



HAL
open science

**Implication des mécanismes de réparation de l'ADN
dans la résistance des glioblastomes à la chimiothérapie :
De l'identification de gènes candidats in silico à leur
validation préclinique**

Sandra Boccard

► **To cite this version:**

Sandra Boccard. Implication des mécanismes de réparation de l'ADN dans la résistance des glioblastomes à la chimiothérapie : De l'identification de gènes candidats in silico à leur validation préclinique. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT : . tel-00563481

HAL Id: tel-00563481

<https://theses.hal.science/tel-00563481>

Submitted on 5 Feb 2011

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.

**Université Joseph Fourier Grenoble I - U.F.R De Biologie
Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Joseph Fourier

Spécialité : Biologie Cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Sandra BOCCARD

le 14 Mars 2008

**Implication des mécanismes de réparation de l'ADN dans la résistance
des glioblastomes à la chimiothérapie :
De l'identification de gènes candidats *in silico* à leur validation préclinique**

Directeur de thèse : François BERGER

Co-directeur de thèse : Laurent PELLETIER

Jury

Pr. BERGER François

Dr. PELLETIER Laurent

Dr. POULAIN Laurent

Pr. CHINOT Olivier

Pr. ESTEVE François

Dr. KARAYAN-TAPON Lucie

Thèse préparée au sein de l'unité INSERM 836 Equipe 7

Nanomédecine et Cerveau

Remerciements

L'essentiel de ces travaux a été mené au sein de l'ancienne unité INSERM U318, dirigée alors par le Professeur Alim-Louis Benabid que je tiens à remercier chaleureusement pour l'accueil qu'il m'a fait au sein de son unité. J'ai par ailleurs apprécié ses qualités d'orateurs lors de mon cursus universitaire ainsi que les échanges que nous avons eus dans le cadre de ma thèse. Je déplore néanmoins de n'avoir pu essayer sa Z3.

Ce doctorat a été dirigé conjointement par le Professeur François Berger, directeur actuel de notre unité, et par le Docteur Laurent Pelletier. Je remercie le Pr. François Berger pour la confiance qu'il m'a accordée dans la réalisation de ce travail, pour ses conseils avisés, le cadre scientifique et collaboratif dont il fait bénéficié le laboratoire ainsi que pour sa bienveillance. Je remercie également Laurent Pelletier pour la qualité de son encadrement, ses enseignements scientifiques tant théoriques que pratiques, sa présence sur le terrain, le travail accompli et sa faculté à faire de chaque instant de mon doctorat un moment aussi plaisant qu'enrichissant.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien financier de la Ligue Nationale Contre le Cancer, qui participe pour une part importante au financement du laboratoire ainsi qu'aux différents projets de ce doctorat. Je tiens à remercier particulièrement Madame le Professeur Jacqueline Godet, Présidente de la LNCC et Madame Jacqueline Métral pour leur implication dans ces travaux.

Un merci particulier au Comité de l'Isère de la Ligue Contre le Cancer, qui m'a attribué la bourse nécessaire au financement de mon doctorat.

J'exprime une grande reconnaissance à Mr Olivier Chinot et à Mr Laurent Poulain qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Je suis honorée que ce travail ait fait l'objet de leur appréciation.

Je remercie chaleureusement tous les membres du Laboratoire d'Etude de Radiopharmaceutiques (LER) dirigé par le Professeur Daniel Fagret, pour l'important travail collaboratif réalisé sur l'imagerie des siRNA, et notamment Mme Catherine Ghezzi, Mme Anne-Sophie Gauchez, Mr Dominique Garin, Mr Jean-Paul Mathieu et Mme Mitra Ahmadi. Merci aux autres membres de l'équipe pour les moments de convivialité hebdomadaires.

Je remercie la société Transat, constituée de Mme Sophie Chapuis, Mme Pascale Nony, David et Céline, pour l'enrichissante collaboration qui nous lie.

Je remercie l'ensemble des membres du Consortium d'étude des siRNA, pour leurs réflexions fructueuses sur la partie préclinique de ce projet, et notamment, Mme Odile Filhol-Cochet, Mr Yves Vandembrouck, Mr Jacques Pouyssegur, et Mr Marc Billaud.

Je remercie également Mme Elisabeth Brambilla ainsi que Melle Aurélie Micoud pour leur aide dans la réalisation de l'immuno-histochimie de ercc1.

Un grand merci à tous les stagiaires qui ont apporté beaucoup d'énergie positive dans ces travaux et notamment :

Mr Brivael Trelhu et Melle Loubna Larag pour leur travail sur les drogues de chimiothérapie
Mr Manuel François pour ses centaines de PCR quantitatives
Mr Ali Reffas pour son travail sur mgmt

Je remercie également tous ceux aux côtés desquels j'ai travaillé pendant ces 6 années et qui ont, par leur aide, leurs conseils, leur gentillesse ou leur amitié, contribué à cette thèse et plus particulièrement :

A mon amie Sandie Marand, sur qui j'ai toujours pu compter et qui m'a soutenue dans les moments difficiles

A Nadine Platet et Philippe Tropel, qui m'ont également beaucoup soutenue et aidée tout au long de ces travaux et dont je regrette le départ de notre laboratoire.

A nos 2 techniciennes, Marie-Pierre Charles-Gras (Mamie) et Danièle Adamsky, qui m'ont apporté leur aide sans compter et toujours avec la plus grande gentillesse.

A Jean-Paul Issartel (Mario), pour le sérieux et la rigueur professionnels qu'il a apporté à ces travaux et, plus généralement, au laboratoire, qui en manquait un peu, mais aussi pour ses bons mots et ses traits d'humour aussi déconcertants que plaisants.

A l'ensemble des Neurochirurgiens de l'hôpital qui mettent chaque jour à notre disposition des échantillons biologiques sur lesquels travailler : Pr Alim-Louis Benabid, Dr Emmanuel Gay, Dr Stephan Chabardès, Dr Napoleon Torres, Dr D. Hoffmann, Dr E. Seigneuret.

A Rolande, Michel et Vincente pour tout le travail qu'ils ont fourni, que ce soit au niveau du fonctionnement global du laboratoire ou au niveau de l'animalerie, et pour leur patience souvent mise à rude épreuve.

A nos secrétaires, comptables et gestionnaires, Annick Abadie, Chantal Baumes, Blandine Laurino, Céline Ros-Monteil (tu nous manques), Franck Laurino, Christophe Barbet et Audrey Landon, pour leur aide administrative.

A nos zootechniciens, Sandra Geraci, Cindy Henrion et Cyril Zenga pour leur important travail sur l'expérimentation animale qui, sans eux, aurait été difficile. Merci aussi pour tous les bons moments partagés.

Papa, Maman, ma plus grande reconnaissance vous est destinée. Vous avez toujours veillé sur moi et vous vous êtes souvent sacrifiés pour que je puisse faire les longues études dont j'avais envie. Je n'aurais pas pu en arriver là sans vous. Merci pour tout.

Papi, Mamie, merci beaucoup à vous aussi pour tout ce que vous avez fait pour moi, et pour votre soutien sans faille.

'tit Gwen, merci de m'avoir aidée et supportée pendant la plus grande partie de cette thèse.

Un immense merci à chacun de mes amis, pour leur soutien inconditionnel

Laurent, de ces années de labeur à tes côtés n'est pas seulement né le présent travail mais aussi de profonds sentiments. J'ai tout d'abord admiré en toi le scientifique pour son travail, sa pédagogie et ses talents d'orateur avant d'apprécier l'homme. Tout ce que tu m'as apporté, sur un plan autant professionnel que personnel, m'a fait grandir et, sans toi, ma vie serait toute autre.

RESUME EN FRANÇAIS

Les tumeurs primitives du système nerveux central les plus fréquentes sont les gliomes et se classent en deux grandes catégories : les astrocytomes et les oligodendrogliomes. La survie des patients porteurs d'oligodendrogliomes est de 70 % à 5 ans alors qu'elle ne dépasse pas une année en moyenne pour les glioblastomes. La divergence de pronostic observée entre ces deux types de gliomes résulte d'une différence de sensibilité aux traitements conventionnels. La chimiothérapie classique appliquée à ces tumeurs permet en effet d'obtenir une réponse pour 90 % des oligodendrogliomes contrastant avec moins de 10 % pour les glioblastomes. La chimio-sensibilité particulière des oligodendrogliomes peut être la conséquence des altérations géniques survenant lors du processus oncogène. Elle résulterait de l'absence d'expression de gènes de résistance des régions chromosomiques 1p et 19q, gènes ainsi distinctement exprimés entre les deux entités tumorales. Les gènes de réparation de l'ADN peuvent rendre compte de la résistance aux traitements, puisque responsables de la correction des adduits créés par la chimiothérapie. Nous avons recherché grâce à une évaluation fonctionnelle *in vitro*, quels gènes de réparation de la région 1p/19q sont impliqués dans la correction des adduits du CDDP. Quatre gènes ont ainsi été identifiés : *ercc1*, *ercc2*, *mutyh* et *pnkp*. Ces résultats ont été vérifiés avec du témozolomide, la drogue de référence dans le traitement des gliomes. L'expression des ces gènes a été mesurée dans des extraits de tumeurs de patients, résistantes (glioblastomes) et sensibles (oligodendrogliomes) à la chimiothérapie, et les 3 premiers sont effectivement surexprimés dans les glioblastomes. Ces gènes définissent ainsi les cibles d'un traitement chimio-sensibilisant.

Nous avons entrepris l'étude préclinique de ce traitement basé sur l'utilisation concomitante de siRNA dirigés contre les gènes d'intérêt et de chimiothérapie. Des modèles de gliomes humains sous-cutanés et intra-cérébraux résistants à la chimiothérapie ont été utilisés chez les souris. Le traitement chimio-sensibilisant ciblant *ercc1* a significativement augmenté l'effet du témozolomide sur les tumeurs, permettant ainsi de diminuer leur volume.

Il pourrait faire prochainement l'objet d'essais cliniques.

Nos travaux, menés de l'*in silico* au stade préclinique, d'une part démontrent la validité de notre hypothèse, c'est-à-dire l'implication des gènes de réparation du 1p/19q dans la chimio-résistance, et conduisent surtout à une opportunité thérapeutique nouvelle de chimio-sensibilisation.

Mots clés :

Gliomes, chimio-résistance, réparation de l'ADN, témozolomide, siRNA, traitement chimio-sensibilisant

RÉSUMÉ EN ANGLAIS

**Involvement of DNA-repair mechanisms in resistance of malignant glioma to chemotherapy :
In silico identification of candidate genes to preclinical validation**

Gliomas are common malignant tumors of the central nervous system whom oligodendrogliomas and glioblastomas are the major subtypes. Among them, oligodendrogliomas are distinguished by their remarkable sensitivity to chemotherapy, responding dramatically to treatment, contrasting with resistance of glioblastomas. Anaplastic oligodendrogliomas have loss of chromosomal arms 1p and 19q. This genetic alteration is statistically significantly associated with both chemosensitivity and longer recurrence-free survival after chemotherapy. We hypothesized that there are some resistance genes on this area, responsible for chemo-resistance of glioblastomas. Among them we focused on DNA-repair genes because they correct chemotherapy-induced adducts on DNA. We screened these genes with an *in vitro* chemosensitivity test that we developed, and identified 4 of them as involved in resistance of glioma cells to cisplatin : *erccl1*, *erccl2*, *mutyh* and *pnkp*. These results were confirmed with the gold standard chemotherapy drug : temozolomide. Expression of these genes were measured in resistant and sensitive human tumors, and the first 3 genes are overexpressed in glioblastomas. Thus, these genes can be considered as innovant targets of a chemo-sensitizing treatment.

We entered a pre-clinical trial, financed by LNCC, to test this treatment on mice. We developed sub-cutaneous and intra-cerebral human xenografts of glioma on mice and treated them with siRNA directed to target genes, and with temozolomide. This treatment increased the tumor chemo-sensitivity, reducing tumoral volume.

Our preclinical results confirmed both our *in vitro* data and the potentiality to chemosensitize glioblastoma using siRNA.

Key words :

Gliomas, chemo-resistance, DNA-repair, temozolomide, siRNA, chemo-sensitizing treatment

Unité INSERM 836, équipe 7, Directeur François Berger
Institut des Neurosciences de Grenoble
Bâtiment Ed. J.Safra
Rue Fortune Ferrini
38700 La Tronche

Table des matières

INTRODUCTION	14
I. Les Gliomes	15
Définition :	15
Origine : cellules différenciées / cellules souches	15
Les cellules gliales	16
Les astrocytes	16
Les oligodendrocytes	17
Les épendymocytes	17
Classification des gliomes selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)	17
Classification des gliomes selon l'hôpital Sainte Anne (Catherine Daumas-Duport)	18
Epidémiologie et incidences	19
Etiologie et Cytogénétique	20
Causes non génétiques	22
Mortalité	22
Prise en charge médicale	23
Signes cliniques	23
Traitements	24
II. Problématique	32
Comportement des gliomes face aux traitements	32
Astrocytomes	32
Oligodendrogliomes sensibles	33
Sensibilité à la chimiothérapie	33
Résistance à la chimiothérapie	33
Efflux MDR/Pgp	34
EGFR et les récepteurs à tyrosine kinases	34
Mgmt	36
Les autres gènes intervenant dans la réparation de l'ADN	37
Hypothèse	55
III. Outils	57
Interférence ARN (siRNA et miRNA) : de l'étude fondamentale à la clinique	57
Mécanismes d'action	57
Utilisation de l'interférence ARN	60
MATERIELS ET METHODES	68
I. In vitro	69
Lignées et culture cellulaires	69
Inhibition de l'expression génique par les siRNA	69
Survie cellulaire et chimio-résistance	70
PCR	71
Quantitative Real Time – Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)	71
Principe	71
Etablissement des gammes étalon	71
Mesure de l'expression génique par qRT-PCR	73
II. Expérimentation animale	74
Modèles tumoraux	74
Injection des siRNA	75
Traitement de chimiothérapie	75
Sacrifice des souris	75
Mesure des volumes tumoraux	75

Imagerie-----	75
Marquage radioactif des siRNA modifiés (CK2βm et GFPm)-----	75
Injection des siRNA -----	76
Imagerie du petit animal in vivo-----	76
Analyses post mortem pour la biodistribution de l'imagerie -----	76
Expression des résultats et analyses statistiques -----	77
RESULTATS -----	78
I. Bio-informatique : -----	79
Gènes du 1p/19q -----	79
II. Etablissement du test de chimio-sensibilité-----	80
Transfection : -----	80
SiRNA dans les conditions couramment utilisées-----	81
Optimisation de l'utilisation des siRNA -----	81
Chimiothérapie-----	83
La fotémustine-----	84
Le témozolomide (TMZ) -----	84
Le cisplatine (CDDP) -----	84
Test fonctionnel-----	85
Séquence des traitements -----	86
Validation -----	87
III. Etude fonctionnelle des gènes candidats -----	89
Criblage préliminaire des gènes de réparation-----	89
Projet iCancéroDrops -----	92
Autres gènes -----	94
Projet kinases-----	94
Validation des résultats préliminaires -----	97
Extension de l'étude aux autres lignées -----	97
Transposition du test de chimio-sensibilisation au témozolomide-----	98
Combinaisons des siRNA validés-----	99
Combinaisons par 2-----	99
Combinaisons par 3 et 4 -----	101
Validation de l'effet des siRNA au niveau moléculaire-----	104
Mise au point des qRT-PCR -----	104
Inhibition d'expression induite par les siRNA -----	105
Etude de l'expression des gènes d'intérêt-----	106
Dépôt de brevet -----	107
IV. Analyse préclinique de l'intérêt d'une stratégie de knock down des gènes de réparation-----	108
Mise au point de modèles tumoraux chez la souris -----	108
Tumeurs en position sous-cutanée -----	108
Tumeurs en position intra-cérébrale -----	109
Mise au point de l'administration des siRNA-----	109
Mise en place du protocole de chimiothérapie-----	112
Effet du traitement chimio-sensibilisant sur la croissance de tumeurs en position sous-cutanée -----	113
Effet du traitement chimio-sensibilisant sur la croissance de tumeurs en position intra-crânienne-----	115
V. Analyse de la bio-distribution de la molécule thérapeutique -----	118
Biodistribution des siRNA in vivo -----	120
Stabilité des siRNA radiomarqués -----	123
Biodistribution des siRNA halogénés au cours du temps. -----	124
Conclusion de l'imagerie -----	125
DISCUSSION-----	126

PERSPECTIVES	144
BIBLIOGRAPHIE	147
ABREVIATIONS	163
ANNEXES	167
I. Annexe I : Cytogénétique de la zone 1p36- 1p32	168
II. ANNEXE II Cytogénétique de la zone 19q13.2-q13.4	169
III. ANNEXE III : Gènes impliqués dans la réparation de l'ADN	170
IV. ANNEXE IV : Liste des 50 gènes candidats	173
V. ANNEXE V : Article iCancéroDrops	174
VI. ANNEXE VI : Brevet	181
VII. ANNEXE VII : Poster présenté oralement à l'EANO le 15 septembre 2006	182
VIII. ANNEXE VIII : Article soumis au journal <i>Plos Genetics</i>	183
IX. ANNEXE IX : Poster résultats CK2β	199

