Ohnishi T. Vanguard of paradigm shift in radiation biology: radiation-induced adaptive and bystander responses. *J Radiat Res (Tokyo)* 2007;48(2):97-106.
329. Moeller BJ, Richardson RA, Dewhirst MW. Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26(2):241-8.
330. Dahlberg WK, Azzam EI, Yu Y, Little JB. Response of human tumor cells of varying radiosensitivity and radiocurability to fractionated irradiation. *Cancer Res* 1999;59(20):5365-9.
331. Huang L, Snyder AR, Morgan WF. Radiation-induced genomic instability and its implications for radiation carcinogenesis. *Oncogene* 2003;22(37):5848-54.
332. Prise KM, Schettino G, Folkard M, Held KD. New insights on cell death from radiation exposure. *Lancet Oncol* 2005;6(7):520-8.
333. Baumann M, Krause M, Hill R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nat Rev Cancer* 2008.
334. Tsai MH, Cook JA, Chandramouli GV, *et al.* Gene expression profiling of breast, prostate, and glioma cells following single versus fractionated doses of radiation. *Cancer Res* 2007;67(8):3845-52.
335. Kim JJ, Tannock IF. Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure. *Nat Rev Cancer* 2005;5(7):516-25.
336. Limoli CL, Giedzinski E, Morgan WF, Swartz SG, Jones GD, Hyun W. Persistent oxidative stress in chromosomally unstable cells. *Cancer Res* 2003;63(12):3107-11.

337. Tomita N, Shibamoto Y, Ito M, *et al.* Biological effect of intermittent radiation exposure in vivo: recovery from sublethal damage versus reoxygenation. *Radiother Oncol* 2008;86(3):369-74.
338. Pervan M, Iwamoto KS, McBride WH. Proteasome structures affected by ionizing radiation. *Mol Cancer Res* 2005;3(7):381-90.
339. Kim K, Brush JM, Watson PA, Cacalano NA, Iwamoto KS, McBride WH. Epidermal growth factor receptor vIII expression in U87 glioblastoma cells alters their proteasome composition, function, and response to irradiation. *Mol Cancer Res* 2008;6(3):426-34.
340. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
341. Pacifico F, Leonardi A. NF-kappaB in solid tumors. *Biochem Pharmacol* 2006;72(9):1142-52.
342. Rayet B, Gelinas C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 1999;18(49):6938-47.
343. Van Waes C. Nuclear factor-kappaB in development, prevention, and therapy of cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13(4):1076-82.
344. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 2006;441(7092):431-6.
345. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF-kB in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* 2005;446(5):475-82.
346. Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2005;5(4):297-309.
347. Smith D, Shimamura T, Barbera S, Bejcek BE. NF-kappaB controls growth of glioblastomas/astrocytomas. *Mol Cell Biochem* 2008;307(1-2):141-7.
348. Hayashi S, Yamamoto M, Ueno Y, *et al.* Expression of nuclear factor-kappa B, tumor necrosis factor receptor type 1, and c-Myc in human astrocytomas. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2001;41(4):187-95.

349. Nagai S, Washiyama K, Kurimoto M, Takaku A, Endo S, Kumanishi T. Aberrant nuclear factor-kappaB activity and its participation in the growth of human malignant astrocytoma. *J Neurosurg* 2002;96(5):909-17.
350. Wang H, Wang H, Zhang W, Huang HJ, Liao WS, Fuller GN. Analysis of the activation status of Akt, NFkappaB, and Stat3 in human diffuse gliomas. *Lab Invest* 2004;84(8):941-51.
351. Nagai S, Kurimoto M, Washiyama K, Hirashima Y, Kumanishi T, Endo S. Inhibition of cellular proliferation and induction of apoptosis by curcumin in human malignant astrocytoma cell lines. *J Neurooncol* 2005;74(2):105-11.
352. Robe PA, Bentires-Alj M, Bonif M, *et al.* In vitro and in vivo activity of the nuclear factor-kappaB inhibitor sulfasalazine in human glioblastomas. *Clin Cancer Res* 2004;10(16):5595-603.
353. Li L, Gondi CS, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Rao JS. Transfection with anti-p65 intrabody suppresses invasion and angiogenesis in glioma cells by blocking nuclear factor-kappaB transcriptional activity. *Clin Cancer Res* 2007;13(7):2178-90.
354. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999;18(49):6853-66.
355. Brach MA, Hass R, Sherman ML, Gunji H, Weichselbaum R, Kufe D. Ionizing radiation induces expression and binding activity of the nuclear factor kappa B. *J Clin Invest* 1991;88(2):691-5.
356. Huang TT, Wuerzberger-Davis SM, Wu ZH, Miyamoto S. Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell* 2003;115(5):565-76.
357. Raju U, Lu R, Noel F, Gumin GJ, Tofilon PJ. Failure of a second X-ray dose to activate nuclear factor kappaB in normal rat astrocytes. *J Biol Chem* 1997;272(39):24624-30.
358. Sung MH, Bagain L, Chen Z, *et al.* Dynamic Effect of Bortezomib on NF-{kappa}B Activity and Gene Expression in Tumor Cells. *Mol Pharmacol* 2008.
359. Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;59(4):928-42.

360. Wilson GD. Radiation and the cell cycle, revisited. *Cancer Metastasis Rev* 2004;23(3-4):209-25.
361. Schmidt-Ullrich RK, Contessa JN, Dent P, *et al.* Molecular mechanisms of radiation-induced accelerated repopulation. *Radiat Oncol Investig* 1999;7(6):321-30.
362. Turesson I, Carlsson J, Brahme A, Glimelius B, Zackrisson B, Stenerlow B. Biological response to radiation therapy. *Acta Oncol* 2003;42(2):92-106.
363. Dewey WC, Ling CC, Meyn RE. Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;33(4):781-96.
364. Chendil D, Ranga RS, Meigooni D, Sathishkumar S, Ahmed MM. Curcumin confers radiosensitizing effect in prostate cancer cell line PC-3. *Oncogene* 2004;23(8):1599-607.
365. Kim BY, Kim KA, Kwon O, *et al.* NF-kappaB inhibition radiosensitizes Ki-Ras-transformed cells to ionizing radiation. *Carcinogenesis* 2005;26(8):1395-403.
366. Sun Y, St Clair DK, Fang F, *et al.* The radiosensitization effect of parthenolide in prostate cancer cells is mediated by nuclear factor-kappaB inhibition and enhanced by the presence of PTEN. *Mol Cancer Ther* 2007;6(9):2477-86.
367. Tamatani T, Azuma M, Ashida Y, *et al.* Enhanced radiosensitization and chemosensitization in NF-kappaB-suppressed human oral cancer cells via the inhibition of gamma-irradiation- and 5-FU-induced production of IL-6 and IL-8. *Int J Cancer* 2004;108(6):912-21.
368. Perkins ND. NF-kappaB: tumor promoter or suppressor? *Trends Cell Biol* 2004;14(2):64-9.
369. Perkins ND, Gilmore TD. Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ* 2006;13(5):759-72.
370. Chen Z, Ricker JL, Malhotra PS, *et al.* Differential bortezomib sensitivity in head and neck cancer lines corresponds to proteasome, nuclear factor-kappaB and activator protein-1 related mechanisms. *Mol Cancer Ther* 2008;7(7):1949-60.
371. Markovina S, Callander NS, O'Connor SL, *et al.* Bortezomib-Resistant Nuclear Factor-kappaB Activity in Multiple Myeloma Cells. *Mol Cancer Res* 2008;6(8):1356-64.

372. Yang DT, Young KH, Kahl BS, Markovina S, Miyamoto S. Prevalence of bortezomib-resistant constitutive NF-kappaB activity in mantle cell lymphoma. *Mol Cancer* 2008;7:40.
373. Allen C, Saigal K, Nottingham L, Arun P, Chen Z, Van Waes C. Bortezomib-induced apoptosis with limited clinical response is accompanied by inhibition of canonical but not alternative nuclear factor- κ B subunits in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14(13):4175-85.
374. Shi YY, Small GW, Orlowski RZ. Proteasome inhibitors induce a p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent anti-apoptotic program involving MAPK phosphatase-1 and Akt in models of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2006;100(1):33-47.
375. Sloss CM, Wang F, Liu R, *et al.* Proteasome inhibition activates epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR-independent mitogenic kinase signaling pathways in pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2008;14(16):5116-23.
376. Mohiuddin MM, Harmon DC, Delaney TF. Severe acute enteritis in a multiple myeloma patient receiving bortezomib and spinal radiotherapy: case report. *J Chemother* 2005;17(3):343-6.
377. Berges O, Decaudin D, Servois V, Kirova YM. Concurrent radiation therapy and bortezomib in myeloma patient. *Radiother Oncol* 2008;86(2):290-2.

ANNEXES

Liste des abréviations

AA : Astrocytomes Anaplasiques

AAA : *ATPases Associated with a variety of cellular Activities*

17-AAG : *17-N-AllylAmino-17-demethoxyGeldenamycin*

ACNU : *1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)-methyl-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea*