Table des figures et illustrations

Tableau 1 Essais cliniques utilisant l'interférence ARN.....	65
Tableau 2 Séquence des siRNA utilisés.....	70
Tableau 3 Données des différentes PCR de ces travaux.....	72
Tableau 4 Paramètres concernant les qRT-PCR.....	73
Tableau 5 Tableau des gènes de réparation de la zone commune de délétion du 1p/19q.....	80
Tableau 6 Indice de chimio-sensibilité (CI) et sensibilisation à la drogue (DS) induite par les siRNA.....	98
Tableau 7. Indice de sensibilisation à la drogue (DS) induite par les siRNA d'intérêt.....	98
Tableau 8 Données des qRT-PCR.....	104
Tableau 9 Efficacité des siRNA.....	105
Tableau 10 Expression des gènes d'intérêt dans les lignées.....	106
Figure 1 Schéma d'un astrocyte avec ses prolongements connectés à un neurone et à un vaisseau sanguin.....	16
Figure 2 Schéma d'un oligodendrocyte avec un de ses prolongements relié à l'axone d'un neurone.....	17
Figure 3 Modifications génétiques conduisant au développement des astrocytomes au niveau de la population.....	21
Figure 4 Mutations rencontrées lors de la gliomagenèse.....	22
Figure 5 Survie des patients porteurs de gliomes.....	23
Figure 6 Formule chimique du témozolomide.....	27
Figure 7 Mécanisme de la méthylation de l'ADN (<i>Nu</i>) par le Témzolomide.....	27
Figure 8 Formule chimique de la procarbazine.....	28
Figure 9 Formule chimique de la lomustine.....	29
Figure 10 Formule chimique de la carmustine.....	29
Figure 11 Formule chimique de la vincristine.....	29
Figure 12 Formule chimique de la fotémustine.....	30
Figure 13 Formule chimique du cisplatine.....	30
Figure 14 Formule chimique du carboplatine.....	31
Figure 15 Traitement combiné des glioblastomes selon EORTC-NCIC.....	32
Figure 16 Cascades de signalisation en aval des récepteurs à tyrosine kinases.....	35
Figure 17 Rôles de p53 dans la cellule soumise à différents stress.....	38
Figure 18 Lésions de l'ADN et leurs sites préférentiels d'occurrence.....	40
Figure 19 Dommages de l'ADN, systèmes de réparation mis en jeu et conséquences.....	41
Figure 20 Mécanisme de réversion directe de la méthylation par MGMT.....	42
Figure 21 Bases endommagées et leurs conséquences.....	43
Figure 22 Mécanismes de réparation de l'ADN par BER.....	44
Figure 23 Mécanisme de réparation de l'ADN par NER.....	46
Figure 24 Les 2 voies de NER.....	47
Figure 25 Enfant atteint Xeroderma Pigmentosum.....	48
Figure 26 Enfant atteint de trichothiodystrophie.....	48
Figure 27 Initiation de la transcription.....	49
Figure 28 Mécanismes de réparation de l'ADN par MMR.....	50
Figure 29 Mécanismes de réparation des cassures double-brin.....	51
Figure 30 Mécanisme de réparation des cassures double-brin de l'ADN par recombinaison homologue.....	52
Figure 31 Mécanismes de réparation des cassures double-brin de l'ADN par recombinaison non homologue.....	54
Figure 32 Mécanismes de production et d'action des siRNA et shRNA.....	58

Figure 33 Utilisation de l'ARN interférence dans les méthodes de criblage	61
Figure 34 Principe d'action du SYBR Green	71
Figure 35 Mesure de la quantité des ARNm des gènes cyclophiline A et <i>ercc1</i> dans la lignée U373	81
Figure 36 Mesure de la quantité des ARNm des gènes <i>cyclophiline A</i> et <i>ercc1</i> dans la lignée U373	81
Figure 37 Efficacité de 3 transfectants	82
Figure 38 Inhibition génique par des siRNA <i>Ercc1</i>	83
Figure 39 Mesure de la quantité des gènes <i>cyclophiline A</i> et <i>ercc1</i>	83
Figure 40 Effet de la fotémustine	84
Figure 41 Effet du CDDP	85
Figure 42 Plaque 96 puits avec des puits contenant diverses concentrations de MTT	86
Figure 43 Schéma des fenêtres d'actions des siRNA et du CDDP	87
Figure 44 Déroulement d'un test de chimio-sensibilité	87
Figure 45 Chimio-sensibilisation de cellules U373 transfectées avec le siRNA <i>ercc1</i>	88
Figure 46 Chimio-sensibilisation de cellules GHD transfectées avec le siRNA <i>ercc1</i>	88
Figure 47 Criblage des siRNA dirigés contre les gènes de réparation de l'ADN	91
Figure 48 Robot en train de spotter des cellules en gouttes sur une puce de verre	92
Figure 49 Analyse d'image par le logiciel IMSTAR	93
Figure 50 Chimio-sensibilisation de cellules U373 transfectées avec les siRNA CYP2A6 et CYP4B1	94
Figure 51 Protocole des tests de prolifération/chimio-sensibilité	95
Figure 52 Effet de la transfection de siRNA ATM sur la chimio-sensibilité	97
Figure 53 Indice de sensibilisation à la drogue (DS) induite par les siRNA d'intérêt	98
Figure 54 Effet chimio-sensibilisant des combinaisons de siRNA par 2	100
Figure 55 Effet des combinaisons de siRNA par 3 et 4	104
Figure 56 Gammes d'ADNc analysées en qRT-PCR.	105
Figure 57 Expression des gènes d'intérêt dans les tumeurs humaines	107
Figure 58 Effet du siRNA CK2 β sur la croissance de tumeurs GL26	110
Figure 59 Effet de différents traitements siRNA CK2 β sur la croissance tumorale	111
Figure 60 Effet de différents traitements siRNA CK2 β sur la croissance tumorale	111
Figure 61 Survie de souris porteuses de tumeurs intra-cérébrales GL26	112
Figure 62 Effet de différents traitements de chimiothérapie sur la croissance de tumeurs sous-cutanées.	113
Figure 63 Effet des différents traitements de siRNA sur la croissance de tumeurs sous-cutanées U373 IV3	114
Figure 64 Effet des différents traitements de siRNA sur la croissance de tumeurs sous-cutanées U373 IV3	115
Figure 65 Test de survie de souris implantées en position intra-cérébrale avec des cellules U373 IV3	116
Figure 66 Masse des tumeurs U373 IV3 implantées en position intra-cérébrale chez la souris nude	116
Figure 67 Nature de la modification chimique	119
Figure 68 Impact du radiomarquage sur la fonction des siRNA	120
Figure 69 Biodistribution des siRNA halogénés	121
Figure 70 Biodistribution des siRNA halogénés	122
Figure 71 Exemples d'images planaires <i>in vivo</i> corps entier de souris	123
Figure 72 Intégrité du produit dans le temps après passage <i>in vivo</i>	123
Figure 73 Evolution de la quantité de siRNA dans la tumeur et le muscle contro-latéral.	124
Figure 74 Implication de la kinase ATM dans les mécanismes cellulaires	136

INTRODUCTION

I. LES GLIOMES

Définition :

Les gliomes regroupent l'ensemble des néoplasies du système nerveux central (SNC) développées aux dépens des cellules gliales. Ils sont le principal sous-type des tumeurs primaires du cerveau et constituent un grave problème de santé publique puisqu'ils sont la troisième cause de mortalité par cancer de l'adulte jeune.

Origine : cellules différenciées / cellules souches

L'origine des gliomes est très discutée et deux théories s'affrontent actuellement. Les gliomes pourraient être issus de cellules gliales différenciées ou de cellules souches neurales. Il existe des arguments étayant chacune de ces 2 hypothèses ^(1, 2).

Pour la première, les gliomes présentent des caractéristiques morphogénétiques propres aux cellules gliales, à l'origine de leur nom. Ces cellules sont, de plus, capables de se différencier en réponse à certains *stimuli*. Le processus de différenciation peut en effet être déclenché *in vitro* par l'addition de milieux conditionnés par des explants de cerveaux embryonnaires ^(3, 4). Les astrocytes peuvent de plus se différencier en glie radiale suite à une lésion d'un nombre limité de neurones ^(5, 6). Une fois cet état primaire atteint, il est possible aux cellules d'acquiescer les mutations nécessaires aux potentiels migratoire et prolifératif de la cellule tumorale, et de former ainsi un gliome.

Au contraire, un argument majeur serait en faveur de l'hypothèse d'un type cellulaire unique à l'origine des gliomes : toutes les cellules composant les tumeurs mixtes oligo-astrocytaires présentent les mêmes profils cytogénétiques, comme des pertes d'hétérozygotie, que ce soit dans les zones astrocytaires ou dans les zones oligodendrocytaires ⁽⁷⁾. Cette cellule unique serait une cellule souche neurale. En effet, contrairement au dogme qui a longtemps défini le cerveau comme un organe incapable de régénération, il a été démontré que dans certaines zones cérébrales, à savoir la zone sous-ventriculaire et le gyrus denté de l'hippocampe, persistaient des cellules capables de se différencier en neurones et cellules gliales en cas de lésions ⁽⁸⁻¹¹⁾. Même si ces cellules ne sont pas situées dans des lieux communs de gliomagenèse, il est possible que des mutations liées à la tumorigenèse activent le potentiel migratoire des cellules souches, comme c'est le cas lors de l'embryogenèse ou en réponse à l'EGF (Epidermal Growth Factor) dans le cerveau de souris adulte ⁽¹²⁻¹⁴⁾.

Toutefois, aucune de ces 2 hypothèses ne peut actuellement expliquer l'ensemble des données morphologiques, cytogénétiques et cliniques.

Dans la suite de ces travaux, la thèse de l'origine gliale des gliomes sera favorisée, car, quelle que soit leur origine, le diagnostic pathologique est actuellement basé sur leur ressemblance avec les cellules gliales matures normales.

Les cellules gliales

Les cellules gliales constituent 90% de la masse cérébrale ⁽¹⁵⁾ et sont indispensables au fonctionnement des neurones, trop différenciés et donc spécialisés pour subsister seuls.

Parmi les cellules gliales se distinguent 3 types cellulaires : les astrocytes, les oligodendrocytes ainsi que les épendymocytes.

Les astrocytes

Les astrocytes sont les plus grosses cellules du système nerveux et possèdent de nombreux prolongements entrant en contact avec les vaisseaux sanguins (astrocytes de type I) et les neurones (astrocytes de type II). Ils sont le siège de la recapture des neuromédiateurs, modifiant ainsi l'intensité de la transmission synaptique. Ils sont également les garants de l'homéostasie du milieu neuronal, délimitant hermétiquement les fentes synaptiques, prévenant ainsi la propagation des neuromédiateurs. Ils assurent de plus le soutien métabolique des neurones, leur apportant les nutriments (glucose et oxygène) indispensables et évacuant leurs déchets métaboliques.

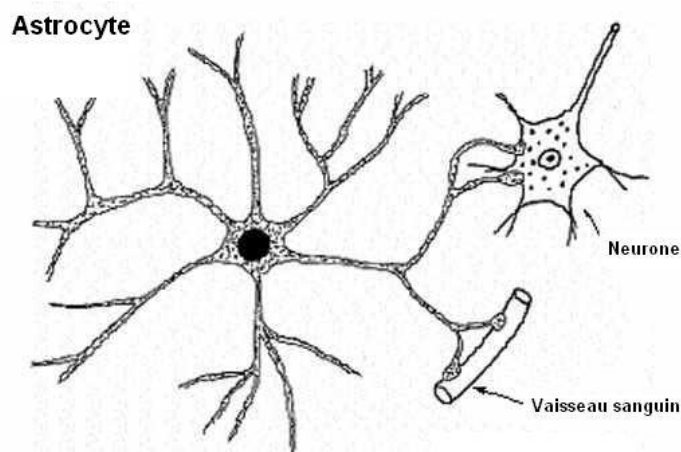


Figure 1 Schéma d'un astrocyte avec ses prolongements connectés à un neurone et à un vaisseau sanguin

Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont de taille plus réduite et présentent moins de prolongements. Ces cellules jouent un rôle primordial dans la conduction du signal électrique le long de l'axone neuronal puisqu'elles forment la gaine de myéline à leur surface et les nœuds de Ranvier, responsables de l'accélération du message nerveux. Elles sont l'équivalent des cellules de Schwann du système nerveux périphérique.

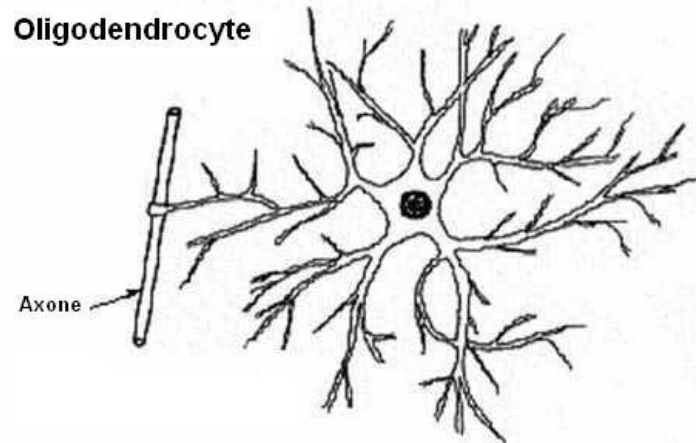


Figure 2 Schéma d'un oligodendrocyte avec un de ses prolongements relié à l'axone d'un neurone

Les épendymocytes

Les épendymocytes sont des cellules ciliées cuboïdes qui délimitent les cavités du système ventriculaire cérébral et spinal en formant des *epithelia* simples⁽¹⁶⁾. Ils sont liés entre eux, par des jonctions qui laissent passer le liquide céphalo-rachidien (LCR) entre les ventricules et le parenchyme cérébral, qu'une simple lame basale sépare de cette couche épendymocytaire. Les battements de leurs cils participeraient à la circulation du LCR.

Les cellules gliales, contrairement aux neurones qui sont post-mitotiques, ont la capacité de proliférer. Elles sont de ce fait plus fréquemment le siège de dysfonctionnements les conduisant sur la voie de la cancérisation.

Classification des gliomes selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)

La classification des tumeurs du système nerveux par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), tient compte de 4 paramètres principaux : l'atypie nucléaire, l'activité mitotique, la

prolifération des micro-vaisseaux, et le caractère nécrotique. Les tumeurs se classent en fonction de leur malignité croissante, du grade I au grade IV.

Le grade I regroupe des lésions bénignes, peu prolifératives, qu'une résection seule peut soigner. Le grade II inclut des lésions qui peuvent progresser vers des grades plus élevés, avec une activité mitotique faible et une tendance à l'infiltration. Les tumeurs du grade III présentent quant à elles une grande activité mitotique, des anaplasies et un caractère infiltrant important. Le dernier grade regroupe les tumeurs présentant des zones nécrotiques ainsi qu'une forte activité mitotique, associée à une évolution rapide de la maladie et à une angiogenèse importante ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾

Les astrocytomes peuvent apparaître n'importe où dans le cerveau, mais sont retrouvés le plus fréquemment au niveau du lobe frontal.

Suivant la classification de l'OMS, on distingue parmi les tumeurs astrocytaires : les astrocytomes pilocytiques (grade I), les astrocytomes diffus (grade II), les astrocytomes anaplasiques (grade III) et les glioblastomes (grade IV). Ces deux derniers grades peuvent également être des tumeurs *de novo*, sans indication de l'existence d'un précurseur plus bénin.

Les oligodendrogliomes se développent quant à eux essentiellement dans les lobes temporaux et frontaux. Les tumeurs oligodendrogliales ne comportent quant à elles que 2 groupes : les oligodendrogliomes (grade II) et les oligodendrogliomes anaplasiques (grade III).

Il existe également des gliomes mixtes : les oligoastrocytomes (grade II) et les oligoastrocytomes anaplasiques (grade III).

Classification des gliomes selon l'hôpital Sainte Anne (Catherine Daumas-Duport)

La classification actuelle des gliomes selon l'hôpital Sainte-Anne repose sur l'étude de biopsies stéréotaxiques corrélées aux données du scanner ou de l'IRM. Ces travaux définissent la structure des gliomes (infiltrants purs, solides purs ou mixtes), précisent leur mode de croissance et redéfinissent les critères diagnostiques des oligodendrogliomes.

Deux composantes distinctes peuvent être observées dans les gliomes :

- le tissu tumoral solide n'est formé que de cellules tumorales, cette composante s'accompagne d'une micro-angiogenèse, se traduisant à l'imagerie par une prise de contraste
- les cellules tumorales isolées : au sein de cette composante, le parenchyme est intact. Il n'y a pas d'angiogenèse, et donc pas de prise de contraste à l'imagerie mais, du fait de l'œdème

fréquemment associé, on observe au scanner une hypodensité et à l'IRM un hyposignal en T1 et un hypersignal en T2.

Les astrocytomes pilocytiques sont composés uniquement de tissu tumoral, les glioblastomes de tissu tumoral et de cellules tumorales isolées, les oligodendrogliomes et oligo-astrocytomes peuvent également présenter une structure mixte mais sont le plus souvent, au début de leur évolution, composés de cellules tumorales isolées.

Le grade des oligodendrogliomes selon l'hôpital Sainte-Anne repose sur des critères histologiques et neuroradiologiques : l'hyperplasie endothéliale et la prise de contraste. Deux grades de malignité sont définis :

- le grade A, caractérisé par l'absence d'hyperplasie endothéliale et de prise de contraste (survie médiane de 11 ans)
- le grade B qui comporte une hyperplasie endothéliale et/ou une prise de contraste (survie médiane de 3,5 ans)⁽²⁰⁾.

L'hyperplasie endothéliale est définie par la présence dans au moins un champ du microscope (objectif 10) de vaisseaux dont les cellules endothéliales possèdent des noyaux qui se touchent : elle caractérise la micro-angiogenèse.

De façon schématique, les oligodendrogliomes purement infiltrants sont toujours de grade A, les oligodendrogliomes de structure mixte, solide et infiltrante peuvent être de grade A ou B, le grade B étant plus fréquent.

Les astrocytomes sont hautement angiogéniques, contrairement aux oligodendrogliomes et aux oligo-astrocytomes qui peuvent croître pendant des années sous forme de cellules tumorales isolées sans entraîner de prise de contraste.

Dans les oligodendrogliomes, l'angiogenèse est un phénomène tardif caractérisant le passage du grade A au grade B.

Les critères diagnostiques de l'oligodendrogliome ont été redéfinis puisque, dans la forme infiltrante pure, les caractéristiques cellulaires (halo clair péri-tumoral) et architecturales (réseau capillaire ramifié), telles qu'elles ont été définies par l'OMS, sont manquantes⁽²¹⁾.

Epidémiologie et incidences

Les gliomes représentent plus de 70% des tumeurs cérébrales, dont l'incidence en Europe et en Amérique du nord, varie de 6 à 11 nouveaux cas pour 100 000 personnes par an pour les

hommes et de 4 à 11 pour les femmes. Les études faisant état d'une incidence croissante dans les pays industrialisés sont contradictoires et posent la question d'une augmentation résultante d'une meilleure détection et/ou de facteurs environnementaux. Concernant ces derniers, le seul à avoir été mis en cause de façon non équivoque est le rayonnement X thérapeutique dans le traitement de leucémies lymphoblastiques de l'enfant, avec des tumeurs apparaissant 10 ans post-thérapie.

L'incidence de chacune des catégories est très hétérogène (astrocytomes I : 0,39 ; astrocytomes II : 0,26 ; astrocytomes III : 0,25 ; glioblastomes : 3,39 ; oligodendrogliomes 0,27 ; oligodendrogliomes anaplasiques : 0,27 ; oligoastrocytomes : 0,10 et oligoastrocytomes anaplasiques : 0,08 nouveaux cas/100 000 personnes/an). Il est à noter que les glioblastomes multiformes (GBM) sont les plus fréquents puisqu'ils représentent 65% des gliomes. Parmi ces derniers, 60% sont des glioblastomes primaires, apparaissant *de novo*.

L'incidence des tumeurs cérébrales primitives a augmenté depuis les années 80. Les causes en sont principalement une amélioration du diagnostic ainsi qu'un vieillissement de la population.

La répartition des gliomes est très variable en fonction de la localisation géographique et de l'ethnie, mais ceci est principalement lié à des différences de statut socio-économique ⁽²²⁾.

Etiologie et Cytogénétique

Les gliomes possèdent un panel d'altérations génomiques telles que des pertes d'hétérozygotie (dérivé de l'expression anglo-saxonne LOH) ou des gains chromosomiques, responsables d'inhibition ou de sur-expression géniques ⁽²³⁾ qui sont à l'origine de leur développement et de leurs caractéristiques cliniques.

Les **astrocytomes**, en fonction de leur grade, présentent des LOH au niveau des régions chromosomiques 9p, 10, 13q, 17q, 19q et 22q, des polyploïdies des chromosome 7 et 22 ⁽²⁴⁻²⁸⁾ ainsi que des aneuploïdies des chromosomes sexuels. Il en résulte une inactivation des gènes CDKN2A et B (9p), PTEN (10q) ⁽²³⁾, RB (13q), TP53 (17p) ^(29, 30) ainsi qu'une amplification des gènes du récepteur à l'EGF (EGFR) (7p) ⁽³¹⁾, de CDK4, MDM2, GLI et PDGFRA. Parmi ces modifications géniques, la perte du 17q et la mutation de TP53 sont observées uniformément dans les grades II à IV. Les autres sont corrélées à l'augmentation de grades. Les proportions de mutations de TP53 permettent en outre de distinguer les glioblastomes primaires (*de novo*) des secondaires, avec respectivement 28% et 65% ⁽³²⁾.

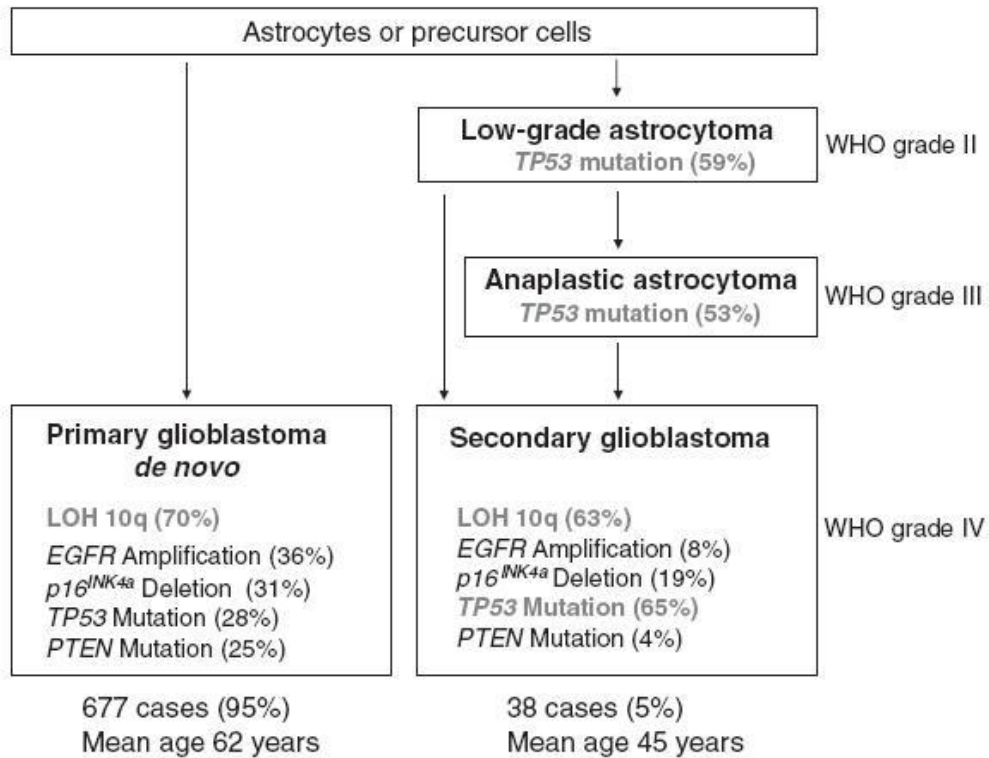


Figure 3 Modifications génétiques conduisant au développement des astrocytomes au niveau de la population

D'après Ohgaki *et al.* 2005 ⁽³²⁾

La principale anomalie chromosomique observée dans les **oligodendrogliomes** est la perte d'hétérozygotie des bras 1p et 19q ^(23, 33). Des LOH fréquentes des chromosomes 4, 6 et 11 sont également constatées ⁽²³⁾. Des pertes d'hétérozygoties au niveau du chromosome 17 existent pour les oligodengliomes anaplasiques. La perte d'hétérozygotie du bras 1p est rapportée dans 67 % des cas et celle du bras 19q dans 82 %. L'absence combinée des 2 bras est constatée pour 64 % des oligodendrogliomes ⁽³⁴⁾. Des données récentes montrent que cette perte d'hétérozygotie serait en réalité le résultat d'un translocation ⁽³⁵⁾, ce qui ne change rien à notre hypothèse. Une autre étude a par ailleurs observé environ 30 % de LOH au niveau des chromosomes 4 et 11 ⁽³⁶⁾.

Il est intéressant de noter que la perte d'hétérozygotie 1p/19q est inversement corrélée à la mutation de p53 ainsi qu'à l'amplification de EGFR ^(29, 37). Ces observations suggèrent 2 voies de progression tumorale distinctes pour les entités que sont les astrocytomes et les oligodendrogliomes.

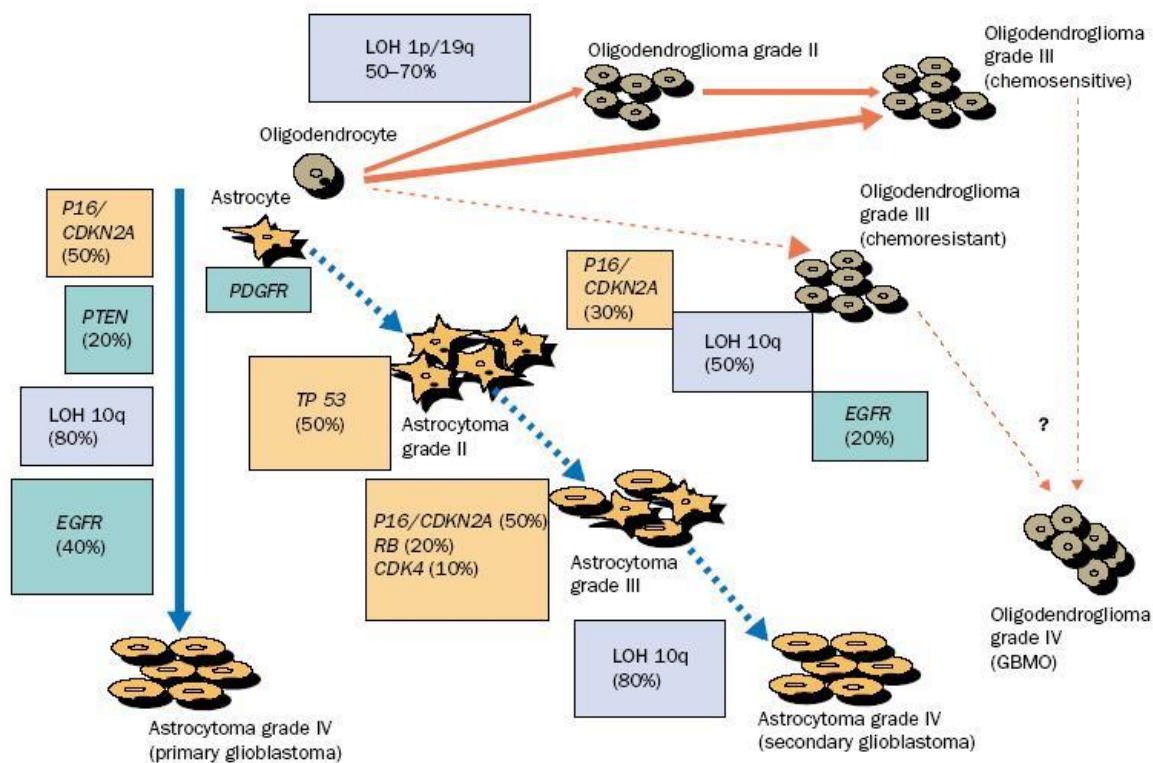


Figure 4 Mutations rencontrées lors de la gliomagenèse

D'après Behin *et al.* 2003 ⁽¹⁹⁾

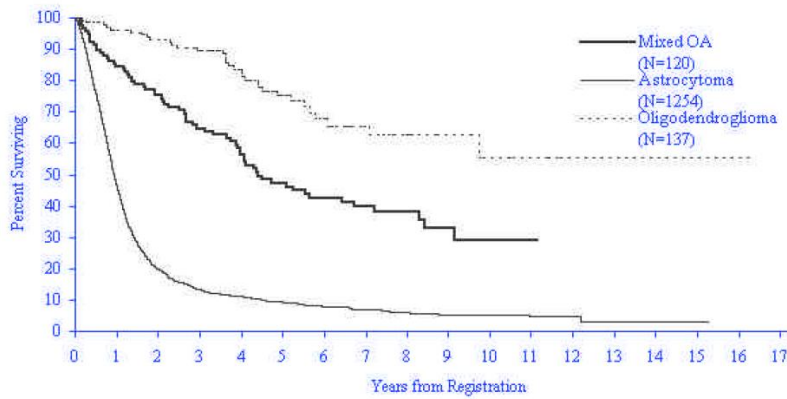
Causes non génétiques

D'autres facteurs, non encore clairement incriminés, pourraient également jouer un rôle, tels que l'exposition à certains virus, les traumatismes crâniens, l'alimentation (composés nitrés), les produits chimiques domestiques et industriels, dont les pesticides, et la pollution de l'air ⁽²²⁾ ainsi que les ondes électro-magnétiques. Des études ultérieures plus approfondies détermineront quels éléments sont effectivement responsables. Une étude récente a néanmoins démontré une augmentation du risque de développer des tumeurs cérébrales pour les utilisateurs réguliers de téléphones portables ⁽³⁸⁾.

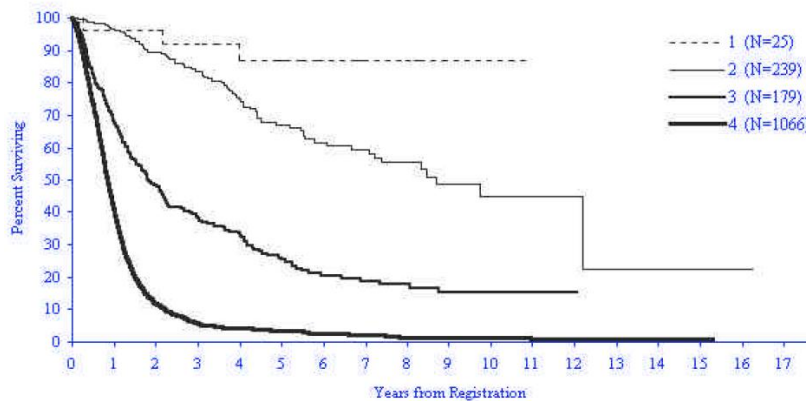
Mortalité

La mortalité, tout comme l'incidence, est très variable d'un gliome à l'autre. En moyenne et pour l'ensemble des tumeurs du système nerveux, elle est de 4 à 7 pour 100 000 hommes par an et de 3 à 5 pour les femmes soit des valeurs équivalentes à celles de l'incidence. Si les tumeurs primaires du SNC représentent seulement 1,35 % de tous les cancers aux USA, ils sont la cause de 2,2% des décès par cancers. Les malades porteurs de tumeurs de bas grade (astrocytomes pilocytiques) ont l'espérance de vie la plus importante, avec près de 100% de survie à 5 ans, alors que moins de 3% des patients atteints d'un glioblastome sont en vie au

terme de cette période. Dans le cas d'une récurrence, l'espérance de vie n'est que de quelques mois ⁽³⁹⁾. Les oligodendrogliomes ont, quant à eux, un meilleur pronostic, avec plus de 70% de survie à 5 ans ⁽²²⁾. Les courbes de survie sont dépendantes à la fois du sous-type de gliome (Astrocytomes/Oligo-astrocytome/Oligodendrogliome) et du grade ⁽⁴⁰⁾.



A.



B.

Figure 5 Survie des patients porteurs de gliomes en fonction du sous-type (A) et du grade (B) des gliomes définis selon les critères de l'OMS ⁽⁴⁰⁾.

Prise en charge médicale

Signes cliniques

Les symptômes sont causés par la masse tumorale elle-même, l'œdème péri-tumoral, ou par l'infiltration ou la destruction des tissus normaux. Ils sont fonction de la localisation, et donc de la zone fonctionnelle endommagée. Les signes cliniques les plus fréquemment observés résultent d'une hypertension intra-cérébrale : maux de tête, nausées, vomissements. Les autres

(pertes d'équilibre, confusion, désorientation, changements de personnalité ou de comportement, ralentissement des fonctions psychomotrices, problèmes de vision ou d'élocution, faiblesses ou paralysie de parties du corps) sont des signes focaux en rapport avec la localisation de la tumeur. Par ailleurs, on peut observer également des signes irritatifs épileptogènes.

Un examen clinique permet dans un premier temps de poser l'hypothèse d'un gliome. Le diagnostic sera confirmé par de l'imagerie médicale telle que le scanner ou le plus souvent par de l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Cette dernière présente une meilleure résolution spatiale. Des produits de contrastes (éléments iodés, barytés pour les scanners, ou gadolinés, par exemple le Gd-DTPA pour les IRM) sont utilisés lors de ces examens afin de mieux distinguer les tissus sains des tissus cancéreux, l'œdème ou la perfusion sanguine.

Aucun traitement n'est initié en l'absence de preuve histologique. L'analyse anatomopathologique est réalisée soit sur une exérèse chirurgicale, soit sur une biopsie stéréotaxique. Les données recueillies permettent de déterminer le type et le grade de la tumeur. En absence de marqueurs spécifiques, ce diagnostic n'est pas parfaitement fiable.

Au moment du diagnostic, la taille d'un gliome est généralement de 4 à 5 cm⁽³⁰⁾. En effet, les symptômes n'apparaissent en général pas avant que les tumeurs n'aient atteint cette taille. On peut alors supposer que cette donnée est un facteur péjoratif de la prise en charge médicale des patients.

Traitements

Pendant plus de 25 ans, les gliomes ont été traités par chirurgie avec une résection la plus complète possible, et par radiothérapie. Les bénéfices de la chimiothérapie étaient plus discutés. Cette dernière était constituée principalement de nitroso-urées⁽⁴¹⁾.

Lors du diagnostic, les tumeurs sont souvent invasives et ne présentent donc plus de délimitations nettes, empêchant une résection totale. La chirurgie, si elle ne peut être complète, permet notamment de diminuer le volume tumoral et de diminuer la pression intra crânienne. Des traitements adjuvants sont donc indispensables avec en première ligne la radiothérapie⁽⁴²⁻⁴⁴⁾.

•Chirurgie :

Lorsqu'elle se situe dans une région accessible du cerveau, la tumeur est retirée chirurgicalement. La résection est la plus complète possible, afin d'éliminer, en plus de la

masse tumorale, les infiltrations éventuelles du tissu environnant. Cette opération est évidemment limitée par la préservation du tissu sain. D'autant plus que le bénéfice d'une résection maximale sur la survie n'a jamais été montré par des études contrôlées ⁽⁴⁵⁾.

•*Radiothérapie :*

Le principe de la radiothérapie repose sur l'utilisation de rayonnements ionisants tels que les rayons X qui entraînent l'ionisation des acides nucléiques. Ces dommages de l'ADN sont responsables de l'altération des chromosomes, ce qui perturbe les divisions cellulaires des cellules cancéreuses. Elle est pratiquée de façon systématique au niveau de la tumeur et d'une zone péri-tumorale de 3 cm d'épaisseur, zone où se situent les infiltrations tumorales responsables des récurrences.

La radiothérapie conventionnelle est fractionnée en plusieurs petites doses d'environ 2 Gray sur une période de temps donnée. La dose totale reçue par un patient varie entre 50 et 60 Gray. Une dose unique de 5 Gray représente la dose létale 50% (DL50) pour l'Homme. Le rayonnement peut être ciblé ou concerner l'ensemble du cerveau, en fonction de la taille et de la localisation de la tumeur.

Cette thérapie est facile à mettre en place mais la radio-résistance des tumeurs la rend plutôt inefficace. De plus, elle est responsable d'effets toxiques sur les tissus sains. Ces derniers peuvent être précoces et transitoires (fatigue, perte d'appétit, nausées et perte de la mémoire à court terme), causés essentiellement par une démyélinisation temporaire au niveau des oligodendrocytes et des œdèmes ⁽⁴⁶⁾ ou par une perméabilité capillaire ⁽⁴⁷⁾ et peuvent être traités avec des corticoïdes. Il peut également apparaître des réactions cutanées et des chutes de cheveux localisées. Les effets tardifs, survenant de plusieurs mois à plusieurs années après le traitement, sont quant à eux souvent irréversibles et résultent des dommages directs causés au cerveau et aux vaisseaux.