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : ADN complémentaire

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

Ara-C : Aracytine

ARN : Acide RiboNucléique

ATM : *Ataxia Telangiectasia Mutated*

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

AUC : *Area Under Curve*

BAG-1 : *Bcl-2-associated AthanoGene*

BCNU : carmustine

BHE : Barrière Hémato Encéphalique

Bq : Becquerel

BTZ : BorTéZomib

Cct : concomitant

CDK : Cyclin-Dependant Kinase

CF : Cystic Fibrosis

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane Receptor

CHIP : *Carboxy terminus of Hsp70-Interacting Protein*

CKI : Cyclin-dependant Kinase Inhibitor

c-Ra : acide *cis*-rétinoïque

COX2 : CycloOXygénase 2

CYP : Cytochrome P450

DCC : Deleted in Colon Cancer

DCT : Délai de Croissance Tumorale

DMT : Dose Maximale Tolérée

DNA-PK : *DNA-dependent Protein Kinase*

DUB : enzyme de DéUBiquitinylation

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor*

ENac : *Epithelial Na⁺ channel*

EORTC : *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*

ERAD : *Endoplasmic Reticulum-Associated protein Degradation*

c-FLIP : *FADD Like Interleukin 1 β converting enzyme Inhibitory Protein*

FLT-3 : *FMS Like Tyrosine kinase 3*

5-FU : 5-FluoroUracile

GBM : glioblastome

GM : gliome malin

Gy : Gray

HAART : *Highly Active Anti Retroviral Therapy*

HDAC : *Histone DeAcetylase*

HECT : *Homologous to the E6-AP Carboxy-Terminus*

HER2/neu : *Human Epidermal growth factor Receptor 2*

HHV : *Human Herpes Virus*

HPV : *Human Papilloma Virus*

Hsp : *Heat Shock Protein*

I κ B : *Inhibitor of NF- κ B*

IAP : *Inhibitor of Apoptosis*

ICAM-1 : *pro-Inflammatory Cell Adhesion Molecule 1*

IKK : *I- κ B Kinases*

IL : *InterLeukin*

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

JAMM/MPN⁺ : *JAB 1/MPN/Mov34 metalloenzyme/Mrp1p Pad1p N-terminal domain*

JNK : *c-Jun N terminal Kinase*

LLC : Leucémie Lymphoblastique Chronique

LMA : Leucémie Myéloblastique Aiguë

LMC : Leucémie Myéloïde Chronique

LOH : *Loss Of Heterozygosity*

MAPK : *Mitogen Activated Protein Kinase*

MDM2 : *Mouse Double Minute 2*

MGMT : *O6-MethylGuanine-DNA MethylTransferase*

MKP-1 : *Mitogen-activated protein Kinase Phosphatase-1*

MMR : *Mutations in the DNA Mismatch Repair*

MS : Maladie Stable

mTOR : *Mammalian Target Of Rapamycin*

NCI : *National Cancer Institute*

NEMO : *NF- κ B Essential MOdulator*

NF- κ B : *Nuclear Factor-kappa B*

NLS : Nuclear Localisation Signal

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OTU : *Ovarian Tumor*

PCNA : *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

PCV : procarbazine – lomustine - vincristine

PDGFR : *Platelet Derived Growth Factor Receptor*

P-gp : P-glycoprotein

PKC β : *Protein Kinase C β*

PI3K : *Phosphatidylinositol-3 Kinase*

PTEN : *Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome 10*

PSA : *Prostate Specific Antigen*

Rb : *Retinoblastoma Protein*

RC : Réponse Complète

RCT : Retard de Croissance Tumorale

RE : Réticulum Endoplasmique

RING : *Really Interesting New Gene*

RP : Réponse Partielle

Rpn : *Regulatory particle triple-A protein*

Rpt : *Regulatory particle non-ATPase*

RR : Response Rate

RRP : Ratio de RadioPotentialisation

RCh : RadioChirurgie

RT : RadioThérapie

RT-PCR : *Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*

RUPTure : *Regulated Ubiquitin/proteasome-dependent Processing*

SAHA : *SuberoylAnilide Hydroxamic Acid*

SAPK : *Stress Activated Protein Kinase*

SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis

Src : SaRComa protein kinase

SUMO : *Small Ub-related MOdifier*

Tm : température de fusion

TMZ : témozolomide

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

TRAIL : *TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*

TRAF : *TNF Receptor-Associated Factor 1*

TSC : *Tuberous Sclerosis Complex*

Ub : ubiquitine

UBP : *UBiquitin-specific processing Protease group*

UCH : *Ubiquitin Carboxy-terminal Hydroxylases*

UPR : *Unfolded Protein Response*

VCAM-1 : *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

VEGFR : *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*

VHL : *Von Hippel Lindau*

Liste des tableaux

Tableau I : Classification histologique des tumeurs gliales selon l’OMS (2007)	6
Tableau II : Essais cliniques mettant en œuvre des agents de thérapie ciblée dans les gliomes de haut grade	14
Tableau III : Les différents types d’interaction entre chimiothérapie et radiations ionisantes	23
Tableau IV : Résultats des études de traitement des gliomes de haut grade de l’adulte par radiothérapie et chimiothérapie	25
Tableau V : Classification et caractéristiques des enzymes E3 à RING finger	44
Tableau VI : Les différents modes de reconnaissance du substrat par les E3s ligases	45
Tableau VII : Exemples de protéines régulatrices de l’apoptose dégradées par le système ubiquitine-protéasome	61
Tableau VIII : Classification des principaux inhibiteurs de protéasome	73
Tableau IX : Agents influençant les fonctions du système ubiquitine-protéasome	76
Tableau X : Principales études précliniques <i>in vivo</i> du bortézomib seul	83
Tableau XI : Principales études précliniques du bortézomib en association	85

Tableau XII : Etudes cliniques de phase I du bortézomib dans les tumeurs solides	87
Tableau XIII : Etudes cliniques de phase II dans les tumeurs solides (bortézomib seul)	89
Tableau XIV : Etudes de phase II du bortézomib administré en association dans les tumeurs solides	91
Tableau XV : Associations radiothérapie et inhibiteur de protéasome – Etudes <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	100
Tableau XVI : Mécanismes potentiellement impliqués dans les phénomènes de radiosensibilisation par les inhibiteurs de protéasome	103
Tableau XVII : Principales altérations génétiques des lignées TCG3 et U87	111
Tableau XVIII : Etapes de la réaction de transcription inverse	122
Tableau XIX : Caractéristiques des différents couples d’amorces utilisés pour l’amplification des ADNc	123
Tableau XX : Etapes de la PCR quantitative	124
Tableau XXI : Composition des gels d’acrylamide	126
Tableau XXII : Composition du tampon de transfert	127
Tableau XXIII : Protocole d’activation des membranes	128
Tableau XXIV : Délais (DCT) et retards de croissance tumorale (RCT) médians pour les lignées TCG3 et U87	139
Tableau XXV : Impact des traitements sur la distribution dans le cycle cellulaire	145

Tableau XXVI : Bilan de l'ensemble des résultats obtenus	177
Tableau XXVII : Inhibiteurs de protéasome dans des modèles de gliomes et de gliosarcomes	182
Tableau XXVIII : Effets dose-dépendants des inhibiteurs de protéasome	187

Liste des figures

Figure 1 : Anomalies génétiques impliquées dans le développement des tumeurs gliales.	8
Figure 2 : Les deux types de coopération entre radiothérapie et chimiothérapie.	22
Figure 3 : Les 4 processus conduisant à une dégradation lysosomale.	31
Figure 4 : Mécanisme simplifié de la dégradation des substrats protéiques par le système ubiquitine-protéasome.	32
Figure 5 : Structure du protéasome 26S.	33
Figure 6 : Structure du protéasome 20S.	34
Figure 7 : Structure du complexe régulateur 19S.	37
Figure 8 : Représentation tri-dimensionnelle de l'ubiquitine.	39
Figure 9 : Les différents types d'ubiquitinylation des protéines.	40
Figure 10 : Les différentes étapes de l'ubiquitinylation des protéines.	41
Figure 11 : Structure des complexes multimériques SCF, CBC et APC/C.	44

Figure 12 : Interaction de la protéine CHIP avec le protéasome et la protéine chaperone Hsp70.	51
Figure 13 : Les différentes étapes de la dégradation des substrats polyubiquitylés.	52
Figure 14 : Mécanisme de transfert rétrograde des protéines dénaturées du reticulum endoplasmique ou ERAD.	57
Figure 15 : Intervention du système ubiquitine-protéasome dans la progression dans le cycle cellulaire.	60
Figure 16 : Mécanismes de dégradation de p27 dans les cellules normales et tumorales.	64
Figure 17 : Structures des principaux inhibiteurs de protéasome.	74
Figure 18 : Représentation schématique des protéines appartenant à la famille Rel.	104
Figure 19 : Voie d'activation classique de NF- κ B.	105
Figure 20 : Schéma thérapeutique.	112
Figure 21 : Irradiation d'une tumeur par l'appareil de radiothérapie de contact.	113
Figure 22 : Effets des traitements sur le volume tumoral médian.	131
Figure 23 : Effets des traitements sur la survie de souris porteuses de tumeurs TCG3 et U87.	136
Figure 24 : Photographie représentant le marquage nucléaire brun-rouge obtenu après détection immunohistochimique de la protéine Ki-67.	140
Figure 25 : Effets des traitements non fractionnés sur le marquage immunohistochimique de Ki-67.	141

Figure 26 : Effets des traitements fractionnés sur le marquage immunohistochimique de Ki-67.	142
Figure 27 : Impact des traitements sur l'indice de prolifération moyen.	143
Figure 28 : Effet des traitements sur l'indice de prolifération calculé à partir de la distribution dans le cycle cellulaire.	148
Figure 29 : Photographie représentant le marquage cytoplasmique brun-rouge obtenu après détection immunohistochimique de la caspase-3 clivée.	150
Figure 30 : Effets des traitements non fractionnés sur le marquage immunohistochimique de la caspase-3 clivée.	151
Figure 31 : Effets des traitements fractionnés sur le marquage immunohistochimique de la caspase-3 clivée.	152
Figure 32 : Impact des traitements sur l'indice apoptotique moyen.	153
Figure 33 : Effet du bortézomib en injection unique sur l'activité chymotrypsine-like médiane du protéasome au niveau tumoral.	156
Figure 34 : Effet du bortézomib (0,90 mg/kg x 1) sur l'expression des protéines ubiquitinylées 24h après l'injection de BTZ.	157
Figure 35 : Expression des protéines ubiquitinylées 24h après une injection iv de BTZ à 0,90 mg/kg.	158
Figure 36 : Effets du fractionnement de la dose de bortézomib sur l'activité chymotrypsine-like médiane du protéasome.	159
Figure 37 : Effet du bortézomib (0,45 mg/kg x 2) sur l'expression des protéines ubiquitinylées.	160

Figure 38 : Expression des protéines ubiquitinyllées 24h après deux injections iv de BTZ à 0,45 mg/kg.	160
Figure 39 : Effets de la radiothérapie fractionnée ou non sur l'activité chymotrypsine-like médiane du protéasome.	161
Figure 40 : Effets du bortézomib sur l'activité chymotrypsine-like médiane du protéasome radio-induite 2h après la dernière fraction d'irradiation.	163
Figure 41 : Expression moyenne de p65 et de p50 sous forme active à l'état basal : comparaison du cerveau humain sain à 2 modèles de gliome malin humain xéno greffés.	164
Figure 42 : Effets de la radiothérapie sur l'expression des formes actives de p65 et p50.	166
Figure 43 : Effet de la radiothérapie sur l'expression médiane des gènes codant pour le TNF α et l'IL-6.	169
Figure 44 : Effets de la radiothérapie associée ou non au bortézomib sur l'expression des formes actives de p65 et p50 pour les lignées TCG3 et U87.	171
Figure 45 : Effet de la radiothérapie sur l'expression médiane des gènes codant pour le TNF α et l'IL-6.	174

PUBLICATIONS
COMMUNICATIONS ORALES ET
AFFICHEES

Publications

Communications orales et affichées

PUBLICATIONS

Labussière M., Aarnink A., Pinel S., Taillandier L., Escanyé JM., Barberi-Heyob M., Bernier-Chastagner V., Plénat F., Chastagner P.

"Interest of doxorubicin encapsulated or not in liposomes as radiosensitizer in the treatment of malignant glioma xenografts".

Anticancer Drugs 2008, *accepté*.

Labussière M., Pinel S., Delfortrie S., Plénat F., Chastagner P.

"Proteasome inhibition by bortezomib does not translate into efficacy on two human malignant glioma xenografts".

Oncology Reports 2008, *accepté*.

COMMUNICATIONS ORALES

M. Labussière, S. Pinel, L. Taillandier, V. Bernier-Chastagner, F. Plénat, P. Chastagner.

"Impact du fractionnement sur les propriétés radiosensibilisantes du bortézomib sur deux modèles de gliome malin humain xéno greffés".

Congrès Annuel de l'Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française. Perpignan, France, Mai 2008.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

M. Vandamme, S. Pinel, M. Labussière, N. Monhoven, V. Bernier, F. Plénat, P. Chastagner.
"Involvement of VEGF and TNF α in the radiosensitizing effect of gefitinib in malignant glioma xenografts"

2^{ème} Forum du Cancéropôle du Grand Est. Vittel, France, Octobre 2008 (Abstract accepté en août 2008).

P. Chastagner, M. Labussière, M. Vandamme, M. Barberi-Heyob, V. Bernier, F. Plénat.
"Impact of treatment fractionation on radiosensitizing properties of bortezomib in human malignant glioma xenografts models"

13th International Symposium on Pediatric Neuro Oncology. Chicago, USA, Juillet 2008
(Poster THER 11, *publié dans Neuro-Oncology, Juin 2008, 509*).

M. Vandamme, S. Pinel, M. Labussière, N. Monhoven, V. Bernier, F. Plénat, P. Chastagner.
"Implication of HIF-1 and NF- κ B in the radiosensitizing effect of gefitinib on human malignant glioma xenografts"

20th Meeting of the European Association for Cancer Research. Lyon, France, Juillet 2008
(Poster # 222).

M. Labussière, S. Pinel, M. Vandamme, M. Barberi-Heyob, V. Bernier, F. Plénat, P. Chastagner.

"Bortezomib is not a radiosensitizer for human malignant glioma xenografts treated with clinically relevant schedules"

43th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. San Diego, USA, Avril 2008 (Poster # 425).

P. Chastagner, A. Aarnink, V. Bernier, M. Labussière, S. Pinel.

"Comparison of doxorubicin and a not pegylated liposomal form as radiosensitizer in high grade glioma and rhabdomyosarcoma xenografts"

39th Annual Congress of the International Society of Paediatric Oncology. Mumbai, Inde, Novembre 2007 (Poster # PA.003, *publié dans Pediatric Blood & Cancer, 2007, 49 (4), 440*).

M. Labussière, S. Pinel, M. Vandamme, V. Bernier, F. Plénat, P. Chastagner.

"NF- κ B involvement in human glioma radioresponse in vivo. Implications for radiosensitization by bortezomib"

1^{er} Forum du Cancéropôle du Grand Est. Vittel, France, Octobre 2007 (Poster # A3.13)

M. Labussière, S. Pinel, V. Bernier, F. Plénat, P. Chastagner.

"NF- κ B involvement in human glioma radioresponse in vivo. Implications for radiosensitization by bortezomib"

Novel Targeting Drugs and Radiotherapy 2nd meeting. Toulouse, France, Juin 2007 (Poster # 30).

P. Chastagner, M. Labussière, A. Aarnink, S. Pinel, V. Bernier, F. Fouyssac.

"Comparison of doxorubicin and a liposomal form as radiosensitizer in high grade glioma and rhabdomyosarcoma xenografts"

48th meeting of the American Society for Therapeutic Radiology and Oncology 48th meeting. Philadelphia USA, November 2006 (Poster # 2664, *publié dans International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2006, 66 (3) supplement 1, S579).