Pour les astrocytomes de bas grades dont la résection a été complète, la radiothérapie ne semble pas apporter de bénéfices notables sur la médiane de survie ⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾. Elle est, par contre, recommandée pour les gliomes de hauts grades dont elle double la survie ⁽⁵¹⁻⁵³⁾.

•*Chimiothérapie :*

La chimiothérapie traite la tumeur par l'emploi de molécules chimiques ayant un effet sur les cellules en division. Elle est administrée oralement ou par injection. Elle peut être donnée seule, en combinaison avec d'autres drogues ou en association avec la radiothérapie. La barrière hémato-encéphalique (BHE) constitue un obstacle pour de nombreuses drogues et

peut être contournée par différents moyens : le mannitol qui interrompt la barrière transitoirement, ou le placement d'éponges biodégradables imprégnées de carmustine dans la cavité tumorale.

Tout comme la radiothérapie, la chimiothérapie induit des effets indésirables dont la gravité va de moyenne à forte. Les effets observés dépendent de la partie de l'organisme touchée par la chimiothérapie : myélo-suppression, mucosités du tube digestif, immuno-suppression, neuropathies, réactions cutanées, perte de cheveux, fatigue, stérilité, ménopause, dommages rénaux... De nombreux traitements sont néanmoins disponibles pour diminuer la plupart de ces inconvénients et la chimiothérapie est en général bien tolérée par les patients. De nombreux facteurs entrent en compte pour prévoir la réponse des patients à la chimiothérapie : l'âge, l'état général et l'étendue de la résection au début du traitement ^(54, 55).

*Les drogues de chimiothérapie

Les drogues de chimiothérapie les plus couramment utilisées sont principalement des agents alkylants (ou assimilés) de l'ADN :

- Témazolomide
- Nitroso-urées : carmustine, fotémustine, lomustine
- Composés platinés : cisplatine, carboplatine
- procarbazine

mais également des anti-métabolites et des alcaloïdes.

Les alkylants créent une liaison covalente entre eux-mêmes et un (mono-fonctionnels) ou plusieurs (bi-fonctionnels) groupements carboxyle de l'ADN. Ceci rend difficile le dédoublement des 2 brins lors de la division cellulaire et bloque la transcription au niveau de l'alkylation.

Les anti-métabolites inhibent la synthèse des acides nucléiques, étape nécessaire à la multiplication cellulaire. Ils regroupent 2 sous-classes : les inhibiteurs d'enzymes (méthotrexate) et les médicaments leurres.

Les alcaloïdes agissent quant à eux au niveau des fuseaux de micro-tubules.

Le **témazolomide** (Temodal™), de formule $C_6H_6N_6O_2$ est actuellement le traitement de référence des gliomes, puisqu'il a démontré une amélioration de la survie des patients. Si le

gain en médiane de survie de 12,1 à 14,6 mois peut paraître modeste, le gain de survie à 2 ans passe malgré tout de 10 à 27 %⁽⁵⁶⁾.

Le témozolomide est un dérivé de seconde génération de l'imidazotétrazine. C'est un cytostatique alkylant administré *per os*.

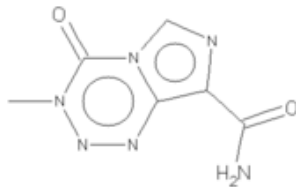


Figure 6 Formule chimique du témozolomide

C'est une prodrogue nécessitant d'être transformée en 5-(3-méthyltriazène-1-yl)-imidazole-4-carboxamide (MTIC) pour devenir active et interagir avec la réplication de l'ADN. Cette conversion ne requiert pas de métabolisation enzymatique hépatique mais est spontanée au pH sanguin (cf.fig.7).

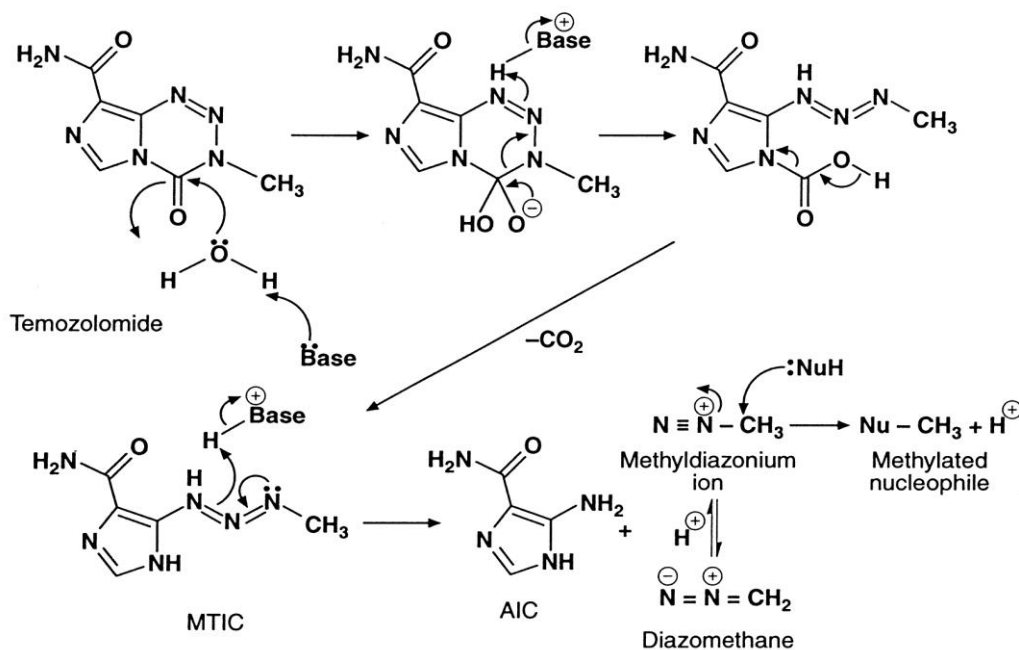


Figure 7 Mécanisme de la méthylation de l'ADN (*Nu*) par le témozolomide

D'après Newlands et al. 1997⁽⁵⁷⁾

Cette drogue a l'avantage d'avoir une bonne distribution ainsi qu'une bonne pénétration dans le SNC (passage exceptionnel à travers la barrière hémato-encéphalique). Son utilisation est préconisée dans le traitement des patients porteurs de gliomes malins, tels que glioblastome multiforme ou astrocytome anaplasique, présentant une récurrence ou une progression après un

traitement standard. Son administration est compatible avec le maintien d'une activité professionnelle puisqu'il est bien toléré et induit peu d'effets secondaires. Il est néanmoins génotoxique, tératogène et fœtotoxique. Il peut également entraîner des stérilités masculines irréversibles.

Avant l'avènement du témozolomide, les gliomes étaient traités avec d'autres drogues. Si aujourd'hui, elles ne sont plus le traitement standard de la pathologie, elles sont encore néanmoins utilisées en deuxième ligne, quand les premiers traitements ont échoué ou que les gliomes ont récidivé. Les traitements de seconde intention ne font cependant pas l'objet d'un consensus par manque de validation fonctionnelle.

Le cocktail **PCV** (Procarbazine, CCNU, Vincristine) a longtemps été considéré comme le traitement le plus efficace en neuro-oncologie. Il est généralement basé sur un cycle de 6 semaines avec la Procarbazine administrée entre les jours 8 et 21 à raison de $60 \text{ mg/m}^2/\text{jour}$, le CCNU à 110 mg/m^2 le premier jour et la vincristine en injections intraveineuses de $1,4 \text{ mg/m}^2$ les jours 14 et 29. Au maximum, un patient bénéficie de 6 cycles de PCV.

Une méta-analyse a néanmoins démontré que le bénéfice du PCV sur le BCNU seul n'est pas évident ⁽⁵⁸⁾.

Le **procarbazine** (Matulane™ ou Natulan™) est également un anti-néoplasique alkylant de formule $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}$ administré sous forme d'une prodrogue métabolisée et activée au niveau hépatique en azo-procarbazine et peroxyde d'hydrogène qui induisent des cassures de l'ADN. C'est un élément du cocktail **PCV**. Il peut se prendre oralement ou par voie intra-veineuse.

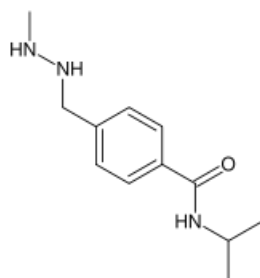


Figure 8 Formule chimique de la procarbazine

La **lomustine** (CCNU™ ou Belustine™) est un alkylant de la classe des nitroso-urées, de formule $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{O}_2$ qui entre dans la composition du cocktail PCV.

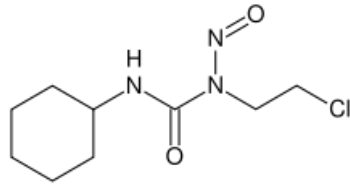


Figure 9 Formule chimique de la lomustine

La **carmustine** (1,3-bis(2-chloroéthyl)-1-nitroso urée) ou BCNU, aussi dénommé BiCNU™ ou Gliadel™, de formule $C_5H_9Cl_2N_3O_2$ est un anti-néoplasique cytostatique alkylant de la famille des nitroso-urées qui inhibe les synthèses de l'ADN et de l'ARN ainsi que celle de diverses enzymes par carbamylation. Elle est administrée par voie intra-veineuse à une posologie usuelle de 150 à 200 mg par mètre carré de surface corporelle toutes les 6 semaines et passe facilement la barrière hémato-encéphalique grâce à sa grande lipo-solubilité. Le Gliadel™ est quant à lui implanté directement au niveau de la cavité de la résection tumorale. Il a ainsi une délivrance progressive. Ses principaux effets secondaires sont pulmonaires (fibrose et pneumonie interstitielle) et hématologiques (thrombopénie et leucopénie). Il est actuellement régulièrement utilisé en clinique.

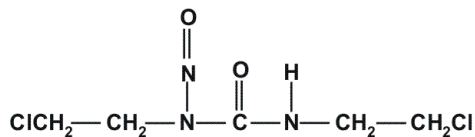


Figure 10 Formule chimique de la carmustine

La **vincristine** (Oncovin™ ou Vincasar PFS™) de formule $C_{46}H_{56}N_4O_{10}$ est un alcaloïde issu de la pervenche de Madagascar (*Vinca Rosea*) qui se lie aux dimères de tubuline et bloque les cellules mitotiques en métaphase. Elle est le troisième élément du cocktail PCV. Les effets indésirables de son injection sont principalement des neuropathies et des constipations.

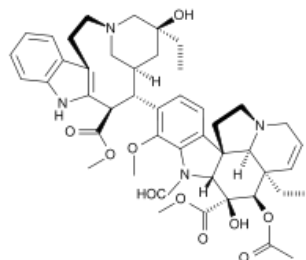


Figure 11 Formule chimique de la vincristine

La **fofémustine** (Muphoran™) [[(chloro-2-éthyl)-nitroso-3 uréido]-1-éthyl] phosphonate de diéthyle-(RS) de formule $C_9H_{19}ClN_3O_5P$ est un agent cytostatique de deuxième ligne, de la

famille des nitroso-urées qui bloque les cellules en phase G2/M. Elle alkyle l'ADN en méthylant les liaisons (ponts multiples entre deux chaînes inter- ou intra-brins, en général au niveau N₇ et/ou O⁶ des guanines). Elle a l'avantage de traverser la barrière hémato-encéphalique, et se concentre bien dans le système nerveux central. Elle est administrée par voie intra-veineuse à raison de 100 mg par mètre carré de surface corporelle, avec 3 administrations consécutives à une semaine d'intervalle avant un repos de 4 à 5 semaines, suivi par une série d'administrations espacées de 3 semaines. Elle induit des thrombo- et leuco-pénies, des nausées et des vomissements.

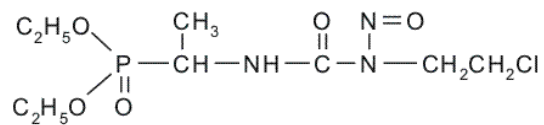


Figure 12 Formule chimique de la fotémustine

Le **cisplatine** ou cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) (Platinol™) de formule Cl₂H₆N₂Pt est un cytotoxique platiné agissant par la création de liaisons intra-brins (GpG) empêchant la réplication des cellules à division rapide.

Il est le plus néphrotoxique des anti-néoplasiques et entraîne également une neuro-toxicité, de forts vomissements, une alopecie ainsi qu'une ototoxicité qui peut conduire à une perte d'audition sévère.

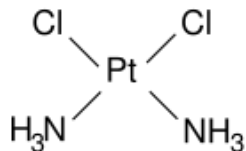


Figure 13 Formule chimique du cisplatine

Le **carboplatine** (Paraplatin™) de formule C₆H₁₂N₂O₄Pt est un proche voisin du cisplatine avec des effets indésirables nettement diminués et principalement une innocuité rénale et auriculaire. Il garde néanmoins un effet myélo-suppresseur responsable d'une diminution drastique des cellules sanguines, avec une sensibilité accrue aux infections. Des quantités injectées 4 fois supérieures à celles de cisplatine sont nécessaires pour obtenir des effets équivalents.

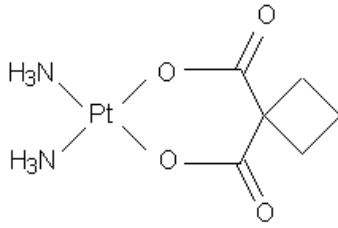


Figure 14 Formule chimique du carboplatine

• *Nouvelles thérapeutiques :*

Aux vues du pauvre pronostic actuel des gliomes, associé à une mortalité significative, de nouvelles approches thérapeutiques sont développées. L'une d'entre elle, le rayonnement synchrotron est actuellement à l'étude chez l'animal où couplé, à des agents alkylants, il s'avère efficace sur des gliomes implantés chez le rat ⁽⁵⁹⁾. Il semble ainsi ouvrir une nouvelle voie dans la radiothérapie des gliomes.

D'autres stratégies, anti-angiogéniques cette fois-ci, sont basées sur l'utilisation d'inhibiteurs du VEGF et de son récepteur :

Le bevacizumab (ou Avastin®) est un anti-corps anti-VEGF efficace lorsqu'il est combiné avec de la chimiothérapie. Il a démontré une grande efficacité en combinaison avec l'irinotecan ⁽⁶⁰⁾. D'autres molécules, inhibitrices du récepteur au VEGF, telles que le vatalanib ou le cediranib, ont donné des résultats encourageants ⁽⁶¹⁾.

Les voies de signalisation intra-cellulaires sont aussi des cibles thérapeutiques, et en particulier les récepteurs à tyrosines kynases (EGF-R, PDGF-R, IGF-R...) qui sont amplifiés dans les gliomes. Par exemple, un anticorps anti-EGFR a ainsi été développé, le gefitinib (Iressa®), et son efficacité en combinaison avec la chimiothérapie ou la radiothérapie a été évaluée dans différents essais cliniques qui n'ont démontré qu'un effet limité ^(62, 63). Un vaccin, spécifique de la forme tumorale mutante EGFRvIII a également vu le jour et donné des résultats prometteurs ⁽⁶⁴⁾.

La PKC est également la cible de stratégies inhibitrices. L'enzastaurin, un inhibiteur a déjà été évalué dans un essai clinique de phase I ⁽⁶⁵⁾. D'autres voies, comme Ras ou mTOR font l'objet d'études.

II. PROBLEMATIQUE

Comportement des gliomes face aux traitements

La réponse des gliomes aux traitements n'est pas homogène et dépend essentiellement du type de ces tumeurs.

Astrocytomes

Les astrocytomes, et plus particulièrement les glioblastomes, sont des entités de mauvais pronostic. La survie à 5 ans des patients porteurs de ces tumeurs varie de près de 90% pour les plus bénignes à environ 2% pour les glioblastomes (grade IV) ⁽²²⁾. Cet échec thérapeutique résulte de la résistance de ces gliomes aux traitements de chimio- et radiothérapie classiques.

Le traitement standard des astrocytomes consiste en un traitement de radiothérapie focale (60 Gy administrés en 30 fractions) en association avec du témozolomide (TMZ) puis jusqu'à 6 cycles de chimiothérapie seule. Dans la première phase, le patient absorbe quotidiennement 75 mg/m² de surface corporelle de TMZ pendant une quarantaine de jours. Après une période d'arrêt de 6 semaines, commence la monothérapie de 6 cycles maximum. Le premier cycle de 28 jours consiste en la prise quotidienne de 150 mg/m²/j pendant 5 jours. S'en suit une période de repos de 23 jours. La dose peut être augmentée à 200 mg/m²/j pendant 5 jours durant le 2^{ème} cycle si la toxicité est jugée acceptable, et maintenue ainsi pendant les autres cycles sauf si une toxicité n'apparaît.

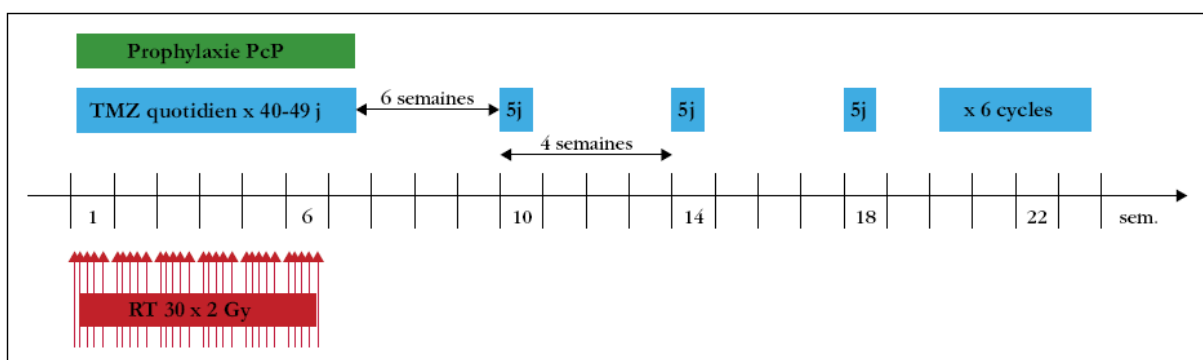


Figure 15 Traitement combiné des glioblastomes selon EORTC-NCIC

PcP: *Pneumocystis pneumoniae* (prophylaxie par inhalations de pentamidine mensuel ou du triméthoprime-sulfaméthoxazole 3 x semaine) ; TMZ : témozolomide (dosage pendant la radiothérapie quotidien à raison de 75 mg/m² 7 j/7, en maintenance 150-200 mg/m² 5 jours sur 28) ; RT : radiothérapie. ⁽⁵⁶⁾

Oligodendrogliomes sensibles

Les oligodendrogliomes sont quant à eux d'un meilleur pronostic puisque la survie des patients à 5 ans est supérieure à 30% pour les plus hauts grades ⁽²²⁾. Ils sont remarquablement plus sensibles aux traitements que les astrocytomes ^(66, 67), avec environ deux tiers des oligodendrogliomes chimio-sensibles ⁽⁶⁸⁾.

Sensibilité à la chimiothérapie

Les oligodendrogliomes présentent une particularité cytogénétique : la perte d'hétérozygotie des bras chromosomiques 1p et 19q. La perte d'hétérozygotie du bras 1p est rapportée dans 67 % des cas et celle du bras 19q dans 82 %. L'absence combinée des 2 bras est constatée pour 64 % des oligodendrogliomes. Ces délétions sont corrélées à la chimio-sensibilité des oligodendrogliomes ⁽³⁴⁾. En effet, 100 % des oligodendrogliomes dont ces bras chromosomiques sont absents sont chimio-sensibles.

Cette caractéristique cytogénétique est actuellement le critère le plus relevant pour la prise de décision en clinique ^(69, 70).

Leur chimio-sensibilité pourrait donc résulter de l'absence d'expression de certains gènes, dits de résistance, des régions chromosomiques 1p et 19q manquantes. Autrement dit, l'expression ou l'hyper-expression de ces gènes de résistance, dans les tumeurs, neutraliserait les effets de la chimiothérapie dans les astrocytomes.

En réalité, ce n'est pas l'ensemble des régions chromosomiques 1p et 19q qui sont impliquées dans la différence de sensibilité à la chimiothérapie. Des zones minimales de délétion ont été déterminées ⁽⁷¹⁻⁷⁵⁾ et il en ressort un consensus qui localiserait les zones d'intérêt au niveau de la région 1p36-p32 pour le chromosome 1 et 19q13.2-19q13.4 pour le chromosome 19 (cf. Annexes I et II).

Résistance à la chimiothérapie

La résistance aux traitements de chimiothérapie est une caractéristique fréquente des cancers, responsable d'une péjoration du pronostic vital du patient. Elle concerne les drogues qui ciblent les cellules en prolifération rapide tels que les agents platinés ou alkylants, les anti-métabolites, les inhibiteurs mitotiques ainsi que les intercalants de l'ADN ⁽⁷⁶⁾. Les causes en sont diverses et variées. Elles regroupent les mécanismes d'entrée et de sortie des drogues dans la cellule (P-gp, ABCG2...), ceux qui régissent leur activation, dégradation et inactivation, les mutations des cibles de ces drogues, la correction de leurs conséquences (réparation de l'ADN) voir l'abolition de ces dernières (inhibition de l'apoptose⁽⁷⁷⁾) ⁽⁷⁸⁾.

Efflux MDR/Pgp

La glycoprotéine P (Pgp), encodée par le gène MDR1, est une pompe active responsable de l'efflux de divers composés lipophiles dont des drogues de chimiothérapie ^(79, 80). L'expression cellulaire de Pgp résulte dans le phénomène de résistance à diverses drogues, appelé le MDR pour MultiDrug Resistance *in vitro* et est un mécanisme qui joue un rôle important dans la résistance des tumeurs à la chimiothérapie ⁽⁸¹⁻⁸³⁾, dans lesquelles il est souvent exprimé ^(84, 85).

Ce constat a encouragé de nombreuses équipes à travailler sur des inhibiteurs de MDR afin d'améliorer le pronostic des patients porteurs de telles tumeurs. Pourtant, aucun traitement efficace basé sur cette stratégie n'a encore vu le jour après plus de 20 ans de recherche. Récemment, une étude clinique de phase II basée sur l'utilisation d'un inhibiteur de MDR, VX-710, a échoué à montrer une amélioration de la prise en charge médicale par rapport au traitement de chimiothérapie seul (doxorubicine et de vincristine) chez des patients porteurs de tumeurs du poumon ⁽⁸⁶⁾. Une autre, a par contre démontré l'utilité de l'encapsulation des drogues de chimiothérapie dans des liposomes, dans le cadre du lymphome non-Hodgkinien, ce qui permet d'échapper à l'efflux ⁽⁸⁷⁾.

EGFR et les récepteurs à tyrosine kinases

La famille des récepteurs à l'EGF est composée de différents récepteurs à activité tyrosine kinase : EGF-R (ErbB1), ErbB2 (Neu), ErbB3, et ErbB4. Ils sont chacun constitué d'un domaine cytoplasmique à tyrosine kinase, d'un seul domaine transmembranaire ainsi que d'un domaine extra-cellulaire impliqué dans la liaison aux ligands (entre autres EGF et TGF α) et la dimérisation. Lors de la fixation du ligand en effet, 2 récepteurs se rapprochent provoquant leur phosphorylation réciproque au niveau des tyrosines cytoplasmiques. Différentes protéines effectrices à domaines SH2 sont alors recrutées spécifiquement selon la paire de récepteurs formée, déclenchant ainsi en aval telle ou telle voie cellulaire et conduisant à la prolifération cellulaire, une diminution de l'apoptose, une motilité accrue, la sécrétion de protéines, une différenciation ou une dédifférenciation ⁽⁸⁸⁾ (cf.fig.16). Le récepteur à l'EGF régule par exemple des voies de signalisation importantes, incluant la cascade RAS-RAF-MAPK ainsi que la voie PI3-K/AKT ⁽⁸⁹⁾.

Ces récepteurs ont été impliqués dans la progression de différents cancers et la formation de métastases y compris celles des GBM ⁽⁹⁰⁾. Ce récepteur est de plus amplifié dans environ 50% des GBM mais dans peu d'astrocytomes anaplasiques ⁽⁹¹⁾, laissant penser que l'activation de

EGFR est impliquée dans l'évolution vers le stade glioblastome. Par ailleurs, au moins 80% des GBM présentent une activation de Akt et 40 à 50% ont le gène PTEN (phosphatase and tensin homolog) muté ou perdu ⁽⁹²⁾. Ces faits soulignent l'importance des voies des récepteurs à tyrosine kinase dans la gliomagenèse.

Plus particulièrement, l'activation du récepteur à l'EGF est un évènement important de la carcinogénèse, avec des mutations dans plus de 40% des cas ^(93, 94). La mutation la plus fréquemment observée est une délétion des exons 2-7 qui résulte dans la troncature de la partie extracellulaire du récepteur à l'EGF (Δ EGFR), ainsi activé de manière constitutive ^(95, 96). Lorsque ce récepteur muté est introduit dans une lignée cellulaire issue de gliome, il en résulte une tumorigénicité fortement accrue chez la souris ⁽⁹⁶⁾, liée à une augmentation de la prolifération et à une diminution de la mort des cellules tumorales ⁽⁹⁴⁾, ce que n'entraîne pas une surexpression du récepteur natif ^(94, 97).

L'expression du récepteur muté entraîne une suppression de l'apoptose induite par les drogues, largement induite par une augmentation d'expression de Bcl-X_L et l'activation de la protéase caspase-3-like en résultant ⁽⁹⁸⁾. Le récepteur à l'EGF joue ainsi un rôle dans la résistance des gliomes aux traitements. Mais celui-ci demeure plutôt indirect, puisqu'il concerne le métabolisme général et non l'effet des drogues. D'ailleurs, des traitements à base d'inhibiteurs ont été développés : l'erlotinib (OSI774, Tarceva) et le gefitinib (ZD1839, Iressa) mais ils ne sont actuellement pas utilisés dans la prise en charge médicale des gliomes.

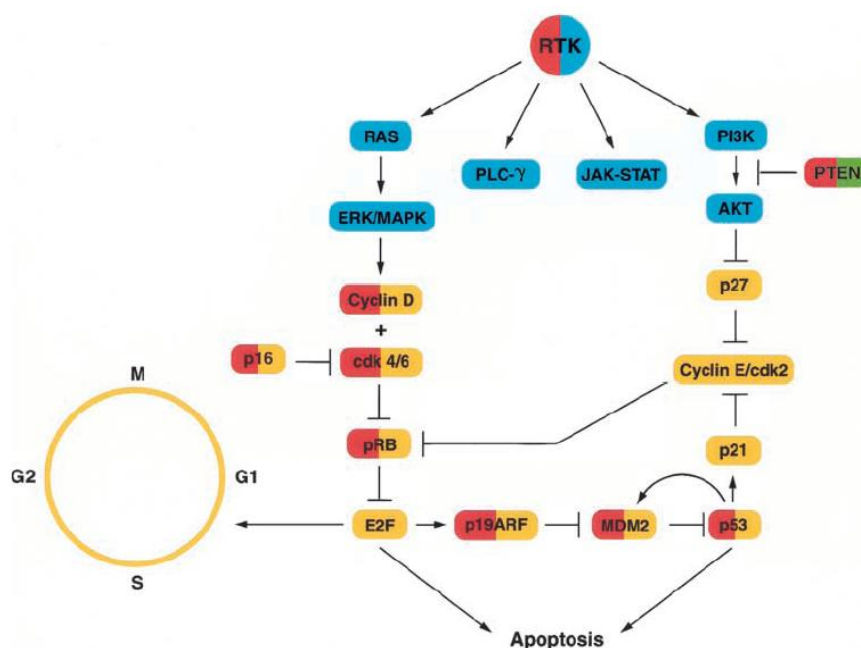


Figure 16 Cascades de signalisation en aval des récepteurs à tyrosine kinases

D'après Maher *et al.* 2001 ⁽¹⁾

Mgmt

La O⁶-méthylguanine-DNA-méthyltransférase (Mgmt) code pour AGT, une enzyme de réparation qui répare les alkylations de l'ADN au niveau de la guanine dans la position O⁶. En effet cette enzyme agit en transférant de manière covalente un groupe alkyl vers son site catalytique. Cette réaction est irréversible et inactive l'enzyme qui est secondairement dégradée dans le protéasome. Sans cette enzyme, la méthylguanine est appariée à tort avec une thymine au lieu d'une cytosine⁽⁹⁹⁾. Ce mésappariement conduit au recrutement d'une enzyme la Mismatch Repair (MMR). Mais cette enzyme est inefficace dans ce cas particulier de mésappariement et MMR induit finalement les voies de l'apoptose⁽¹⁰⁰⁾. Dans le cas d'une défaillance du recrutement de MMR, on aboutit à une transversion G vers A.

Des travaux montrent que MGMT joue ainsi un rôle dans la prévention des cancers dans le cas d'une exposition aux agents alkylants⁽¹⁰¹⁾. De faibles niveau d'expression de MGMT sont d'autre part associés à une augmentation du taux de mutation de G vers A dans des gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes tels que K-ras pour le cancer du colon, les cancers du poumon non à petites cellules et les cancers gastriques^(102, 103).

Plus qu'au taux d'expression, on s'intéresse particulièrement à la méthylation du promoteur MGMT. La méthylation est un phénomène épigénétique qui touche les résidus cytosine des îlots CpG situés dans la région 5' du promoteur d'un gène. Cette modification provoque une altération de la structure de l'hétérochromatine ce qui diminue la fixation des facteurs de transcription et par conséquent, la transcription. Dans les cancers, une diminution anormale et globale de l'expression avait été constatée et elle a été imputée à la méthylation des promoteurs des gènes, et en particulier des gènes suppresseurs de tumeurs⁽¹⁰⁴⁻¹⁰⁶⁾.

Cette modification épigénétique du promoteur de MGMT est associée à une diminution de l'expression du gène et à une perte de l'activité de AGT^(107, 108). L'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs par la méthylation est un événement précoce et répandu dans la cancérogenèse^(109, 110).

Dans le cadre des gliomes, la méthylation de MGMT touche de 30 à 50% des patients atteints de glioblastomes et pourrait à la fois être un facteur pronostic et un critère d'indication d'une chimiothérapie adjuvante⁽¹¹¹⁻¹¹³⁾, d'autant plus qu'un taux d'expression élevé de MGMT dans les glioblastomes pourrait être l'un des déterminants d'une résistance aux chimiothérapies alkylantes^(101, 114, 115). Une étude de phase III, intégrant 573 patients et menée par l'EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) et le NCIC (National Cancer

Institute of Canada), a testé la méthylation du promoteur de MGMT comme facteur prédictif de la réponse au témozolomide. Elle a ainsi démontré que ce traitement adjuvant de la radiothérapie faisait passer la survie à 2 ans de 10% à 26% ⁽¹¹⁶⁾. Deux ans après le diagnostic, 46% des patients appartenant au sous-groupe de patients dont le promoteur est méthylé sont en vie, contre seulement 14% des autres ⁽⁴⁴⁾.

L'expression de MGMT est aussi induite par les lésions de l'ADN ⁽¹¹⁷⁾. La protéine p53 pourrait réguler négativement l'expression de MGMT dans les cellules astrocytaires ⁽¹¹⁸⁾. La connaissance de ces mécanismes a un intérêt pronostic. Des thérapeutiques sont envisagées pour inhiber l'activité de AGT et ce avec des résultats mitigés. Deux molécules ont été utilisées : L'O⁶ Benzyl-guanine (O⁶BG) et l'O⁶-4-(bromothényl) guanine.

L'O⁶BG a été utilisé en combinaison avec de la carmustine (un agent alkylant) en systémique mais cette combinaison conduit à diminuer les doses de carmustine et augmente les toxicités ⁽¹¹⁹⁾. Les résultats sont meilleurs dans le cas de l'usage de carmustine délivrée localement au sein de la tumeur ⁽¹²⁰⁾. La tolérance de l'O⁶-4-(bromothényl) guanine semble plus grande ⁽¹²¹⁾. Des recherches sont encore en cours.

D'autres mécanismes de résistance aux chimio- et radiothérapies doivent pourtant exister pour expliquer l'absence de réponse des patients dont le promoteur est méthylé ⁽¹¹³⁾ et parmi ceux-ci, d'autres éléments de la fonction de réparation de l'ADN. Une cellule avec une fonction de réparation accrue serait effectivement à même de mieux résister à la chimiothérapie qui agit en endommageant l'ADN. La réparation de l'ADN et le retrait des adduits créés par les drogues de chimiothérapie sont en effet les principaux mécanismes de résistance aux nitrosourées et aux composés platinés ⁽¹²²⁾. La fonction de réparation a d'ailleurs été mise en cause dans la chimio-résistance dès 1980 ⁽¹²³⁾ puis dans les gliomes en particulier dès 1984 ⁽¹²⁴⁾.

Les autres gènes intervenant dans la réparation de l'ADN

La préservation de l'intégrité du génome d'un organisme est indispensable, au niveau individuel pour son bon fonctionnement et la prévention des cancers, et à celui de l'espèce, pour une transmission fidèle des caractères génétiques. Pourtant, l'ADN est la cible perpétuelle de stress chimiques ou physiques, et sa réplication est la cause de nombreuses erreurs. Les sources de dommages peuvent être endogènes (eau et oxygène) ou exogènes (UV, fumée de tabac, polluants...). Chaque cellule subit ainsi plus de 10 000 lésions par jour ⁽¹²⁵⁾.

Notre génome est cependant protégé pour une grande part par p53, un gène muté dans plus de 50% des cancers. Le gène p53 produit TP53 la principale protéine suppresseur de tumeurs, gardienne du génome. Cette protéine est un régulateur clé du cycle cellulaire qui se lie à l'ADN et agit en tant que facteur de transcription. Il induit soit un arrêt du cycle en G1, soit une apoptose en réponse à différents stress, y compris les dommages de l'ADN ⁽¹²⁶⁾. Les lésions induisant des cassures simple-brin activent indirectement et augmentent les niveaux de TP53, par modifications post-traductionnelles. La protéine ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) phosphoryle le complexe cdk2/cyclinE qui, à son tour, phosphoryle TP53. Ainsi activée cette dernière induit la transcription de gènes tels que p21^{Waf1} et p14^{ARF}. P14^{ARF} stabilise TP53 en inactivant MDM2, un inhibiteur de p53 qui favorise l'ubiquitination de TP53 et donc sa dégradation par le protéasome. La protéine p21 se lie quant à elle à cdk2. Au final, la transition G1→S du cycle cellulaire est bloquée. La cellule arrête ainsi son cycle cellulaire, se ménageant une fenêtre temporelle permettant aux systèmes de réparation d'éliminer le dommage avant qu'une mutation ne soit fixée dans le génome par la réplication ou la division cellulaire. L'accumulation de telles mutations dans le génome peut conduire à terme à l'oncogenèse. Néanmoins, si la lésion est trop sévère et ne peut être corrigée, la cellule se suicide par apoptose. BAX se délocalise pour cela vers la mitochondrie où il déclenche la libération du cytochrome c, induisant la cascade apoptotique des caspases.