P. Chastagner, M. Labussière, S. Pinel, V. Bernier, F. Fouyssac, F. Plénat.

"Comparison of doxorubicin and its non-pegylated liposomal form as radiosensitizer in high grade glioma xenografts"

41th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology. Orlando, USA, Mai 2005 (Poster # 1542, *publié dans Journal of Clinical Oncology*, 2005, 23 (16) supplément 1 124).

M. Labussière, S. Pinel, V. Bernier, F. Fouyssac, F. Plénat.

"Comparison of doxorubicin and its non-pegylated liposomal form as radiosensitizer in high grade glioma xenografts".

Novel Targeting Drugs and Radiotherapy 1st meeting. Toulouse, France, Juin 2005 (Poster # 27).

Proteasome inhibition by bortezomib does not translate into efficacy on two malignant glioma xenografts

MARIANNE LABUSSIÈRE^{1*}, SOPHIE PINEL^{1*}, SUZANNE DELFORTRIE¹,
FRANÇOIS PLENAT^{1,2} and PASCAL CHASTAGNER^{1,3}

¹EA 4001 Nancy Université, Avenue de la Forêt de Haye, BP184; ²Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Hôpital de Brabois CHRU Nancy; ³Service d'Oncologie Pédiatrique, Hôpital d'Enfants CHRU Nancy, Rue du Morvan, F-54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France

DOI: 10.3892/or_00000000

Abstract. Bortezomib and other proteasome inhibitors have demonstrated an interesting antitumor activity against glioma cell lines. The present study aimed to evaluate the cytotoxic potential of bortezomib *in vivo* on two human malignant glioma xenografts using doses relevant to clinical practice. The TCG3 and U87 malignant glioma xenografts were heterotopically implanted onto nude mice. Bortezomib effects were evaluated using the three different doses of 0.25, 0.45 and 0.90 mg/kg. Proteasome chymotrypsin-like activity was measured by a fluorimetric method. Analysis of the cell cycle distribution was performed after propidium iodide staining. The apoptotic rate and proliferative index were determined by an immunohistochemical detection of cleaved caspase-3 and Ki-67, respectively. Our data showed that bortezomib induced a dose-dependent inhibition of proteasome chymotrypsin-like activity in the two glioma models. Maximal inhibition was achieved 24 h after drug injection and was ~30% of basal proteasome activity. However, this effect did not induce any increase in the apoptotic rate and did not modify cell cycle distribution. At the maximal dose tested (0.90 mg/kg), bortezomib did not show any growth delay as compared to untreated tumors, in either of the xenograft models. In conclusion, our study is the first to demonstrate that bortezomib, at a clinically relevant dose, did not have any effect on the apoptosis and proliferation of malignant gliomas *in vivo*. These results contrast with the promising preclinical data obtained *in vitro* with this drug and

emphasize the importance of performing preclinical studies on animal models, in conditions close to clinical settings.

Introduction

Malignant gliomas are the most common primary central nervous system tumors in adults and are uniformly fatal despite aggressive therapy. Currently, standard-of-care for glioblastoma consists of surgical resection and ionizing irradiation concomitantly delivered with temozolomide, followed by adjuvant temozolomide (1). Although many chemotherapeutic regimens have been proposed, the median survival for patients with newly diagnosed malignant glioma is 8-15 months and has not significantly increased in the last three decades. Only 3% of patients are still alive 5 years after diagnosis (2). The failure of current therapies can be linked to multiple factors including inherent tumor resistance to standard chemo- and radiotherapy, early invasion of tumor cells into normal brain preventing complete surgical resection, and limitations of drug delivery due to the blood-brain barrier. Thus, new treatment concepts or cytotoxic drugs are urgently needed to improve patient outcome.

The ubiquitin-proteasome pathway plays an essential role in the degradation of most short- and long-lived intracellular proteins in eukaryotic cells. At the heart of this degradative pathway is the 26S proteasome, an adenosine triphosphate-dependent multicatalytic protease (3). Proteolytic degradation of damaged, oxidized, or misfolded proteins is part of the housekeeping role for the 26S proteasome. In addition, the 26S proteasome plays a vital role in degrading regulatory proteins that govern the cell cycle, transcriptional factor activation, apoptosis and cell trafficking (3,4). Proteasome inhibitors represent a relatively new class of antineoplastic agents that act by interfering with the catalytic 20S core of the proteasome, thereby preventing the elimination of diverse cellular proteins targeted for degradation (5,6). Bortezomib is the first-in-class proteasome inhibitor that had reached clinical trials and is currently indicated in the treatment of relapsed/recurrent multiple myeloma patients (7). Initial preclinical screening by the National Cancer Institute revealed that bortezomib potently inhibited cell proliferation in a broad range of tumor types, including glioblastoma cell lines (8).

Correspondence to: Dr Sophie Pinel, EA 4001 Radiopotentialisation: de la préclinique à la clinique, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye, BP184, F-54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France
E-mail: pinel.sophie@aliceadsl.fr

*Contributed equally

Key words: bortezomib, malignant glioma, xenograft models

Such results have been confirmed by recent studies reporting on the effects of bortezomib on human glioma cell lines (9,10). Among these studies, Yin *et al.* (10) have demonstrated that bortezomib induced a G2/M cell cycle arrest associated with an increase of apoptotic cells in the two glioma cell lines and primary glioblastoma explants.

Thus, the present study aimed to evaluate the effect of bortezomib *in vivo* on two human malignant glioma xenografts using regimens close to clinical practice.

Materials and methods

Animals and tumors. Athymic NCr/Sed nude (nu/nu) female mice, 7-8 weeks of age, were purchased from Charles River® (St. Germain sur l'Arbresle, France) and housed for 1 week before experimentation. For all experiments, animals had access to food and water *ad libitum*. Animal procedures were performed according to institutional and national guidelines (EC directive 86/609/CEE, French decree no. 87-848). Surgical procedures were carried out under general anesthesia obtained by intraperitoneal (i.p.) injection of xylazine 8 mg/kg and ketamine 90 mg/kg.

Tumor xenografts were obtained as previously described (11). Briefly, the first model (TCG3) was derived from an anaplastic oligodendroglioma (according to WHO grading, 2007) of a 58-year-old woman. Samples of the patient tumor were directly subcutaneously (s.c.) transplanted into the hind leg of mice, providing the first xenografts. The second model (U87) was originally obtained by subcutaneously injecting a suspension of U87 human malignant glioma cells (10^6 cells in 0.1 ml 0.9% NaCl), purchased from the American Type Culture Collection (*HTB-14*), into the hind legs of mice. TCG3 and U87 glioma models were then maintained *in vivo* by sequential passages of tumor fragments in nude mice. Tumor samples are regularly analyzed to ensure the genetic stability of the xenografts.

Treatment procedures. Treatments started when tumors reached a volume of 250 ± 50 mm³ (V0). Mice were randomly assigned into different groups. In the CTRL group, mice were not treated. Bortezomib (BTZ) was administered intravenously (i.v.) at different doses (0.25, 0.45 or 0.90 mg/kg). BTZ was provided by Janssen-Cilag (Issy les Moulineaux, France) and was prepared according to the manufacturer's instructions.

20S proteasome activity. The effects of bortezomib on proteasome chymotrypsin-like activity were measured as previously described (8,12). Briefly, at a selected time point after i.v. bortezomib administration, tumor samples were collected and frozen at -80°C . After thawing, tumor samples were weighed and homogenized in 2 ml/g lysis buffer (50 mM Tris HCl; 2 mM DTT; 5 mM MgCl₂ and 250 mM sucrose). After centrifugation (10,000 g for 10 min at 4°C), supernatants were collected and the protein concentration was measured. Protein (100 μg) from each sample was diluted in lysis buffer to a final volume of 100 μl and the fluorogenic peptide substrate (succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, Sigma) was added at a final concentration of 100 μM . The reaction mixtures were incubated at 37°C for 2 h. Free 7-amido-4-methylcoumarin (AMC) liberated by the substrate hydrolysis was quantified on

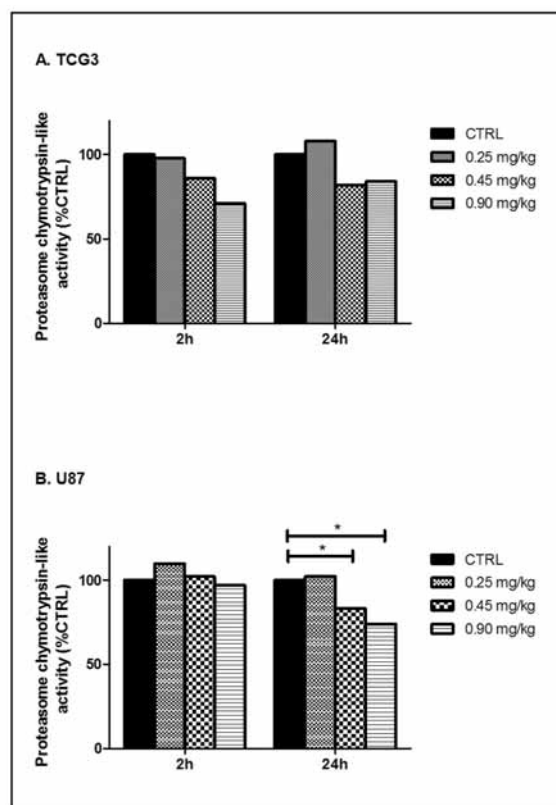


Figure 1. Effect of bortezomib on proteasome chymotrypsin-like activity in TCG3 (A) and U87 (B) xenografts. Activity was assessed 2 and 24 h after i.v. bortezomib administration by a fluorimetric assay. Results are expressed as a median activity of at least four tumors per treatment group; * $p < 0.05$.

a fluorescence plate reader (Safas, Monaco) with an excitation filter of 380 nm and an emission filter of 460 nm.

Cell cycle distribution. Cell cycle distribution was determined by DNA content analysis after propidium iodide staining. Briefly, tumor samples were incubated with trypsin (0.03 mg/ml) and were dissociated using a Potter pestle. Samples were then treated with RNase A (0.1 mg/ml) and incubated with propidium iodide (0.4 mg/ml) for 30 min in the dark. Before cytometry, samples were filtered on a nylon mesh. An analysis of cell cycle distribution was performed using a FACSCalibur flow cytometer equipped with CellQuest and ModFit LT software (Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany).

Proliferation and apoptotic determination. Proliferation and apoptotic indices were determined by immunohistochemistry as previously described (13). Briefly, 24 h after bortezomib treatment, tumors were excised and immediately fixed in 10% (v/v) buffered formalin, pH 7.4, for 72 h and paraffin-embedded. Serial coronal 5 μm sections were cut through the center of the xenografts. Proliferation and apoptotic indices were measured on sections stained either with a species-unspecific rabbit monoclonal antibody (clone SP6, Lab vision Corporation, Westinghouse, USA; diluted 1:100) to the cell cycle-associated antigen Ki-67, or with an anti-cleaved caspase-3 rabbit anti-serum (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA; diluted 1:1000) and the percentage of positively-

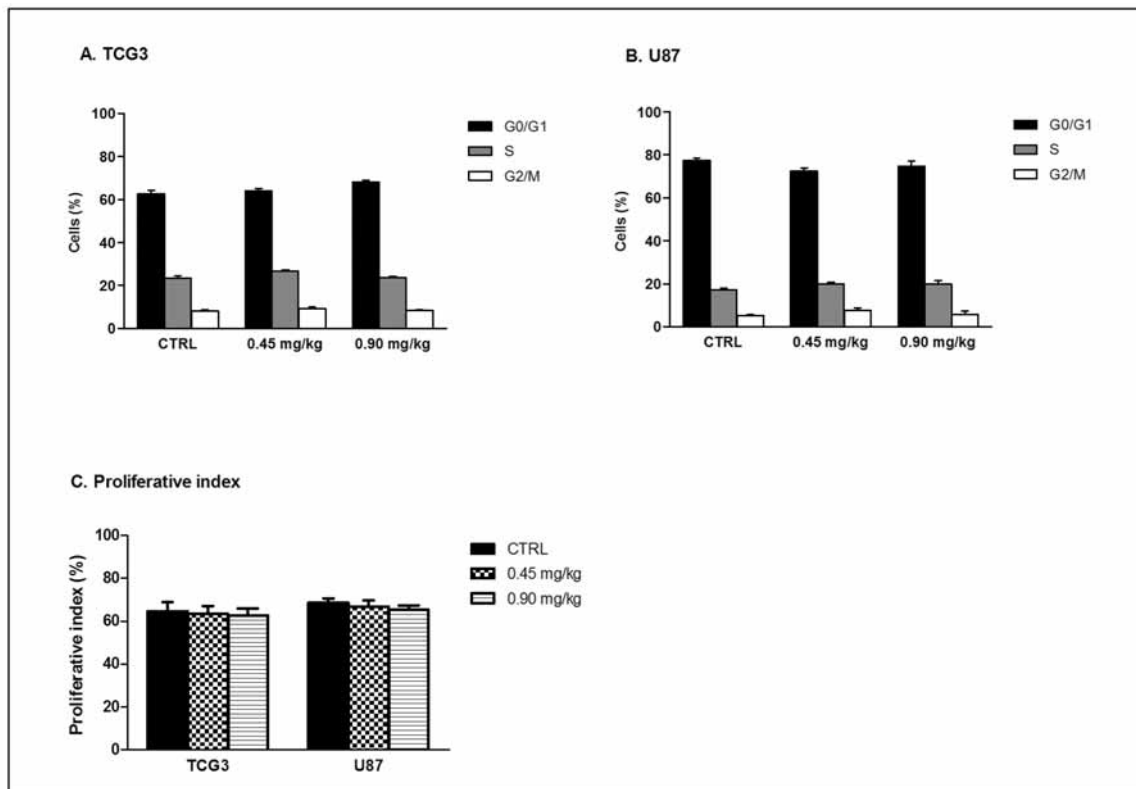


Figure 2. Effect of bortezomib on tumor proliferation and cell cycle distribution. (A and B) Cell cycle analysis in TCG3 (A) and U87 (B) xenografts. Cell cycle distribution was analyzed 24 h after the bortezomib injection. Cell cycle was assessed by propidium iodide staining and flow cytometry. For each treatment, the percentage of cells in the G0/G1, S, or G2/M phase of the cell cycle indicated is the mean distribution (\pm SD) of at least 4 tumors. (C) The proliferative index corresponds to the percentage of tumor cells positively labeled for Ki-67 and was determined 24 h after the bortezomib injection. A minimum of 1000 tumor cells was counted for each tumor. For each treatment group, results are expressed as the mean apoptotic index (\pm SD) of at least 4 tumors.

labeled tumor cells for at least 1000 counted tumor cells was recorded in independent areas of the main tumor masses which were free of necrosis. Antigen retrieval was carried out with a 2100 Proteogenix Retriever (Proteogenix, Fegersheim, France) following the manufacturer's instructions. Primary antibodies were applied for 16 h at 4°C. Detection of the tissue-bound primary antibodies was performed using the biotinylated antibody/streptavidin-peroxidase detection system. Bound peroxidase was identified using the Novared™ detection system.

Antitumor effect of bortezomib. To follow tumor growth, tumor volume was determined three times per week. Two perpendicular diameters were measured with a caliper, and the tumor volume (V in mm^3) was calculated as $V = (\text{length} \times \text{width}^2)/2$. Tumor volumes were recorded until tumors reached 3 times their initial volume ($3 \times V_0$).

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using GraphPad 5.0 software. For each parameter analyzed, treated and non-treated tumors were compared using the non-parametric Mann-Whitney U test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Bortezomib effects on proteasome chymotrypsin-like activity. To explore the impact of bortezomib on its target, the

proteasome chymotrypsin-like activity was assessed 2 and 24 h after the i.v. administration of bortezomib in TCG3 and U87-bearing mice. The different doses tested were: 0.25, 0.45 and 0.90 mg/kg (Fig. 1).

Our results showed that bortezomib induced a dose-dependent inhibition of proteasome activity in the two glioma models. In TCG3 xenografts (Fig. 1A), proteasome chymotrypsin-like activity was decreased to the same extent (20-30% of basal proteasome activity) 2 and 24 h after the treatment of mice receiving either 0.45 or 0.90 mg/kg. In U87 tumors (Fig. 1B), bortezomib did not modify the proteasome chymotrypsin-like activity 2 h after the injection. In contrast, bortezomib led to a significant 20-30% inhibition of the proteasome activity 24 h after drug injection using 0.45 and 0.90 mg/kg doses ($p=0.026$ and 0.005 , respectively). Thus, bortezomib reached its target and inhibited it on the two models used.

Bortezomib effects on cell cycle distribution and proliferation index. To explore the impact of bortezomib *in vivo*, we evaluated the consequences of proteasome inhibition on cell cycle distribution assessed by flow cytometry after propidium iodide staining in our two glioma models. Our results showed that bortezomib did not modify distribution in the cell cycle in TCG3 and U87 xenografts (Fig. 2A and B). For example, in the TCG3 model, percentages of cells in the G2/M phase were 8.2 ± 0.4 vs. $8.3 \pm 0.4\%$ for CTRL and BTZ at 0.90 mg/kg, respectively.

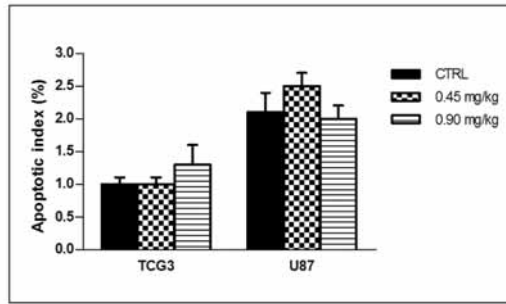


Figure 3. Effect of bortezomib on the apoptotic index of TCG3 and U87 glioma models. The apoptotic index corresponds to the percentage of tumor cells positively labeled for cleaved caspase-3 and was determined 24 h after the bortezomib injection. A minimum of 1000 tumor cells was counted for each tumor. For each treatment group, results are expressed as the mean apoptotic index (\pm SD) of at least 4 tumors.

We examined the effect of bortezomib on the proliferative index, determined by immunohistochemical detection of the cell cycle-associated antigen Ki-67. Our results demonstrated that the two glioma models used presented a similar proliferative index (Fig. 2C). In the TCG3 model, $64.8 \pm 4.1\%$ cells were positively stained for Ki-67 and the proliferative index for U87 tumors was $68.6 \pm 2.0\%$. Bortezomib had no significant effect on cell proliferation within 24 h following a single i.v. injection at 0.45 or 0.90 mg/kg. For example, at the dose of 0.90 mg/kg, proliferative indices in bortezomib-receiving mice were $62.7 \pm 3.2\%$ for the TCG3 model and $65.4 \pm 2.0\%$ for U87 xenografts.

Bortezomib did not induce apoptosis on glioma models. The apoptotic index was determined 24 h after the bortezomib injection by immunohistochemical detection of the cleaved caspase-3.

TCG3- and U87-untreated xenografts showed a limited apoptotic index of 1.0 ± 0.1 and $2.1 \pm 0.3\%$, respectively (Fig. 3). Our results demonstrated that bortezomib did not induce any enhancement in the apoptotic index on either TCG3 nor U87 glioma models. For example, in tumors treated with a dose of 0.90 mg/kg, the apoptotic index was only 1.3 ± 0.3 and $2.0 \pm 0.2\%$ for TCG3 and U87 xenografts, respectively.

Bortezomib did not reduce tumor growth in vivo. To explore the antitumor effect of bortezomib, it was administered at the highest tested dose of 0.90 mg/kg to tumor-bearing mice. Tumor growth was followed three times per week until the tumors reached 3 times their initial volume (Fig. 4).

In the CTRL groups, the mean times to reach 3V0 were 7.0 ± 0.9 and 11.9 ± 1.5 days for TCG3 and U87 models, respectively. In the two models, BTZ did not present any antitumor effect and the mean times to reach 3V0 were 8.6 ± 1.6 and 13.8 ± 0.9 days for TCG3 and U87, respectively. The difference with CTRL groups did not reach the level of statistical significance.

Discussion

Proteasome inhibitors represent a new group of cytotoxic agents that target the 20S proteasome, a component of the

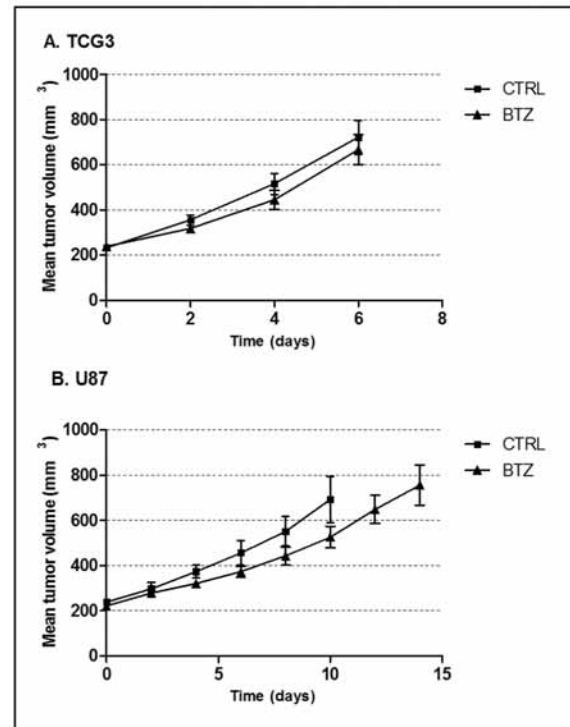


Figure 4. Effect of bortezomib on TCG3 (A) and U87 (B) growth. Tumor-bearing mice were randomly assigned in the two groups of CTRL (TCG3 model n=9 and U87 model n=7) and BTZ (TCG3 model n=9 and U87 model n=10). Treatments began when tumor volume reached 250 ± 50 mm³ (V0). BTZ was injected (i.v.) at the dose of 0.90 mg/kg on D0. Tumor volume was measured three times per week. For each treatment group, results are expressed as the mean tumor volume (\pm SD) evolution.

ubiquitin-proteasome complex responsible for the degradation of unwanted cellular proteins (3,5). Although the mechanism by which proteasome inhibitors kill neoplastic cells is not well defined, these molecules are potent apoptotic inducers and their antitumor potential has been reported in a wide variety of tumors (8,14,15). Moreover, the clinical results of bortezomib in multiple myeloma provided proof of concept for proteasome inhibition as an anticancer approach and have prompted the investigation of this drug in other malignancies. However, only a few studies are available concerning the effect of bortezomib on glioma cells, each of them being realized on established glioma cell lines and/or primary glioblastoma explants. These studies have demonstrated that as with other proteasome inhibitors, bortezomib is able to induce apoptosis in glioma cell lines *in vitro* (9,10,16-18). To our knowledge, preclinical studies using bortezomib on *in vivo* brain tumor models have yet to be reported on.

In the present study, we investigated the effect of bortezomib *in vivo* on two human malignant glioma models. We selected 0.90 mg/kg as the highest dose tested, since it corresponds to the weekly clinical dose of bortezomib administered in the treatment of multiple myeloma patients, i.e. 2.6 mg/m² (14). Our study demonstrates that bortezomib administered at this clinically relevant dose did not present any antitumor effect on glioma models.

Considering the effects of bortezomib on its target, our results showed that bortezomib was able to reduce the

proteasome chymotrypsin-like activity of ~30% of basal activity in the 24 h following the injection of 0.90 mg/kg for the two models studied. Comparable levels of proteasome inhibition *in vivo* have already been reported for other tumors treated with similar doses of bortezomib. For example, using a multiple myeloma model xenografted into nude mice, LeBlanc *et al* have reported that bortezomib (1 mg/kg i.v.) was able to inhibit 35% of the proteasome chymotrypsin-like activity in tumors and induced an apoptotic response and a tumor growth delay, as compared to untreated tumors (19). Thus, the cellular consequences of partial proteasome inhibition appear to be cell-type dependent, although a similar proteasome inhibition did not affect myeloma and glioma cells to the same extent, since bortezomib was clearly unable to induce apoptosis in our glioma models. Moreover, we showed that bortezomib had no effect on the proliferative index and cell cycle distribution.

Our results are in contrast with those from Yin *et al* (10), who have demonstrated that ~15% of U87 cells became apoptotic when cultured for 48 h with bortezomib. These authors have demonstrated that bortezomib induced a G2/M cell cycle arrest and the percentage of cells in the G2/M phase increased ~2-fold after their exposure to bortezomib for 24 h. Moreover, Styczynski *et al* (9) demonstrated that the two glioblastoma cell lines showed good sensitivity to bortezomib, as compared to an acute lymphoblastic leukemia cell line.