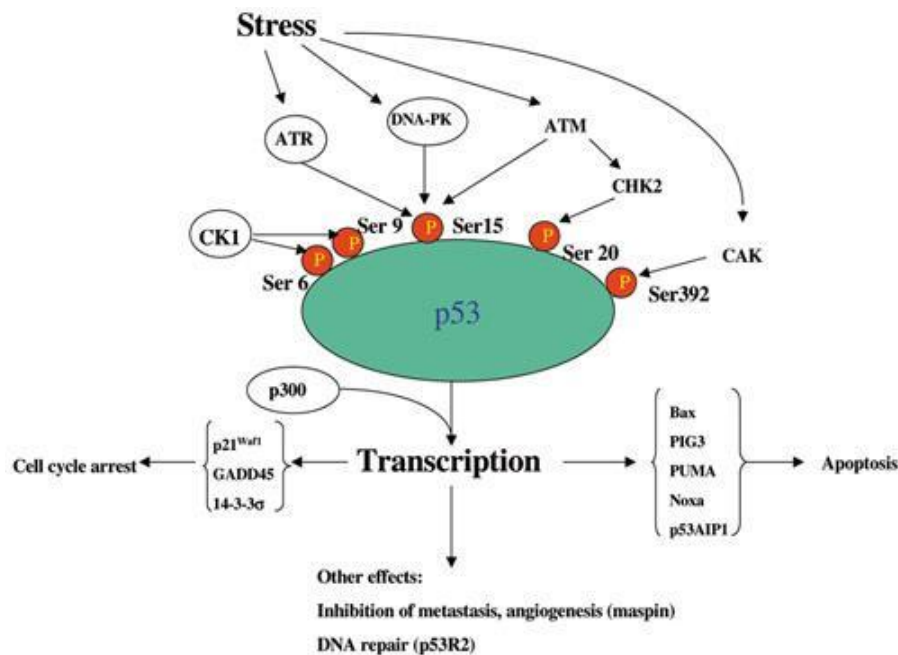


Figure 17 Rôles de p53 dans la cellule soumise à différents stress

Pour empêcher l'apparition de cancers dus aux mutations induites par les dommages de l'ADN, la fonction de réparation se doit d'être efficace. Pour ce faire, environ 150 enzymes de réparation ou produits de gènes, associés aux réponses cellulaires aux dommages de l'ADN, sont mis en jeu chez l'être humain ⁽¹²⁷⁾ (cf. Annexe III)

Les types de lésions sont si nombreux qu'il est nécessaire à la cellule de posséder différents systèmes de réparation. Il existe ainsi 3 systèmes de réparation par excision : la réparation par excision de base (ou BER selon l'abréviation anglo-saxonne), la réparation par excision de nucléotide (NER) ainsi que la réparation de mésappariements (MMR). En plus de ces derniers, on distingue la liaison d'extrémités sans homologie (NHEJ), la Recombinaison Homologue (HR) ainsi que la réversion directe des dommages de l'ADN.

•*Lésions de l'ADN :*

La double hélice est sujette à des agressions endogènes inévitables dues à une variété de métabolites réactifs normaux, tels que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou les hydrolyses spontanées des nucléotides, et nécessite ainsi une activité de réparation constante. Ces lésions sont typiquement celles corrigées par **BER**.

Des facteurs exogènes sont également à l'origine de dégradations de l'ADN. La fumée de cigarette, responsable de plus de cancers mortels qu'aucun autre composé actuellement identifié, est le facteur environnemental humain le plus fréquent. Parmi les autres, les UV solaires sont le principal agent environnemental dont l'exposition non volontaire soit mutagène. Les lésions ainsi générées sont des dimères de pyrimidines, cytotoxiques et mutagènes qui se produisent en des localisations précises. Elles sont réparées par **NER**, dont c'est la principale fonction.

L'ADN peut également être victime de cassures simple- et double-brin. Elles peuvent être le fruit d'irradiations X, ou d'anti-cancéreux tels que le cisplatine ou les agents alkylants.

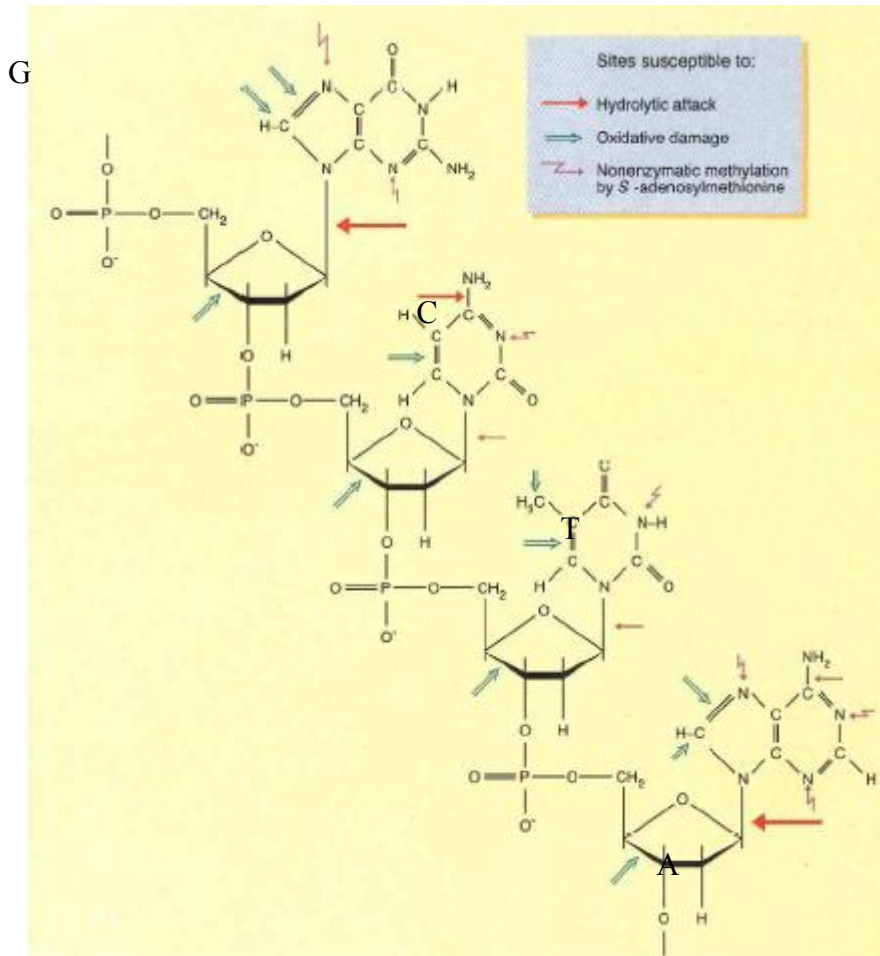


Figure 18 Lésions de l'ADN et leurs sites préférentiels d'occurrence

D'après Lindahl *et al.* 1993 ⁽¹²⁸⁾

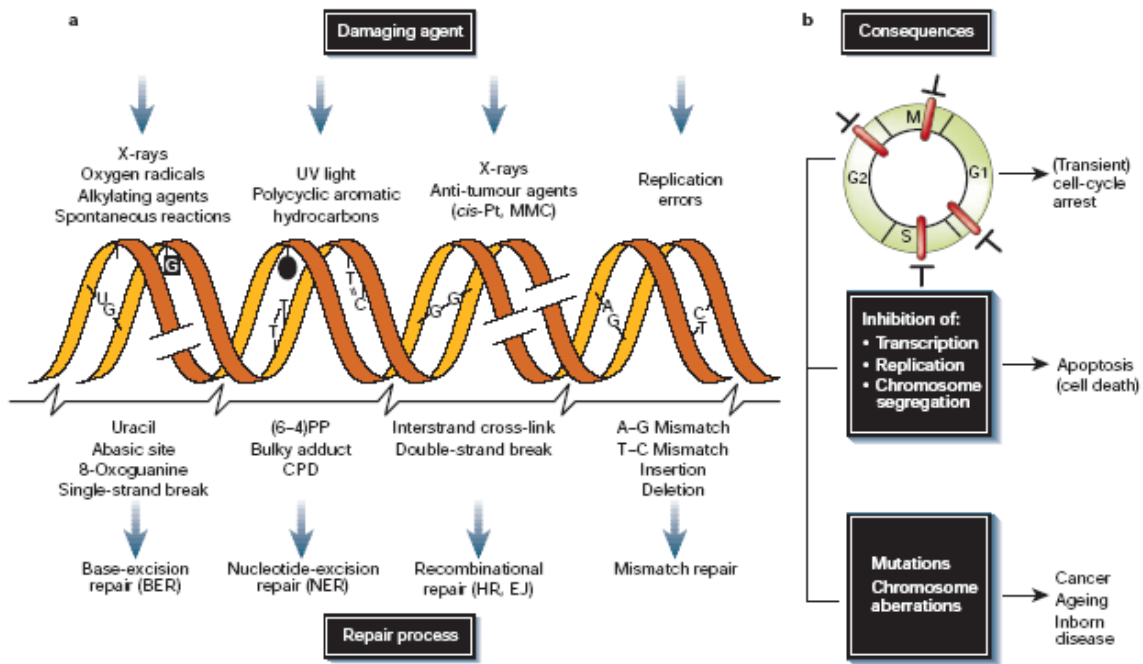


Figure 19 Dommages de l'ADN, systèmes de réparation mis en jeu et conséquences

D'après Hoeijmakers *et al.* ⁽¹²⁵⁾

•**Réparation des lésions :**

*Réversion directe des dommages :

Le mécanisme de réparation le plus simple est la réversion directe des dommages. Ce mode de réparation corrige les dommages mutagènes et létaux induits par les agents alkylants simples ainsi que les produits du métabolisme nitrique ⁽¹²⁹⁾. La O⁶-méthylguanine-DNA méthyltransferase (MGMT), transfère le groupement méthyle des O⁶-méthylguanines sur un de ses résidus cystéine ^(129, 130). La protéine est ainsi rendue inactive.

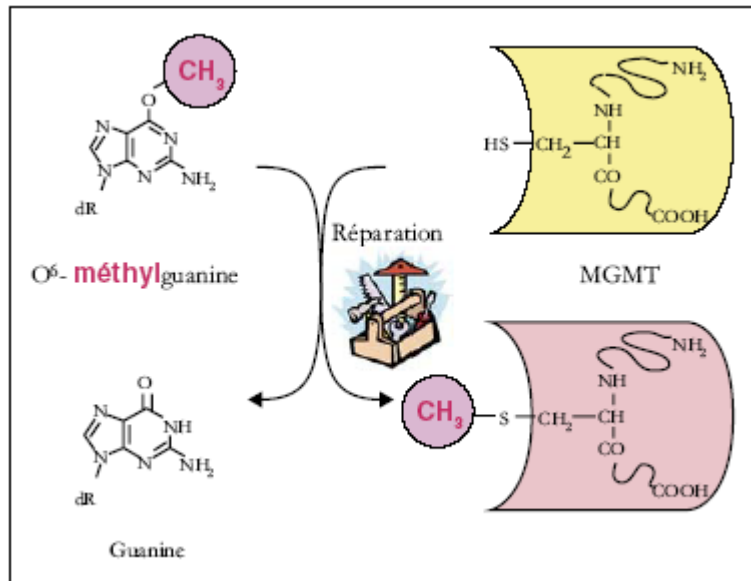


Figure 20 Mécanisme de réversion directe de la méthylation par MGMT

D'après Paus *et al.* 2007 ⁽¹³¹⁾

* La réparation par excision :

Le mécanisme de base de ces systèmes est l'excision de la partie altérée, de 1 à une vingtaine de nucléotides suivie de la resynthèse de la zone manquante.

-BER : Base excision repair

Ce système prend en charge les bases endommagées par l'oxydation endogène, la détérioration hydrolytique ⁽¹³⁰⁾ ainsi que les alkylations non enzymatiques ^(132, 133) telles qu'elles sont présentées dans la figure suivante (cf.fig.21).

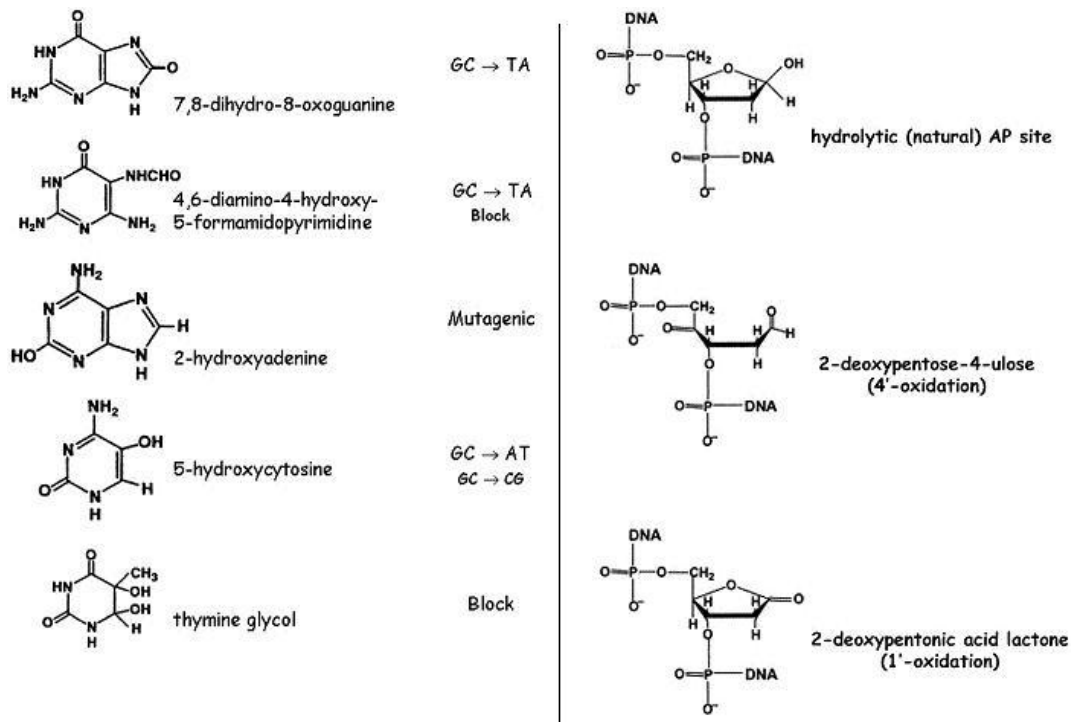


Figure 21 Bases endommagées et leurs conséquences

D'après Wilson *et al.* 2007 ⁽¹³⁴⁾

BER se décompose en réalité en 2 voies : le **short-patch BER** qui consiste en l'élimination d'une seule base modifiée et le **long-patch BER** qui prend en charge les cassures simple-brin et élimine pour cela un plus long fragment d'ADN ⁽¹³⁵⁾. La première étape de la voie principale que constitue le short-patch, consiste en la libération de la base modifiée par une DNA-glycosylase qui rompt la liaison N-glycosidique. Les glycosylases sont divisées en deux groupes : les mono-fonctionnelles qui n'excisent que la base (ex : UDG) et les bi-fonctionnelles qui, à la fois, excisent la base et incisent le squelette phosphodiester en 3' du site abasique (AP : apurinique ou apyrimidique) ainsi créé (ex : OGG1 et NEIL1) ⁽¹³⁴⁾, par un mécanisme β -lyase ⁽¹³⁶⁾. Chaque glycosylase prend en charge un type de lésion, et notamment l'Uracil-DNA Glycosylase (UNG) qui élimine les uraciles ou les 5-fluorouraciles de l'ADN, évitant ainsi la création de mésappariements U-G qui conduisent à une transition GC => AT ⁽¹²⁹⁾. Mutyh quant à elle, élimine l'adénine incorporée en face d'une 8-oxoguanine ⁽¹³⁷⁾. Des sites abasiques sont ainsi créés. Ces sites peuvent également résulter d'une hydrolyse spontanée ^(129, 135). Le squelette sucre-phosphate est ensuite incisé (APE1 et APE2) et le résidu abasique, excisé. Après élimination du résidu phosphate désoxyribose en 5' par la dRPase ⁽¹²⁹⁾, l'ADN est resynthétisé *de novo* (DNApol β , XRCC1) puis ligaturé (LIG3) (cf.fig.22).

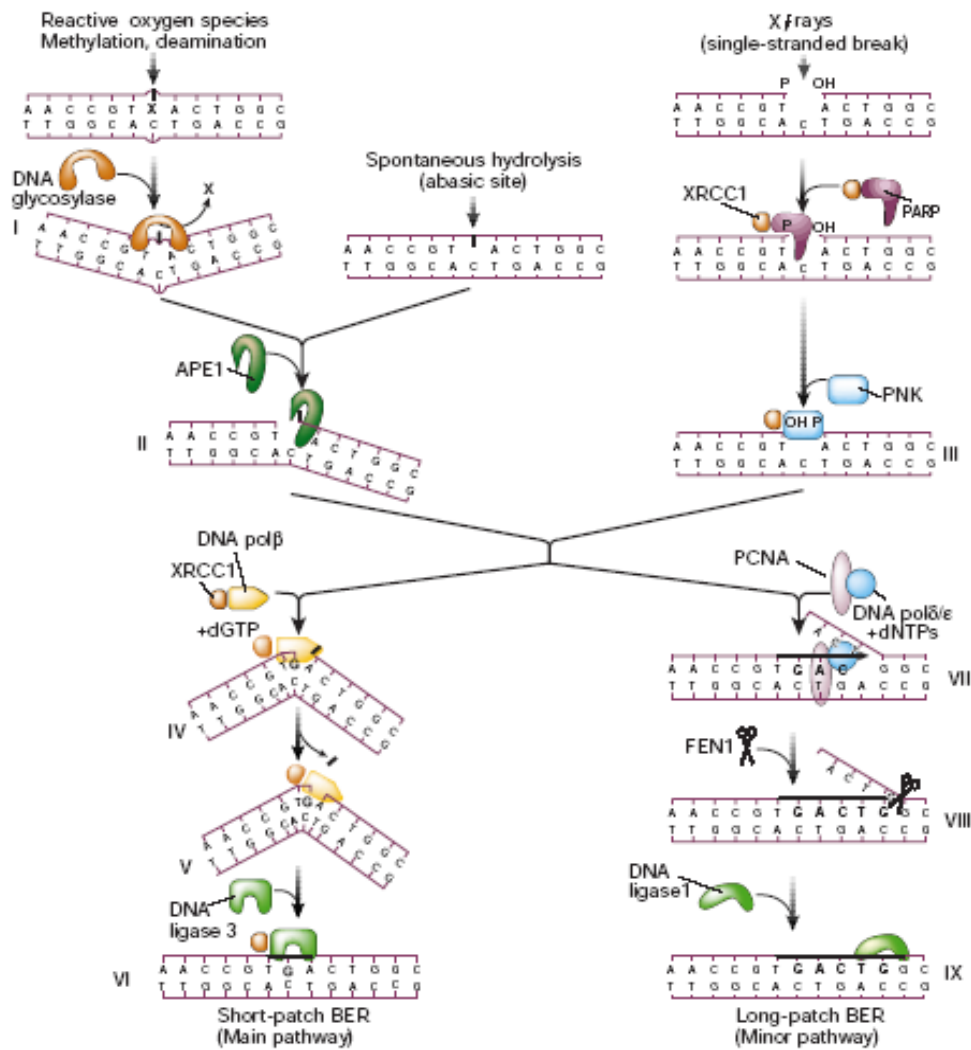


Figure 22 Mécanismes de réparation de l'ADN par BER

D'après Hoeijmakers *et al.* 2001⁽¹²⁵⁾

La réparation des cassures simple-brin (SSBR), induites par les rayons X, les glycosylases bi fonctionnelles ou les ROS⁽¹³⁸⁾, est réalisée par le mécanisme long patch de BER. La cassure est détectée par PARP-1/XRCC1 et la suite du mécanisme est réalisée par APE1 ou PNKP, une phosphatase qui retire l'extrémité 3' phosphate, obstructive⁽¹³²⁾. Contrairement à la voie de réparation précédente, ce sont de grands segments d'ADN (environ 7 nucléotides) qui sont produits. De plus, cette élongation est l'œuvre non pas de l'ADN polymérase β , mais des ADN polymérases δ ou ϵ , en coopération avec PCNA^(129, 134). La portion d'ADN qui restait fixée en aval de la lésion est consécutivement coupée par FEN1. Le néo-fragment est finalement ligaturé par LIG1⁽¹³⁴⁾.