The discrepancy between our *in vivo* results and the relatively promising *in vitro* data obtained by others can be explained by several methodological findings. In the study of Styczynski *et al* (9), the efficacy of BTZ is compared to that obtained for leukemia culture cells using drugs essentially active against leukemia rather than glioma. The choice of the tumor model used may explain the discrepancies observed between our study and other published data. Studies have undertaken to report on established glioma cell lines in cell culture assays. In spite of the great insights offered by these types of models, established tumor cell lines poorly represent the cellular heterogeneity observed in tumors. In contrast, xenograft models, constituted by tumoral and stromal cells, are closer to the original tumor from which they are derived (20,21). Tumor cells from our xenografts are poorly exposed to bortezomib to the same extent as cells grown in monolayer cultures and to our knowledge, the effects of bortezomib on proteasome chymotrypsin-like activity in glioma cell cultures have yet to be reported on. It is thus possible that our xenografts did not receive a sufficient dose of bortezomib to present similar patterns of cell cycle distribution and apoptosis to those obtained *in vitro*.

Finally, the results presented in this study do not support the use of bortezomib in the treatment of high-grade gliomas. Our results, contrary to data obtained from *in vitro* studies, emphasize the importance of performing preclinical studies using *in vivo* tumor models, before initiating clinical studies.

Acknowledgements

We are grateful to the French 'Ligue Contre le Cancer, Comités Lorrains' and 'Association pour la Recherche sur le

Cancer' for financial support. We thank Dr L. Bolotine and S. Marchal (CAV CRAN UMR 7039 CNRS, Nancy University, Vandoeuvre-les-Nancy) for their assistance with fluorimetry and flow cytometry.

References

1. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, *et al*: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 987-996, 2005.
2. Ohgaki H and Kleihues P: Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 109: 93-108, 2005.
3. Glickman MH and Ciechanover A: The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82: 373-428, 2002.
4. Mani A and Gelmann EP: The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *J Clin Oncol* 23: 4776-4789, 2005.
5. Ludwig H, Khayat D, Giaccone G and Facon T: Proteasome inhibition and its clinical prospects in the treatment of hematologic and solid malignancies. *Cancer* 104: 1794-1807, 2005.
6. Mitsiades CS, Mitsiades N, Hideshima T, Richardson PG and Anderson KC: Proteasome inhibition as a therapeutic strategy for hematologic malignancies. *Expert Rev Anticancer Ther* 5: 465-476, 2005.
7. Kane RC, Farrell AT, Sridhara R and Pazdur R: United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy. *Clin Cancer Res* 12: 2955-2960, 2006.
8. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, *et al*: Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 59: 2615-2622, 1999.
9. Styczynski J, Olszewska-Slonina D, Kolodziej B, Napieraj M and Wysocki M: Activity of bortezomib in glioblastoma. *Anticancer Res* 26: 4499-4503, 2006.
10. Yin D, Zhou H, Kumagai T, *et al*: Proteasome inhibitor PS-341 causes cell growth arrest and apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM). *Oncogene* 24: 344-354, 2005.
11. Chastagner P, Kozin SV and Taghian A: Topotecan selectively enhances the radio response of human small-cell lung carcinoma and glioblastoma multiforme xenografts in nude mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50: 777-782, 2001.
12. Lightcap ES, McCormack TA, Pien CS, Chau V, Adams J and Elliott PJ: Proteasome inhibition measurements: clinical application. *Clin Chem* 46: 673-683, 2000.
13. Kremer S, Pinel S, Vedrine PO, *et al*: Ferumoxtran-10 enhancement in orthotopic xenograft models of human brain tumors: an indirect marker of tumor proliferation? *J Neurooncol* 83: 111-119, 2007.
14. Adams J, Elliott PJ and Bouchard P: Preclinical development of bortezomib (VELCADE™). In: *Proteasome Inhibitors in Cancer Therapy*. Adams J (ed). Totowa, NJ, pp233-269, 2004.
15. Dou QP and Li B: Proteasome inhibitors as potential novel anticancer agents. *Drug Resist Updat* 2: 215-223, 1999.
16. Kitagawa H, Tani E, Ikemoto H, Ozaki I, Nakano A and Omura S: Proteasome inhibitors induce mitochondria-independent apoptosis in human glioma cells. *FEBS Lett* 443: 181-186, 1999.
17. Wagenknecht B, Hermisson M, Eitel K and Weller M: Proteasome inhibitors induce p53/p21-independent apoptosis in human glioma cells. *Cell Physiol Biochem* 9: 117-125, 1999.
18. Legnani FG, Pradilla G, Thai QA, *et al*: Lactacystin exhibits potent anti-tumor activity in an animal model of malignant glioma when administered via controlled-release polymers. *J Neurooncol* 77: 225-232, 2006.
19. LeBlanc R, Catley LP, Hideshima T, *et al*: Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model. *Cancer Res* 62: 4996-5000, 2002.
20. Frese KK and Tuveson DA: Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer* 7: 654-658, 2007.
21. Rich JN: Cancer stem cells in radiation resistance. *Cancer Res* 67: 8980-8984, 2007.



Interest of liposomal doxorubicin as a radiosensitizer in malignant glioma xenografts

Marianne Labussière^a, Alice Aarnink^a, Sophie Pinel^a, Luc Taillandier^{a,g}, Jean-Marie Escanyé^b, Muriel Barberi-Heyob^c, Valérie Bernier-Chastagner^d, François Plénat^{a,e} and Pascal Chastagner^{a,f}

Malignant glioma patients have a life expectancy reduced to about 15 months despite aggressive surgery, radiotherapy (RT), and chemotherapy. Doxorubicin has shown a marked cytotoxic effect against malignant glioma cells *in vitro*. The brain exposure to this drug is, however, hindered by the blood–brain barrier. Encapsulation of doxorubicin in liposomal carriers has been shown to reduce toxicities and to improve brain tumors exposure to doxorubicin. In this study, we evaluated the radiosensitizing properties of a nonpegylated liposomal doxorubicin (Myocet, MYO) on two subcutaneous (U87 and TCG4) and one intracranial (U87) malignant glioma models xenografted on nude mice. Doxorubicin biodistribution was assessed by a high-performance liquid chromatography method. Antitumor efficacy was investigated by tumor volume measurements and mice survival determination. We showed that (i) encapsulation of doxorubicin ensured a preferential deposition of doxorubicin in tumoral tissue in comparison with free doxorubicin; (ii) doxorubicin accumulated in both subcutaneous and intracranial tumors during repeated injections of MYO and this accumulation was linked to the potentiation of RT efficacy on two subcutaneous models;

Introduction

Malignant brain tumors are still a therapeutic challenge: despite aggressive surgery, radiotherapy (RT), and chemotherapy, prognosis of high-grade glioma patients remains poor and their life expectancy is reduced to few months [1]. For several years, the concomitant administration of RT and temozolomide, after adjuvant temozolomide is the first-line therapeutic standard for newly diagnosed glioblastoma multiforme patients [2]. This new clinical protocol underlines that concomitant chemoradiation could be a relevant strategy for the treatment of high-grade gliomas, the antineoplastic molecule exerting its own cytotoxic activity and acting as a radiosensitizer.

Doxorubicin has shown a marked cytotoxic effect against malignant glioma cells *in vitro* [3]. Doxorubicin, however, does not reach therapeutic concentration in the central

(iii) MYO was unable to improve the antitumoral efficacy of RT on an intracranial glioma model. Finally, this study emphasizes the importance of performing preclinical studies on models closer as possible of human tumors and localization to be more predictive of therapeutic effects observed in humans. *Anti-Cancer Drugs* 00:000–000 © 2008 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Anti-Cancer Drugs 2008, 00:000–000

Keywords: concomitant chemoradiotherapy, liposomal doxorubicin, malignant glioma

^aEA 4001 Radiopotentialisation : de la préclinique à la clinique. Nancy Université, ^bMéthodologie RMN. Nancy Université, CNRS UMR 7565, ^cCentre de Recherche en Automatique. Nancy Université, CNRS UMR 7039, ^dDépartement de Radiothérapie. Centre Alexis Vautrin, ^eService d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, ^fService d'Oncologie Pédiatrique. Hôpital d'Enfants CHU Nancy, F-54500 Vandoeuvre-les-Nancy and ^gService de Neurologie. Hôpital Central CHU Nancy, F-54000 Nancy, France

Correspondence to Sophie Pinel, PharmD, PhD, EA 4001 Radiopotentialisation de la préclinique à la clinique, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye-BP184, Vandoeuvre-les-Nancy F-54500, France
Tel: +33 3 83683204; e-mail: pinel.sophie@aliceadsl.fr

Received 2 June 2008 Accepted 7 August 2008

nervous system because of its low lipophilicity and the blood–brain barrier that presents active drug efflux mediated by multidrug –resistance-related proteins [4,5]. Moreover, doxorubicin presents significant toxicity to normal tissues, in particular acute mucosal toxicities and long-term cardiac toxicity [6,7]. For about 20 years, liposomal formulations of doxorubicin have been developed to overcome these obstacles. Two types of liposomal doxorubicin have entered clinical trials and are approved for cancer treatment: conventional liposomes (Myocet, Elan Pharmaceuticals, Inc., Cedar knolls, New Jersey, USA) and ‘stealth’ pegylated liposomes (Caelyx, Alza Pharmaceuticals, San Bruno, California, USA), which differ from the first ones by the presence of a polyethylene glycol (PEG) coating on their surface [8]. In both cases, the liposome protects the drug from metabolism and, because of size limitations in the transport of carriers across healthy endothelium, doxorubicin accumulates to a reduced extent in healthy tissues, hence limiting drug toxicities [9,10]. Moreover, discontinuities

Marianne Labussière and Alice Aarnink contributed equally to the work.

in the endothelium of tumor vasculature have been shown to result in an increased extravasation of liposomes, and, in combination with impaired lymphatics, an increased accumulation of liposomal doxorubicin at the tumor site [8,11–13].

To date, almost all published data dealing with the effects of liposomal doxorubicin in glioma models have used the only commercialized pegylated liposomal form of doxorubicin, Caelyx. In preclinical studies, an increased concentration of doxorubicin has been obtained in intracerebral tumor models [14,15], and was linked to an improved therapeutic efficacy for pegylated liposomal doxorubicin in intracranial gliosarcoma models [15,16]. These promising results have, however, not been translated into clinical benefit: pegylated liposomal doxorubicin only produced a modest survival increase when administered alone in patients with recurrent high-grade glioma [17,18], despite enhanced tumor exposure to doxorubicin, as shown by Koukourakis *et al.* [19]. It is not surprising that, in highly resistant tumoral type (i.e. such as high-grade glioma), a cytotoxic drug delivered alone cannot markedly improve overall therapeutic response and it is expected that a multiple-modalities treatment would give better results. Although radiosensitizing properties of doxorubicin have been well documented [20], some researchers have investigated the interest of combining RT with pegylated liposomal doxorubicin and have ascertained the superiority of the association in the treatment of osteosarcoma [21] and head and neck [22] xenografts. To date, no study has reported the use of such an association in malignant glioma treatment.

The major difference between pegylated liposomes and conventional liposomes is the reduced uptake by the reticuloendothelial system (RES) of pegylated liposomes. Indeed, conventional liposomes are cleared from the circulation by macrophages of the RES, in particular those of the liver and spleen. The attachment of PEG to the surface of the liposome reduces the rate of uptake by the RES [8]. This PEG coating considerably prolongs the circulation half-life of doxorubicin but also leads to its accumulation in skin and induces grade 3 palmar–plantar erythrodysesthesia in approximately 20% of the patients, requiring reductions in the doxorubicin dose [23]. In this regard, doxorubicin entrapped in conventional liposomes seems to be much safer. To our knowledge, however, preclinical studies using conventional liposomal doxorubicin alone or in combination with RT have never been reported yet.

As (i) doxorubicin has been shown to be efficient against malignant glioma cells *in vitro*, (ii) liposome encapsulation of doxorubicin has been shown to trigger tumoral tissue, and (iii) because earlier studies have shown the radiosensitizing properties of doxorubicin, we postulated that a

conventional liposomal form a doxorubicin (Myocet, MYO) will be of interest in concomitant administration with RT for the treatment of human high-grade glioma xenografts. It is the first study designed to evaluate the radiosensitizing properties of MYO on two subcutaneous and one intracranial malignant glioma models xenografted on nude mice.

Materials and methods

Animals and tumors

Athymic NCr/Sed nude (*nu/nu*) female mice, 7–8 weeks of age, were obtained from Charles River (Saint-Germain-sur-l'Abresle, France). Animal procedures were performed according to institutional and national guidelines (EC directive 86/609/CEE, French decree no. 87–848). All surgical and MRI procedures were carried out under general anesthesia obtained by intraperitoneal (i.p.) injection of xylazine (8 mg/kg) and ketamine (90 mg/kg).