La perte complète de BER est non viable, et des mutations dans certains de ses éléments sont à l'origine de syndromes. En effet, les souris KO pour les gènes centraux de BER, c'est-à-dire, pol β , APE1, XRCC1 et les DNA ligases I ou III meurent durant le développement embryonnaire^(136, 139). Cette létalité est probablement due aux rôles que ces gènes jouent en dehors de BER et qui sont cruciaux pour le développement de l'embryon. Par exemple, APE module l'activité de différents facteurs de transcription, tels que Fos, Jun et p53^(136, 139). Quant aux autres gènes, leur KO induisent différents phénotypes chez la souris: aucune anomalie observée (Nth1, Udg, Mutyh), accumulation d'altérations de l'ADN (Ogg), sensibilité accrue aux alkylants, oxydants ou rayonnements ionisants (Apex, Agg), pathologies diverses (Trex1) ainsi qu'une létalité au cours du développement (Apex)⁽¹³⁹⁾. Des mutations de certains éléments de BER sont impliquées dans l'apparition de cancers chez l'Homme⁽¹³²⁾. Par exemple, le gène **Mutyh** est connu pour réparer les 8-oxo-7,8-dihydro-2'déoxyguanosines (8-oxodG) causées par l'oxydation. Ses mutations géniques et ses variants ont été associés au développement d'adénomes colo-rectaux et d'autres cancers⁽¹⁴⁰⁾. D'autre part, **Pnkp**, impliqué dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN causées par les ROS, les radiations ionisantes ou les agents alkylants^(141, 142), a été relié à la susceptibilité aux agents génotoxiques mais pas à la chimio-sensibilité⁽¹⁴³⁾. Il interagit également avec Xrcc1, impliqué dans le processus tumoral⁽¹⁴⁴⁾.

-NER : Nucleotide Excision Repair

NER, quant à lui, est un système de réparation ubiquitaire qui élimine tout un panel de lésions mutagènes de l'ADN tels les dimères de pyrimidines ainsi que les gros adduits causés par les agents environnementaux tels que les U.V., la fumée de cigarette et, bien sûr, certains agents de chimiothérapie tels que le cisplatine⁽¹⁴⁵⁾. Ce sont principalement des dommages induisant des distorsions de la double hélice^(130, 146). Mais NER est aussi impliqué dans la réparation de dommages induits par des agents alkylants ou oxydants qui n'entraînent pas de distorsions de l'ADN. Il est le plus flexible des systèmes de réparation. Le mécanisme général est le suivant (cf.fig.23):

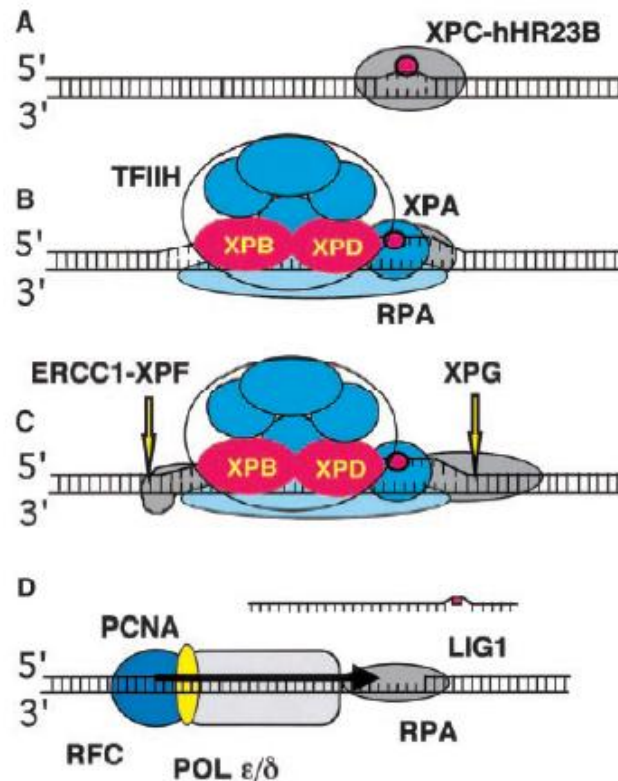


Figure 23 Mécanisme de réparation de l'ADN par NER
D'après Lindahl et al. 1999 ⁽¹³⁰⁾

Les dommages sont reconnus par XPA et RPA (ou HSSB) qui possèdent chacun une affinité particulière pour l'ADN endommagé ou simple brin ⁽¹²⁹⁾. Leur association augmente cette affinité. Ils recrutent le complexe XPC (formé des protéines XPC et hHR23B) ainsi que TFIIH, qui se lie ensuite au site endommagé. Les complexes ERCC1/XPF et XPG coupent l'ADN en 5' et 3' respectivement après ouverture de l'hélice par les hélicases XPB (sens 3' → 5') et XPD (5' → 3') du complexe transcriptionnel TFIIH ^(125, 147). Un segment monobrin de 24 à 32 nucléotides ⁽¹⁴⁶⁾ est ainsi libéré et l'autre brin est protégé par RPA. L'ADN polymérase ε/δ avec PCNA et RFC, resynthétise la région manquante en se servant du brin complémentaire comme matrice. La DNA ligase I (LIG1) réalise la dernière liaison phosphodiester.

En réalité, NER est composé de 2 sous-systèmes : le **GGR** (Global Genomic Repair) et le **TCR** (Transcription Coupled Repair) ⁽¹⁴⁸⁾. Le premier, aidé par la structure chromatinienne et les protéines liées à l'ADN, est sous le contrôle du gène suppresseur de tumeur p53 ⁽¹⁴⁹⁻¹⁵¹⁾. Le second s'occupe spécifiquement des lésions qui bloquent l'ARN polymérase au niveau des brins transcrits des gènes exprimés. Dans les faits, le brin transcrit est ainsi réparé plus vite que l'autre ^(148, 152, 153).

Certaines protéines de NER telles que XPC/HR23B et UV-DDB ne participent qu'à GGR ⁽¹⁵⁴⁾, alors que d'autres comme CSA et CSB sont spécifiques de TCR ⁽¹⁵⁵⁾. XPA est, au contraire, nécessaire aux 2 sous-systèmes ⁽¹⁵⁶⁾ (cf. fig. 24).

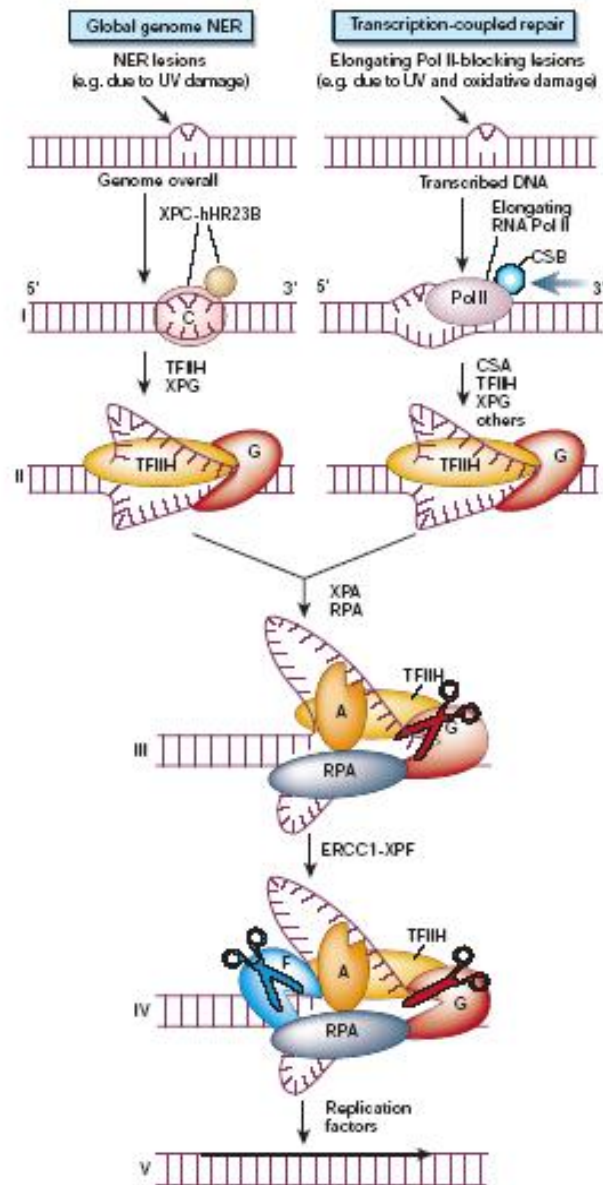


Figure 24 Les 2 voies de NER

D'après Hoeijmakers *et al.* 2001 ⁽¹²⁵⁾

On peut juger de l'importance de ce système par l'existence des syndromes sévères associés à l'absence de certains de ses composants. Les mutations affectant la fonction de réparation donneront naissance au *xeroderma pigmentosum* (XP), celles affectant la fonction de transcription, au syndrome de Cockaine (CS) et celles induisant un problème de stabilité du complexe protéique TFIIH, à la trichothiodystrophie (TTD) ⁽¹²⁵⁾.

Le *xeroderma pigmentosum* (XP) est une photodermatose à hérédité autosomale récessive qui se traduit par une sensibilité exacerbée aux UV. Elle est aussi la cause d'une haute fréquence de cancers de la peau. Les gènes mutés dans cette pathologie sont impliqués dans les mécanismes précoces de NER ⁽¹⁴⁷⁾ : XPA à XPG ⁽¹⁴⁷⁾.



Figure 25 Enfant atteint de Xeroderma Pigmentosum

Photo extraite du site internet : www.tidsskriftet.no

Les mutations des gènes du TCR, CSA (ERCC8) et CSB (ERCC6), sont quant à elles responsables du syndrome de Cockayne (CS), du nom du médecin qui l'a étudié (Edward Alfred Cockayne - 1880–1956). Les personnes atteintes ont également une sensibilité particulière à la lumière, ainsi qu'une petite taille et une apparence de vieillissement précoce. Dans la forme A, les symptômes n'apparaissent qu'aux environs de la première année de vie, alors qu'ils sont visibles dès la naissance dans la forme B. Contrairement au XP, le CS n'est pas associé à des pathologies cancéreuses.

Le troisième syndrome associé à NER est la trichothiodystrophie (TTD), qui découle de la mutation d'au moins 2 gènes : *ercc2* et *ercc3* qui encodent les 2 unités de l'hélicase TFIIH. Les patients atteints se caractérisent par une photosensibilité, des retards mentaux et physiques, une peau écaillée ainsi que des cheveux et des ongles cassants ⁽¹⁵⁷⁾. Tout comme dans le CS, aucun cancer n'est associé à ce syndrome ⁽¹⁵⁸⁾.



Figure 26 Enfant atteint de trichothiodystrophie

D'après Vermeulen et al. 2001 ⁽¹⁵⁹⁾

Les symptômes observés dans la TTD sont le fait de l'implication de TFIIH, non seulement dans les mécanismes précoces de NER, mais également dans l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II ⁽¹⁶⁰⁾ (cf.fig 27)

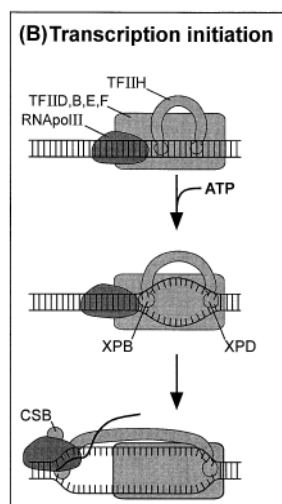


Figure 27 Initiation de la transcription
D'après De Boer *et al.* 2000 ⁽¹⁴⁶⁾

Les KO des gènes de NER peuvent être létaux au stade embryonnaire (*xab2*), de même qu'avant l'implantation (*xpd/ercc2*). Pour certains gènes comme *ercc1*, le décès de l'animal intervient avant le sevrage, avec des anomalies hépatiques et des expressions augmentées de p53 au niveau des reins, du foie et du cerveau ^(139, 161). Des sensibilités particulières aux agents endommageant l'ADN ont également été décrites ⁽¹⁶²⁾.

Dans la plupart des cas, les cellules des souris KO sont particulièrement sensibles aux UV. Quant à l'animal entier, la sensibilité, lorsqu'elle existe, peut aller jusqu'au développement de cancers de la peau (*xpa*, *xpc*, *xpe*, *csa*, *csb*) ⁽¹³⁹⁾.

Certains gènes du système NER ont de plus des rôles dans la cancérisation et la chimio-résistance. Par exemple, le gène *ercc1* est impliqué de manière universelle dans la cancérisation et la chimio-sensibilité. Il répare les adduits causés *in vitro* par le cisplatine ^(145, 163) et la réduction de son expression augmente la cytotoxicité de cette drogue dans des lignées de cancer ovariens ⁽¹⁶⁴⁾. Plus récemment, Chang *et al.* ⁽¹⁶⁵⁾ ont démontré l'implication de ce gène dans la résistance aux drogues des cellules en culture. L'expression ou le polymorphisme de *ercc1* a été corrélé avec le pronostic de divers cancers ^(166, 167): le gliome ⁽¹⁶⁸⁾, celui de l'estomac ⁽¹⁶⁹⁾, de l'ovaire ⁽¹⁷⁰⁾ et du poumon ⁽¹⁷¹⁾.

L'expression de *ercc2* est également corrélée avec la résistance aux composés alkylants dans de nombreuses lignées cellulaires ^(172, 173), y compris les lignées cellulaires issues de gliomes ⁽¹⁷⁴⁾. Bien que l'expression de *ercc2* n'ait pu clairement être reliée à l'efficacité de la fonction de réparation de NER ⁽¹⁷³⁾, sa sur-expression dans les cellules de gliomes augmente la réparation de l'ADN ⁽¹⁷⁵⁾.

- MMR : *Mismatch Repair*

MMR corrige les erreurs occasionnelles de réplication ainsi que les paires hétérologues formées lors de la recombinaison ⁽¹³⁸⁾ (cf.fig.28). Les produits des gènes MSH reconnaissent les mésappariements. Certaines de ces protéines sont spécialisées dans la détection de certains types de mésappariements et dans certains mécanismes cellulaires (méiose : MSH 4 et 5). D'autre part, des homologues de MutL (PMS2L3 et 4, MLH1 et 3...), protéine bactérienne responsable de l'identification des mésappariements, ont des fonctions qui restent encore à déterminer.

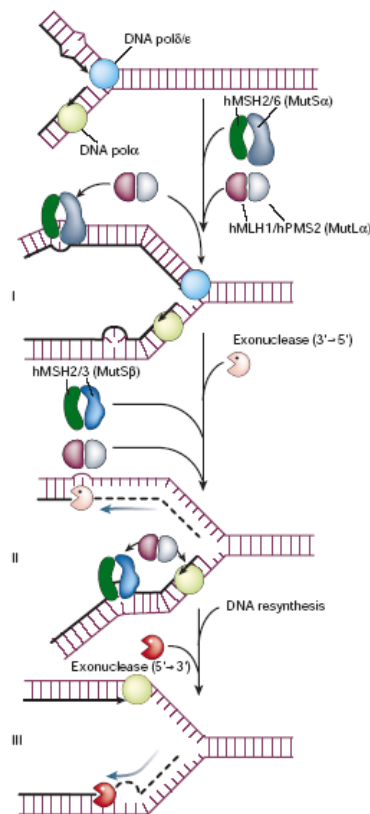


Figure 28 Mécanismes de réparation de l'ADN par MMR

D'après Hoeijmakers *et al.* 2001 ⁽¹²⁵⁾

-Les cassures double-brin :

Les cassures double-brin (CDB) peuvent conduire à une instabilité chromosomique et peuvent être létales si elles ne sont pas réparées. Elles sont à l'origine d'arrêts du cycle cellulaire et de réarrangements chromosomiques, sources de cancers ^(176, 177). Les CDB sont réparées soit par Recombinaison Homologue (HR) de l'ADN, soit par liaison d'extrémités sans homologie (NHEJ) suivant la phase du cycle dans laquelle se trouve la cellule.