Tumors xenografts were obtained as described earlier [24]. In brief, the first human malignant glioma model (U87) was originally obtained by subcutaneous (s.c.) injection of a suspension of U87 cells (10^6 cells in 0.1 ml of 0.9% NaCl) into the hind legs of mice (HTB-14, American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA). The second model (TCG4) was derived from an anaplastic oligodendroglioma (according to the WHO grading, 2007) of a 72-year-old man. Pieces of the patient's tumor were directly subcutaneously transplanted into the hind legs of mice, providing the first xenografts. U87 and TCG4 glioma models were then maintained *in vivo* by sequential passages of tumor fragments in nude mice.

Grafts

For the experiments, source tumors were excised, cleaned from necrotic tissue, cut into small fragments and subcutaneously or intracranially implanted into each experimental mouse. For the subcutaneous model, tumor fragments were subcutaneously grafted in the inguinal pit, against the femoral vessels. In the case of the intracranial graft, a craniotomy flap was made and raised, after opening the mouse's skull skin. A 1-mm³ graft was then slid under the meninges and into the brain cortex in its temporo-occipital area.

MRI imaging and image processing

MRI measurements were conducted on a Bruker Biospec Avance 24/40NMR spectro-imager (Bruker Biospin, Ettlingen, Germany) at 2.35 T using a T1-weighted spin–echo sequence and gadolinium contrast enhancement. The sequence parameters were as follows: TR = 500 ms and TE = 18 ms. For each experiment, 10 images were acquired, corresponding to 10 slices of 1.3 mm in thickness, spaced regularly at 1.8 mm, in the transverse plane, with a field of view of 6.54 cm, and 192

phases. In this way, the total acquisition time was 8 min. Gadobenate dimeglumine (Multihance, Bracco Altana Pharma Laboratories, Konstanz, Germany) was administered intravenously (0.4 mmol/kg) 10 min before image acquisition. Anesthetized mice were placed on a bed, which were lent totally into the antenna (sensitive volume: 3 cm diameter–4 cm length).

Treatment protocols

Treatments started when tumors reached a volume of about $250 \pm 50 \text{ mm}^3$ (V_0) for subcutaneous model and when tumor presence was assessed by MRI examination for intracranial model. In a preliminary study, serial MRI were undertaken to assess the presence of the tumor and to enable tumor volume measurements. By MRI examination, U87 tumors became observable as a distinct entity 13–17 days after implantation, hence defining the beginning of the treatments (D0).

At D0 (corresponding to the first day of treatment), mice were randomly assigned into four groups. In the intracranial model, animals were randomized to have a similar range of small, medium and large tumor volumes in each group. In the control group (CTRL), the mice received i.p. injection with saline (0.9% NaCl). In the MYO group, the mice received i.p. injection with

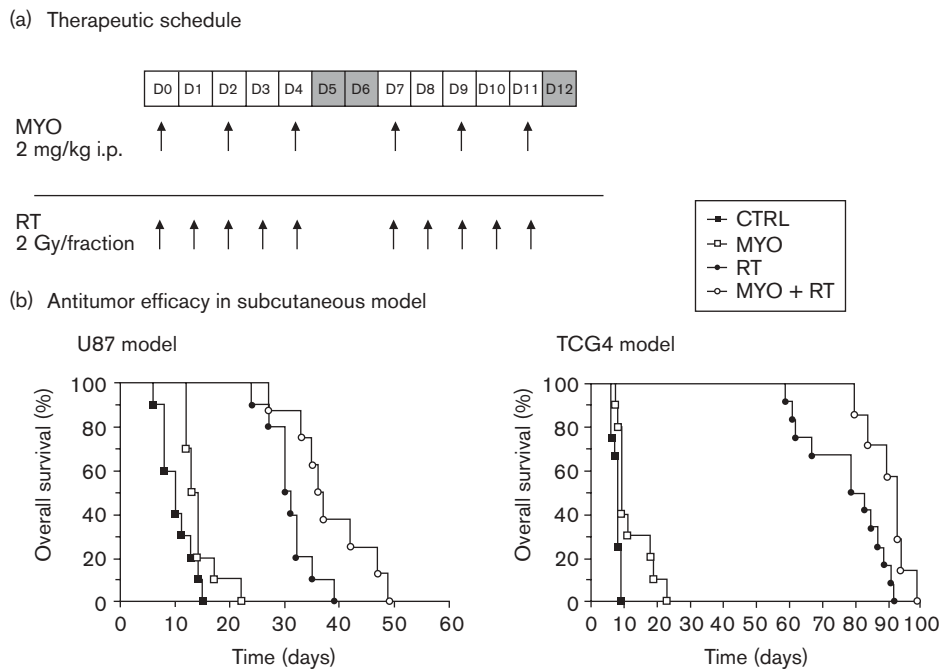
conventional liposomal doxorubicin at a daily dose of 2 mg/kg 3 days/week for two consecutive weeks, leading to a total dose of 12 mg/kg. In the RT group, the tumors were irradiated at the total dose of 20 Gy (10 fractions of 2 Gy, once daily, 5 days/week over 2 weeks). A Pantak Therapax SXT 150 apparatus (Pantak Medical Systems, AGFA NDT, Limonest, France) was used for local irradiation with a 2.0 aluminum filter and a collimator of 1.5 cm in diameter. The dose rate was 2.77 Gy/min. The dose was calculated on the skin (100%). In the MYO + RT mice groups, MYO was injected according to the earlier schedule during the entire ionizing radiation treatment (Fig. 1).

Treatments effects

To follow tumor growth in the subcutaneous model, tumor volume was determined three times per week. Two perpendicular diameters were measured with a caliper. Tumor volume (V in cubic millimeters) was calculated as $V = (\text{length} \times \text{width}^2)/2$. Mice were anesthetized and killed by cervical dislocation when the tumors reached three times their initial volume ($3 V_0$), thus defining the ‘survival times’.

For the intracranial model, the mice were observed for body weight reduction. They were killed by cervical

Fig. 1



(a) Treatment schedules. Treatments began when tumor volume reached $250 \pm 50 \text{ mm}^3$ for subcutaneous tumors and when tumors were objective by MRI examination for the intracranial ones (D0). Myocet (MYO) was injected at the dose of 2 mg/kg intraperitoneally (i.p.) 3 days/week. Radiation therapy (RT) consisted in a daily fraction of 2 Gy, 5 days/week. Treatments were administered for two consecutive weeks. (b) Response of subcutaneous glioma xenografts to antitumoral treatments. (a) U87 model (at least eight mice per group). (b) TCG4 model (at least seven mice per group). Mice were randomly assigned into four groups: control (CTRL) (■); MYO (□); RT (●), and MYO + RT (○). Results are expressed as Kaplan–Meier plots, considering the percentage of tumors not having reached $3 V_0$ as the survival end point.

dislocation when they presented signs of neurological disorders or when their body weight reduction was more than 20% of their original weight, the time to this moment being referred to as 'survival time'. The response to the different treatments was also assessed by MRI examination once a week until death to evaluate tumor growth. Tumor volume was estimated according to the following method: two perpendicular diameters were measured on the MRI slice, which shows the largest area of tumor and tumor volume was then calculated using the formula described for subcutaneous tumor.

For both the models used, the survival times of mice were recorded. The percentage of increase in the life span was calculated as $[(T-C)/C] \times 100$, where T and C are the survival times of the treated and control animals. We also calculated the radiopotential ratio (RP), defined as $T_{MYO+RT}/(T_{MYO} + T_{RT})$, corresponding to the comparison between the observed effect for the association and the theoretical additive effect of MYO alone and RT alone. If the ratio equals 1, it corresponds to an additive effect between the two treatments. Under 1, the interaction is infraadditive, above 1, RP corresponds to a synergistic interaction between the two treatments.

Tissue distribution

Doxorubicin concentrations were measured in tissues of mice receiving i.p. injection of MYO at the dose of 2 mg/kg. Animals were killed after one or six injections of chemotherapy, in the 6 or 30 h after the last injection. Tissues (subcutaneous tumor, normal brain hemisphere, tumoral brain hemisphere) were excised, washed in saline and immediately frozen at -20°C until processed. At least five organs per treatment groups were analyzed. Similar experiments with nonliposomal doxorubicin-receiving mice were performed as control. On account of toxicity of the repeated free doxorubicin injections, we did not evaluate drug concentration after six injections.

Doxorubicin concentration was determined by a reversed phase high-performance liquid chromatography method after liquid-liquid extraction as described earlier [25]. In brief, tissues were homogenized in four parts of water. Homogenized tissue (0.5 ml) was then mixed with 500 ng daunorubicin as an internal standard, with 20 μl of AgNO_3 (33% in water), and with 8 ml of chloroform/isopropanol (1:1). After shaking for 20 min, the samples were centrifuged at $1500 \times g$ for 10 min, and the separated organic phase was evaporated under vacuum. Analyses were performed by reversed phase high-performance liquid chromatography on a C18 column (250×4.6 mm I.D., YMC, Interchim, France), under isocratic elution conditions with a mobile phase of acetonitrile/0.01 mol/l KH_2PO_4 pH 2.6 (30:70) at a flow rate of 1 ml/min. Doxorubicin and daunorubicin were detected by a fluorescence detector (RF 10A XL Shimadzu, France)

with excitation and emission wavelengths of 480 and 590 nm, respectively. The limit of detection of the assay was 2 ng/g of tissue.

Statistical analysis

Kaplan–Meier curve analysis was performed using the log-rank test; P value of less than 0.05 was considered as significant.

Results

Liposomal encapsulation improved doxorubicin deposition in both subcutaneous and intracranial tumors

Our objective was to evaluate whether liposomal doxorubicin could enhance the efficacy of a fractionated ionizing radiation protocol. We first investigated the ability of liposomal doxorubicin to reach tumor tissue and its potential accumulation during the treatment course. Then, we determined doxorubicin concentration in U87 subcutaneous and intracranial tumors, 6 or 30 h after one injection of MYO, corresponding to the theoretical times of the first and second irradiations (Fig. 1). Nonliposome-encapsulated doxorubicin (DOXO) given at the same dose was used as a control. Doxorubicin concentration was also investigated at the end of chemotherapy regimen.

Earlier studies in our lab and elsewhere have shown the toxicity of the repeated administration of free doxorubicin [26]; therefore, we did not determine doxorubicin level after six injections of nonliposomal doxorubicin (Table 1). Considering the subcutaneous tumor model 6 h after one injection, administration of DOXO led to a 50% greater concentration of doxorubicin than injection of MYO: doxorubicin concentrations were 139 and 72 ng/g of tissue for DOXO and MYO groups, respectively. We also observed that doxorubicin level increased between 6 and 30 h for the MYO group (72 vs. 164 ng/g of tissue, respectively), whereas it remained stable for DOXO-receiving mice (139 vs. 115 ng/g). Moreover, repeated injections of MYO led to an accumulation of drug in tumoral tissue: doxorubicin concentration 6 h after six injections of MYO was 2.8-fold greater (204 ng/g of tissue) as compared with one injection after 6 h (72 ng/g of tissue).

Using the intracranial model (Table 1), we showed that doxorubicin uptake was always higher in the tumor-bearing hemisphere than in the normal one, for both MYO and DOXO groups. Indeed, 30 h after one injection, doxorubicin concentrations were about two-fold greater in the tumor brain hemisphere: 94 versus 45 ng/g for MYO group and 75 versus 40 ng/g for the DOXO group. Moreover, when considering MYO-receiving mice, we showed that the doxorubicin amount remained stable in normal brain hemisphere between the first and the sixth injection (65 vs. 57 ng/g), whereas doxorubicin

Table 1 Doxorubicin concentrations in subcutaneous and intracranial U87 xenografts

	Doxorubicin concentration (ng/g of tissue)							
	One injection						Six injections	
	6 h			30 h			6 h	
	MYO	DOXO	Ratio MYO/DOXO	MYO	DOXO	Ratio MYO/DOXO	MYO	DOXO
Subcutaneous tumor	72 ± 14	139 ± 11	0.52	164 ± 29	115 ± 19	1.43	204 ± 15	ND
Normal brain hemisphere	65 ± 19	42 ± 13	1.55	45 ± 11	40 ± 13	1.13	57 ± 18	ND
Tumor brain hemisphere	79 ± 32	47 ± 8	1.68	94 ± 32	75 ± 16	1.25	131 ± 26	ND

Doxorubicin concentrations were measured after one or six injections of DOXO and MYO at the dose of 2 mg/kg (intraperitoneal). For each time, results are expressed as mean ± SD of at least five organs per treatment. DOXO, doxorubicin; MYO, Myocet; ND, nondetermined.

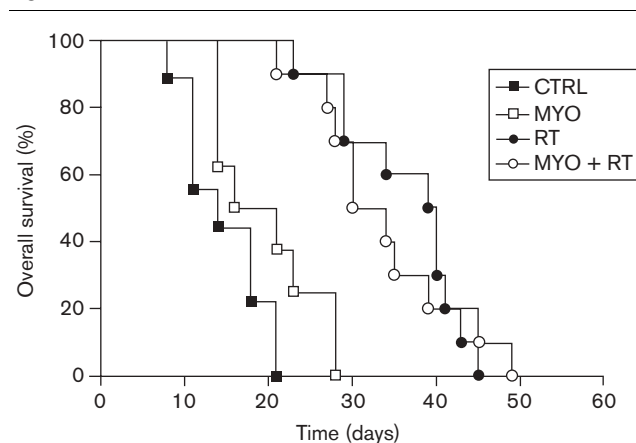
concentration increased in the tumor-bearing hemisphere (79 vs. 131 ng/g).

Finally, when comparing subcutaneous versus intracranial xenografts, we noticed that doxorubicin concentrations for both drugs were higher for subcutaneous tumors than for intracranial tumors. For example, 30 h after one injection of MYO, doxorubicin concentration was only 94 ng/g in intracranial tumors, compared with 164 ng/g in subcutaneous tumors. Moreover, we showed that doxorubicin accumulation after the sixth injection of MYO is less important in the case of intracranial versus subcutaneous location (131 vs. 204 ng/g).

Therapeutic efficacy studies in subcutaneous models

Given the exposure of tumor tissue to doxorubicin during the 2 weeks course of our therapeutic schedule, we first evaluated the potential radiosensitizing effect of MYO using two subcutaneous glioma models (U87 and TCG4). The response of the xenografts to therapies was assessed using Kaplan–Meier analysis (Fig. 2a and b, for U87 and TCG4 models, respectively). Preliminary studies have shown that repeated administration of nonliposomal doxorubicin alone or in association with RT led to a significant toxicity (major weight loss during treatment course, data not shown). Hence, antitumor effect of both nonliposomal doxorubicin alone or associated with RT was not examined in this study.

In the untreated CTRL groups, median survival was 10.0 and 8.0 days for subcutaneous U87 and TCG4 models, respectively. In both models, MYO presented a weak antitumor effect: median survival was 13.5 days (vs. CTRL, $P < 0.05$) for U87 and 9.0 days (vs. CTRL, $P < 0.05$) for TCG4 xenografts. This translated to an increase in life span of 35% in U87 model, and 10% in TCG4 model, as compared with the respective CTRL groups. Moreover, RT alone produced a significant antitumor effect: the median survival was significantly prolonged to 30.5 days ($P < 0.0001$) and 81.0 days ($P < 0.0001$) for U87 and TCG4 xenografts, respectively. Results obtained in MYO + RT groups clearly s shown

Fig. 2

Response of U87 intracranial xenografts to antitumoral treatments. Intracranial U87 tumor-bearing mice were randomly assigned into four groups: control (CTRL) (■; $n = 9$), Myocet (MYO) (□; $n = 8$), radiation therapy (RT) (●; $n = 10$), and MYO + RT (○; $n = 10$). Treatments effects on survival are represented by Kaplan–Meier plots.

that concomitant administration of MYO improved the antitumor effect of RT in subcutaneous tumors: median survival increased up to 36.5 days in U87 tumors (vs. RT, $P = 0.002$) and 93.0 days in TCG4 tumors (vs. RT, $P = 0.008$), corresponding to improvement in life span of about 20 and 15%, respectively, as compared with the RT group.

Using median survival, we calculated the RP for each model. RP reached 1.13 for U87 and 1.15 for TCG4 glioma xenografts, illustrating a synergistic effect between MYO and RT in both models.

Therapeutic efficacy studies on U87 intracranial model

The effect of concomitant association MYO + RT on intracranial xenografts was assessed using the U87 glioma model and the same therapeutic schedule as in the subcutaneous model (Fig. 1a).

The first endpoint of this study was the overall survival analyzed by the Kaplan–Meier method (Fig. 3). In the untreated CTRL group, the median survival was 14.0 days. Administered alone, MYO slightly improved mice survival, which increased up to 18.5 days (corresponding to an increase in life span of 32%), although the difference with the CTRL group did not reach the level of statistical significance ($P = 0.068$). Overall survival was significantly enhanced when mice received RT alone or in concomitant association with MYO, as compared with untreated CTRL group ($P < 0.0001$ in both cases). Median survival was 39.5 days for the RT group and 32.0 days for the MYO + RT group. No statistical difference was observed between these two groups ($P = 0.813$).

Mice also underwent weekly MRI examination until death allowing the determination of the intracerebral tumor volume. The effect of treatment on intracranial

tumor growth is presented in Fig. 3a and b and shows the volume curve of MYO + RT group with a typical example of a series of MRI obtained for a mouse receiving the association of MYO and RT. Our results showed that MYO alone had no effect on tumor volume as compared with the untreated CTRL group. In the RT group, treatment delayed tumor growth. This effect was even more marked in MYO + RT group, showing a reduced tumor growth as compared with RT group, contrasting with the absence of survival benefit obtained in MYO + RT group.

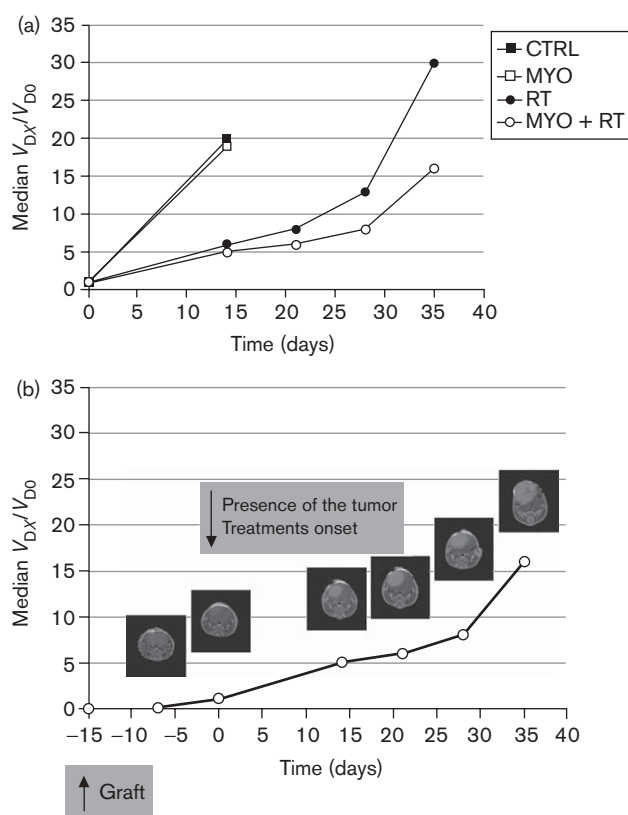
Discussion

Liposomes are suitable carriers to effectively deliver the drugs to brain tumors. One of the most advanced drug carrier formulation consists of doxorubicin loaded into liposomes. Such a formulation offers the potential for avoiding high-peak concentrations of the bioavailable drug, which are so often associated with pronounced toxicity [8]. Moreover, liposomal encapsulation has been shown to enhance tumor exposure to doxorubicin in several tumor models [8,11]. On the basis of these observations and of the well-demonstrated radiosensitizing properties of doxorubicin [20], we designed this study to determine whether a synergistic effect between liposomal doxorubicin and ionizing radiations could be observed in high-grade glioma xenografted models.

To be close to treatment conditions in humans, we chose to deliver RT as a 2 Gy/day fraction schedule, 5 days a week, as it is usually prescribed for high-grade glioma patients [27]. In our experiments, mice were injected with MYO at a dose of 2 mg/kg/dose, three times a week for two consecutive weeks. This resulted in a weekly dose of 6 mg/kg and a total cumulative dose of 12 mg/kg. Such a doxorubicin dose is in the range of the recommended dosing of 2.5–10 mg/kg/week used in nude mice bearing human xenografts [28]. We first investigated the biodistribution of MYO according to our therapeutic schedule. It is well established that conventional liposomes are trapped by organs of the reticuloendothelial system (i.e. spleen, liver, and bone marrow) [8]. Despite a major sequestration by liver and spleen of liposomes (data not shown), we showed that subcutaneous tumors were similarly exposed to doxorubicin after one injection for both liposomal and free doxorubicin formulations. Hence, our data underscore that the liposomal carrier ensured a better intratumoral deposition of the drug, as shown by others for both conventional [12] and pegylated liposomes [13,29,30].

In our series, we also showed that MYO was not able to slow tumor growth. Nevertheless, when administered in combination with RT, MYO was shown to significantly sensitize TCG4 and U87 xenografts to the antitumor effect of fractionated irradiation, by markedly increasing

Fig. 3



Treatments effects on U87 intracranial xenografts volumes. (a) Intracranial U87 tumor-bearing mice were randomly assigned into four groups: control (CTRL) (■; $n=9$), Myocet (MYO) (□; $n=8$), radiation therapy (RT) (●; $n=10$), and MYO + RT (○; $n=10$). Tumor volume (V_{DX}) was estimate by MRI once a week until death after the end of treatment (DX: D14, D21, D28, and D35). Results are expressed as median ratios between tumor volume at DX and tumor volume at the onset of treatment (i.e. V_{D0}). (b) MR imaging of the evolution of intracranial tumor in mice receiving MYO + RT regimen. The series of MR images are representative of all mice included in this group.

the life span of mice receiving the association, as compared with RT-receiving mice. Studies combining RT and liposomal doxorubicin are quite rare in the literature: only Harrington *et al.* [31] and Davies *et al.* [21] have described earlier the increase in RT effect by pegylated liposomal doxorubicin on human osteosarcoma and head and neck cancer xenografts, respectively. The synergistic interaction between MYO and RT obtained in this study may be linked to the accumulation of doxorubicin during RT course. Hence, doxorubicin concentration for the MYO group increased about 2.8-fold between the first and the sixth injection.

The promising results obtained in subcutaneous glioma models prompted us to investigate the antitumoral effect of the concomitant administration of MYO and RT on an intracranial model of brain tumor. Unfortunately, our results showed that no overall survival enhancement was obtained in MYO + RT group, as compared with RT-receiving mice, in spite of an accumulation of doxorubicin concentration in tumor brain hemisphere. Only a trend in a greater delay of tumor growth was observed for the association group. These results are in accordance with data observed in clinical studies showing that objective responses to treatments are not regularly translated into survival rate increase [32,33]. Moreover, an earlier study from Arnold *et al.* [14] has shown that repetitive administration of doxorubicin encapsulated in pegylated liposomes led to an accumulation of drug into an intracranial model of 9L gliosarcoma. Liposome accumulation in tumors proceeds passively and is mediated by enhanced permeability and retention phenomenon. As the blood–brain barrier is disrupted in high-grade gliomas with all the components of the tumor blood vessels showing significant abnormalities (leaky vasculature) compared with normal cerebral vessels, liposomes can extravasate and accumulate in tumor tissue [34].

The discrepancy in our results between subcutaneous and intracranial models could, in part, be explained by the difference in doxorubicin concentration reached in each tumor model. Indeed, doxorubicin in the tumor-bearing hemisphere did not accumulate to the same extent that was obtained in subcutaneous tumors. This effect may be linked to the small tumor volume of intracranial xenografts, as compared with subcutaneous tumors. Moreover, in addition to the blood–brain barrier obstacle, the fact that intracranial tumors grow in a closed compartment with high interstitial pressures [35,36], could play a significant role in the much lower doxorubicin deposition observed for intracranial tumors. To definitely conclude on the radiosensitizing properties of MYO on high-grade glioma and given the great tolerance of our combination schedule, we assume that a higher dosage of MYO would increase doxorubicin deposition in intracranial tumors and then lead to a

potentiation of radiation efficacy in the intracranial model. Moreover, special attention should be given to time interval between chemotherapy doses, as some researchers have shown that higher doses administered less often improved the therapeutic efficacy of pegylated liposomal doxorubicin in tumor-bearing mice, as compared with smaller doses given more often [37]. These points are under investigation in our laboratory.

In conclusion, this study has shown that liposomal encapsulation of doxorubicin improved drug deposition into both subcutaneous and intracranial U87 tumors. We also showed for the first time that concomitant administration of MYO + RT was synergistic on two subcutaneous models but not on the intracranial model. Finally, this study emphasizes the importance of performing preclinical studies on models as close as possible to human tumors and the localization to be more predictive of therapeutic effects observed in humans.

Acknowledgements

The authors are grateful to the French ‘Ligue Contre le Cancer, Comités Lorrains’ for financial support and authors thank Zeneus Pharma for the kindly gift of Myocet. This study was supported by the French ‘Ligue Contre le Cancer, Comités Lorrains’. This study was funded by French ‘Ligue Contre le Cancer, Comités Lorrains’.

References

- Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 2005; **109**:93–108.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; **352**:987–996.
- Wolff JE, Trilling T, Molenkamp G, Egeler RM, Jurgens H. Chemosensitivity of glioma cells in vitro: a meta analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; **125**:481–486.
- Abe T, Hasegawa S, Taniguchi K, Yokomizo A, Kuwano T, Ono M, *et al.* Possible involvement of multidrug-resistance-associated protein (MRP) gene expression in spontaneous drug resistance to vincristine, etoposide and adriamycin in human glioma cells. *Int J Cancer* 1994; **58**:860–864.
- Takamiya Y, Abe Y, Tanaka Y, Tsugu A, Kazuno M, Oshika Y, *et al.* Murine P-glycoprotein on stromal vessels mediates multidrug resistance in intracerebral human glioma xenografts. *Br J Cancer* 1997; **76**:445–450.
- Hortobagyi GN. Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs* 1997; **54**:1–7.
- Waterhouse DN, Tardi PG, Mayer LD, Bally MB. A comparison of liposomal formulations of doxorubicin with drug administered in free form: changing toxicity profiles. *Drug Saf* 2001; **24**:903–920.
- Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol Rev* 1999; **51**:691–743.
- Batist G, Ramakrishnan G, Rao CS, Chandrasekharan A, Guthrie J, Guthrie T, *et al.* Reduced cardiotoxicity and preserved antitumor efficacy of liposome-encapsulated doxorubicin and cyclophosphamide compared with conventional doxorubicin and cyclophosphamide in a randomized, multicenter trial of metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2001; **19**:1444–1454.
- Harris L, Batist G, Belt R, Rovira D, Navari R, Azarnia N, *et al.* Liposome-encapsulated doxorubicin compared with conventional doxorubicin in a randomized multicenter trial as first-line therapy of metastatic breast carcinoma. *Cancer* 2002; **94**:25–36.
- Mayer LD, Dougherty G, Harasym TO, Bally MB. The role of tumor-associated macrophages in the delivery of liposomal doxorubicin to solid murine fibrosarcoma tumors. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; **280**:1406–1414.

- 12 Parr MJ, Masin D, Cullis PR, Bally MB. Accumulation of liposomal lipid and encapsulated doxorubicin in murine Lewis lung carcinoma: the lack of beneficial effects by coating liposomes with poly(ethylene glycol). *J Pharmacol Exp Ther* 1997; **280**:1319–1327.
- 13 Unezaki S MK, Ishida O. Enhanced tumor targeting and improved antitumor activity of doxorubicin by long-circulating liposomes containing amphipatic polyethylene glycol. *Int J Pharm* 1995; **126**:41–48.
- 14 Arnold RD, Mager DE, Slack JE, Straubinger RM. Effect of repetitive administration of Doxorubicin-containing liposomes on plasma pharmacokinetics and drug biodistribution in a rat brain tumor model. *Clin Cancer Res* 2005; **11**:8856–8865.
- 15 Siegal T, Horowitz A, Gabizon A. Doxorubicin encapsulated in sterically stabilized liposomes for the treatment of a brain tumor model: biodistribution and therapeutic efficacy. *J Neurosurg* 1995; **83**:1029–1037.
- 16 Sharma US, Sharma A, Chau RI, Straubinger RM. Liposome-mediated therapy of intracranial brain tumors in a rat model. *Pharm Res* 1997; **14**:992–998.
- 17 Fabel K, Dietrich J, Hau P, Wismeth C, Winner B, Przywara S, *et al*. Long-term stabilization in patients with malignant glioma after treatment with liposomal doxorubicin. *Cancer* 2001; **92**:1936–1942.
- 18 Hau P, Fabel K, Baumgart U, Rummele P, Grauer O, Bock A, *et al*. Pegylated liposomal doxorubicin-efficacy in patients with recurrent high-grade glioma. *Cancer* 2004; **100**:1199–1207.
- 19 Koukourakis MI, Koukouraki S, Giatromanolaki A, Kakolyris S, Georgoulis V, Velidaki A, *et al*. High intratumoral accumulation of stealth liposomal doxorubicin in sarcomas – rationale for combination with radiotherapy. *Acta Oncol* 2000; **39**:207–211.
- 20 Bonner JA, Lawrence TS. Doxorubicin decreases the repair of radiation-induced DNA damage. *Int J Radiat Biol* 1990; **57**:55–64.
- 21 Davies Cde L, Lundstrom LM, Frengen J, Eikenes L, Bruland SO, Kaalhus O, *et al*. Radiation improves the distribution and uptake of liposomal doxorubicin (caelyx) in human osteosarcoma xenografts. *Cancer Res* 2004; **64**:547–553.
- 22 Harrington KJ, Lewanski CR, Stewart JS. Liposomes as vehicles for targeted therapy of cancer. Part 1: preclinical development. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2000; **12**:2–15.
- 23 Lorusso D, Di Stefano A, Carone V, Fagotti A, Pisconti S, Scambia G. Pegylated liposomal doxorubicin-related palmar-plantar erythrodysesthesia ('hand-foot' syndrome). *Ann Oncol* 2007; **18**:1159–1164.
- 24 Chastagner P, Kozin SV, Taghian A. Topotecan selectively enhances the radiosensitivity of human small-cell lung carcinoma and glioblastoma multiform xenografts in nude mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; **50**:777–782.
- 25 Meco D, Colombo T, Ubezio P, Zucchetti M, Zaffaroni M, Riccardi A, *et al*. Effective combination of ET-743 and doxorubicin in sarcoma: preclinical studies. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003; **52**:131–138.
- 26 Chastagner P, Labussiere M, Aarnink A, Pinel S, Bernier V, Plénat F, *et al*. Comparison of doxorubicin and a liposomal form as radiosensitizer in high grade glioma and rhabdomyosarcoma xenografts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; **66** (Suppl 1):S579.
- 27 Frappaz D, Chinot O, Bataillard A, Ben Hassel M, Capelle L, Chanalet S, *et al*. [standards, options and recommendations 2002 for the management of adult patients with intracranial gliomas (summary report)]. *Bull Cancer* 2003; **90**:873–886.
- 28 Pastorino F, Brignole C, Marimpietri D, Sapra P, Moase EH, Allen TM, *et al*. Doxorubicin-loaded Fab' fragments of anti-disialoganglioside immunoliposomes selectively inhibit the growth and dissemination of human neuroblastoma in nude mice. *Cancer Res* 2003; **63**:86–92.
- 29 Gabizon A, Shmeeda H, Barenholz Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies. *Clin Pharmacokinet* 2003; **42**:419–436.
- 30 Koukourakis MI, Koukouraki S, Fezoulidis I, Kelekis N, Kyrias G, Archimandritis S, *et al*. High intratumoural accumulation of stealth liposomal doxorubicin (Caelyx) in glioblastomas and in metastatic brain tumours. *Br J Cancer* 2000; **83**:1281–1286.
- 31 Harrington KJ, Rowlinson-Busza G, Syrigos KN, Vile RG, Uster PS, Peters AM, *et al*. Pegylated liposome-encapsulated doxorubicin and cisplatin enhance the effect of radiotherapy in a tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 2000; **6**:4939–4949.
- 32 Chastagner P, Bouffet E, Grill J, Kalifa C. What have we learnt from previous phase II trials to help in the management of childhood brain tumours? *Eur J Cancer* 2001; **37**:1981–1993.
- 33 Grant R, Liang BC, Slattey J, Greenberg HS, Junck L. Chemotherapy response criteria in malignant glioma. *Neurology* 1997; **48**:1336–1340.
- 34 Gupta B, Torchilin VP. Monoclonal antibody 2C5-modified doxorubicin-loaded liposomes with significantly enhanced therapeutic activity against intracranial human brain U-87 MG tumor xenografts in nude mice. *Cancer Immunol Immunother* 2007; **56**:1215–1223.
- 35 Boucher Y, Salehi H, Witwer B, Harsh GRT, Jain RK. Interstitial fluid pressure in intracranial tumours in patients and in rodents. *Br J Cancer* 1997; **75**:829–836.
- 36 Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci* 2007; **8**:610–622.
- 37 Charrois GJ, Allen TM. Multiple injections of pegylated liposomal Doxorubicin: pharmacokinetics and therapeutic activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; **306**:1058–1067.

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT

Mention : Pharmacologie

Titre : Impact du fractionnement du traitement sur les propriétés radiosensibilisantes du bortézomib sur deux modèles de gliome malin humain xéno greffés

ABSTRACT

Malignant gliomas are the most common neoplasm of the central nervous system and patients prognosis remains dismal, despite aggressive surgery, radio- and chemotherapy. Radiotherapy is a major treatment modality in this tumoral type but its usefulness is limited by normal brain tissue toxicity. The concomitant administration of a radiosensitizing agent is an innovative strategy to improve ionizing radiations efficacy. Bortezomib (Velcade[®]) belongs to a new class of anticancer agents, i.e. the proteasome inhibitors, and this molecule has been approved for the treatment of multiple myeloma. Our objectives are to study the radiosensitizing properties of bortezomib on two human malignant glioma models xenografted onto nude mice. Our work was designed to evaluate the impact of treatment fractionation on the antitumor activity of the concomitant association of bortezomib and radiotherapy. Our results show that bortezomib is a potent radiosensitizer on our two malignant glioma models but these properties are lost when treatments are fractionated according to a typical clinical schedule. In conditions of fractionated treatment, we demonstrate that bortezomib reduces the radio-induced apoptosis. This may be linked to the loss of the inhibitory properties of bortezomib secondary to consecutive infusions. We also evaluate the importance of the transcription factor NF- κ B in the radioresponse of the malignant glioma xenografts used. Finally, our work emphasizes on the importance of performing preclinical studies using doses and therapeutic schedule mimicking the clinical settings to provide more predictive results of treatment response in Humans.

KEYWORDS

Malignant glioma, bortezomib, ionizing radiations, radiosensitization, treatment fractionation.

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT

Mention : Pharmacologie

Titre : Impact du fractionnement du traitement sur les propriétés radiosensibilisantes du bortézomib sur deux modèles de gliome malin humain xénotransplantés

RESUME

Les gliomes malins, tumeurs du système nerveux central les plus fréquentes ont un pronostic particulièrement sombre. Parmi les traitements standards de ce type de tumeurs, la radiothérapie occupe une place prépondérante mais son utilisation est limitée en raison de la mauvaise tolérance du tissu cérébral normal. Une des stratégies visant à améliorer l'efficacité de la radiothérapie consiste en l'administration concomitante d'un agent radiosensibilisant. Les inhibiteurs de protéasome sont une nouvelle classe d'agents anticancéreux et le bortézomib (Velcade®), chef de file de cette nouvelle classe, possède une AMM dans le traitement du myélome multiple. Les objectifs de nos travaux sont d'évaluer le potentiel radiosensibilisant du bortézomib sur deux modèles de gliome malin humain xénotransplantés chez la souris *nude*. Nous avons apporté une attention particulière à l'impact du fractionnement du bortézomib et de la radiothérapie sur l'efficacité antitumorale de l'association. Nos résultats montrent que le bortézomib est un radiosensibilisant puissant sur les deux modèles de gliome malin utilisés mais que ce pouvoir est perdu lorsque les deux modalités thérapeutiques sont délivrées selon des doses et des schémas d'administration pertinents au regard de la clinique. En condition de traitement fractionné, nos études montrent également que le bortézomib induit une diminution de l'apoptose radio-induite, probablement en lien avec une perte de son activité inhibitrice du protéasome au fil des injections. Enfin, la place du facteur de transcription NF- κ B dans la réponse à la radiothérapie fractionnée ou non pour le type tumoral que nous avons étudié est discutée. En conclusion, nos travaux insistent sur la nécessité de réaliser des études précliniques dans des conditions les plus proches possibles de la situation clinique, afin d'apporter des éléments plus prédictifs de la réponse chez l'Homme.

MOTS CLES

Gliomes malins, bortézomib, radiations ionisantes, radiosensibilisation, fractionnement du traitement.