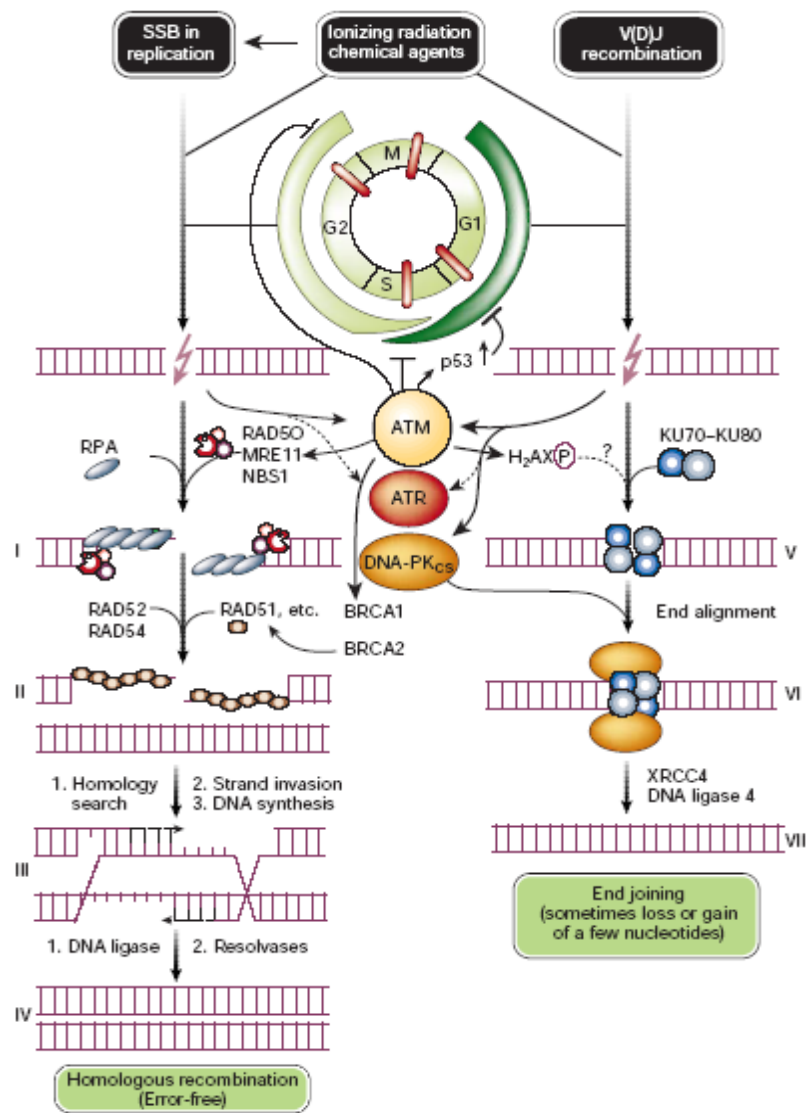


Figure 29 Mécanismes de réparation des cassures double-brin
D'après Hoeijmakers *et al.* 2001 ⁽¹²⁵⁾

HR : Homologous Recombination

La recombinaison homologue répare les cassures simple- et double-brin formées principalement par les radiations ionisantes en se servant de la chromatide sœur ou du chromosome homologue comme matrice. Elle rétablit également la synthèse d'ADN lors de blocage de la fourche de réplication. Elle peut néanmoins être responsable de réarrangements chromosomiques néfastes pour les cellules.

Le complexe RAD50/MRE11/NBS1 expose les 2 extrémités 3' pour favoriser l'invasion du brin dans le brin homologue. RPA, et RAD52 facilitent l'assemblage d'un filament de RAD51 qui inclut d'autres protéines telles que XRCC2 et 3, ainsi que RAD51B, C et D. RAD51 a la capacité d'échanger un simple brin contre la même séquence d'un autre double-brin.

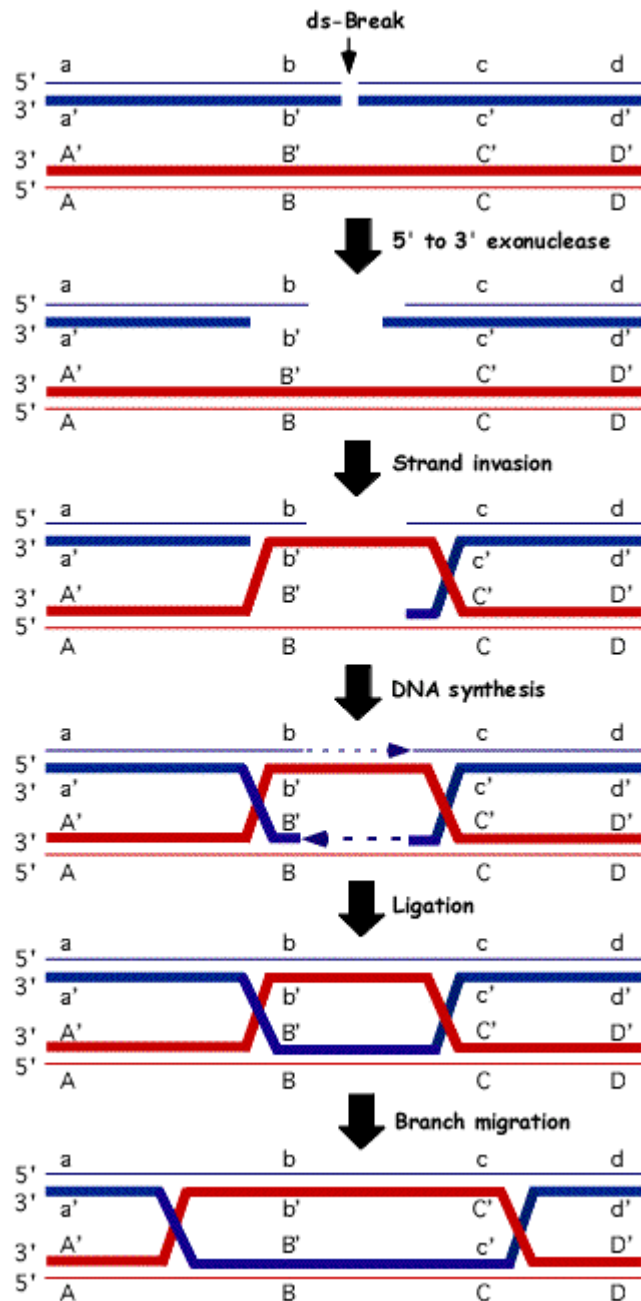


Figure 30 Mécanisme de réparation des cassures double-brin de l'ADN par recombinaison homologue

NHEJ : Non Homologous End Joining

La liaison d'extrémités sans homologie est le principal mécanisme de réparation des CDB, contrairement à ce qui a longtemps été cru ⁽¹⁷⁸⁾. A l'inverse du précédent, ce système n'utilise pas de brin homologue. Il joint entre eux 2 brins par micro-homologie, utilisant les bouts cohésifs qui sont fréquemment présents à leurs extrémités. Il n'y a, de cette façon, que de rares pertes de nucléotides. Par contre, NHEJ est un système générateur d'erreurs, car il permet la liaison aberrante de portions de chromosomes différents, générant ainsi des translocations à l'origine de cancers. Les plus connues sont les translocations t(8;14) et t(14;18) induisant le Lymphome de Burkitt et la translocation t(9;22)(q34;q11), ou Chromosome Philadelphia, générant la leucémie myéloïde chronique (CML).

L'hétérodimère Ku, composé de Ku70 et Ku80, se lie aux extrémités d'ADN et recrute la DNA-PKcs, créant ainsi une synapse. La DNA Ligase IV (Lig4), son co-facteur XRCC4, l'ADN polymérase β ⁽¹⁷⁹⁾, ainsi qu'Artemis, une endonucléase, s'assemblent au niveau du complexe synaptique. L'entrée du simple brin dans les cavités de la DNA-PKcs active la kinase qui va phosphoryler Artemis, déclenchant son activité endonucléasique. DNA-PKcs s'autophosphoryle et s'écarte de l'extrémité de l'ADN, libérant l'accès pour le complexe Lig4/XRCC4. Si les brins sont compatibles, la ligature s'effectue immédiatement, sinon, la polymérase et la nucléase synthétisent les parties manquantes. Dès que les brins forment un substrat compatible, la ligature est réalisée ⁽¹⁸⁰⁾.

Hormis son rôle dans la réparation, NHEJ joue également un rôle critique dans les réarrangements V(D)J des gènes des immunoglobulines des récepteurs des lymphocytes B et T, à l'origine de leur diversité ⁽¹⁸¹⁾.

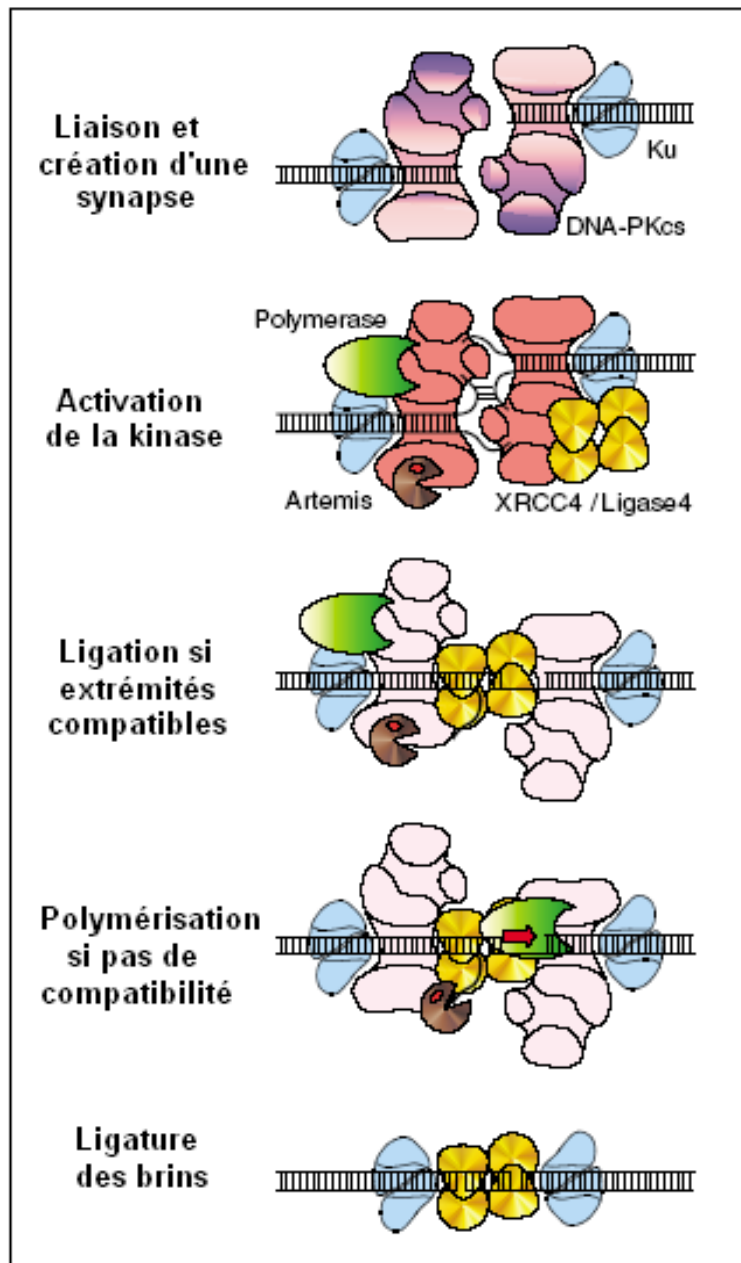


Figure 31 Mécanismes de réparation des cassures double-brin de l'ADN par recombinaison non homologue

D'après Budman *et al.* 2005 ⁽¹⁸⁰⁾

Hypothèse

L'objectif ultime de notre travail était de développer une stratégie de chimio-sensibilisation des approches chimiothérapeutiques conventionnelles qui améliorerait la prise en charge médicale des gliomes, et en particulier des GBM, par une amélioration de l'efficacité de la chimiothérapie. Pour cela il fallait trouver un moyen de lutter contre la résistance de ces entités cancéreuses.

Dans le chapitre II, nous avons vu que parmi les gliomes existent des entités remarquablement sensibles à la chimiothérapie : les oligodendrogliomes. Ces tumeurs se distinguent d'un point de vue cytogénétique par une perte d'hétérozygotie (LOH) des bras chromosomiques 1p et 19q, perte qui a pu être corrélée à cette chimio-sensibilité. Ceci suggérait que les gènes présents au niveau de ces régions dans les autres tumeurs pouvaient être responsables de leur résistance. Il paraissait alors possible de créer une certaine sensibilité en mimant la LOH par l'inhibition d'expression de ces gènes de résistance. Bien sûr, ces régions comportant plus de 1 700 gènes, il n'était pas concevable, ni indispensable, de les inactiver tous, d'autant plus que tous ne sont pas impliqués.

Nous avons également vu que les mécanismes de réparation de l'ADN jouent un rôle prépondérant dans la correction des dommages engendrés par les drogues de chimiothérapie, empêchant ainsi les cellules traitées d'entrer en apoptose, et ainsi de disparaître. Ces mécanismes nous ont particulièrement intéressés car la majorité des traitements actuels sont basés sur l'endommagement de l'ADN. Ainsi en diminuant la fonction de réparation de l'ADN, il semblait possible d'augmenter l'effet de la chimiothérapie.

Il existe, dans le génome, plus d'une centaine de gènes dont le produit est impliqué dans la fonction de réparation, et il semblait alors difficile d'altérer l'ensemble de leur expression.

Nous avons ainsi croisé ces 2 axes de recherche pour nous concentrer sur les gènes de réparation situés dans les régions 1p-19q, et trouvé ainsi une dizaine de gènes candidats.

Afin de déterminer lesquels parmi ceux-ci étaient effectivement impliqués dans la chimio-résistance des glioblastomes, nous avons réalisé un criblage des gènes candidats. Pour cela nous avons mis au point un test de chimio-sensibilité *in vitro* dans lequel nous avons inhibé leur expression dans des cellules d'astrocytomes avec des siRNA, petits ARN double-brins déclenchant le mécanisme d'interférence ARN. Nous avons sélectionné les siRNA qui augmentaient la sensibilité des cellules à la chimiothérapie.

Les résultats de ce criblage ont été étayés par des expériences de validation complémentaires, sur d'autres lignées et avec une autre drogue de chimiothérapie. Les siRNA dont l'intérêt a été confirmé, ont été utilisés dans le cadre d'une étude préclinique réalisée sur des souris *nude* porteuses de tumeurs gliales.

Le ou les siRNA qui démontreront un intérêt thérapeutique feront l'objet d'essais cliniques.

III. OUTILS

Interférence ARN (siRNA et miRNA) : de l'étude fondamentale à la clinique

L'interférence ARN est l'inhibition de l'expression des gènes par des ARN. Ce mécanisme biologique est un processus antiviral naturel ⁽¹⁸²⁾. Il est alors déclenché par la présence de grands ARN double-brin (dsRNA) étrangers à la cellule, rapidement découpés en petits duplexes d'ARN de 21 à 28 paires de bases appelés siRNA (small interfering RNA), qui ciblent les ARN simples brins de séquence complémentaire, issus du pathogène.

Il existe d'autres ARN interférents, endogènes cette fois-ci, les microARN (miRNA) qui participent à la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes en bloquant la traduction, ou en dégradant l'ARN cible.

Mécanismes d'action

Le mécanisme d'ARN interférence a été découvert par hasard chez les plantes en 1990 ⁽¹⁸³⁾ où il est plus connu sous le nom d'inhibition génique post-transcriptionnel (appelé post-transcriptional gene silencing par les anglo-saxons). Ce processus est conservé au cours de l'évolution et il a ainsi été redécouvert chez le nématode *Caenorhabditis elegans* 8 ans plus tard ⁽¹⁸⁴⁾. Il a ensuite été rapidement utilisé comme outil d'inhibition génique dans les cellules en culture puis chez les organismes entiers : insectes (drosophile ⁽¹⁸⁵⁾) ainsi que chez les vertébrés (poisson zèbre ⁽¹⁸⁶⁾, le xénope ⁽¹⁸⁷⁾ et finalement chez la souris ⁽¹⁸⁸⁾).

Les dsRNA ont une origine virale. Ils peuvent néanmoins être générés suite à l'hybridation de transcrits chevauchants causés par des séquences répétées ou des transposons. Lorsque les dsRNA sont introduits dans des cellules de plantes, de nématodes ou d'insectes, ils déclenchent un mécanisme de défense anti-viral qui commence par la coupure, effectuée par une RNase de type III du nom de Dicer, de ces grands fragments en plus petits, d'une vingtaine de paires de bases avec des extrémités 3' cohésives : les siRNA.

Chez les mammifères, la réponse anti-virale est plus complexe, comprenant notamment la production d'interféron et l'activation de la voie PKR (dsRNA-dependent protein kinase). Ces autres mécanismes masquent l'interférence ARN ⁽¹⁸⁹⁾. L'introduction de dsRNA active en effet la PKR qui phosphoryle eIF2 α , ce qui diminue dramatiquement le taux de traduction et conduit la cellule à l'apoptose ^(190, 191).

Ce mécanisme a rapidement été utilisé à des fins expérimentales pour inhiber spécifiquement l'expression d'un gène en introduisant tout d'abord des dsRNA. Ces applications se sont confrontées, dans les cellules de mammifères, aux réponses interféron et PKR. Il est toutefois possible de court-circuiter cette étape en introduisant directement des siRNA synthétiques ^(189, 192) ou produits enzymatiquement ⁽¹⁹³⁾, ou alors des shRNA (short hairpin RNA) ⁽¹⁹⁴⁻¹⁹⁶⁾.

• *Les siRNA et shRNA*

Les siRNA sont, comme expliqué précédemment, de petits ARN double-brins produits naturellement par le clivage enzymatique des longs dsRNA par Dicer. Ces duplexes sont ensuite séparés par l'hélicase Armitage et la protéine R2D2. Chacun des brins est ensuite séparément pris en charge par le complexe protéique RISC. Le complexe comprenant le brin anti-sens va reconnaître l'ARNm cible et le cliver, empêchant ainsi sa traduction en protéine ⁽¹⁹⁷⁾ (cf.fig.32). L'expression du gène dont la séquence est complémentaire du siRNA est ainsi diminuée.

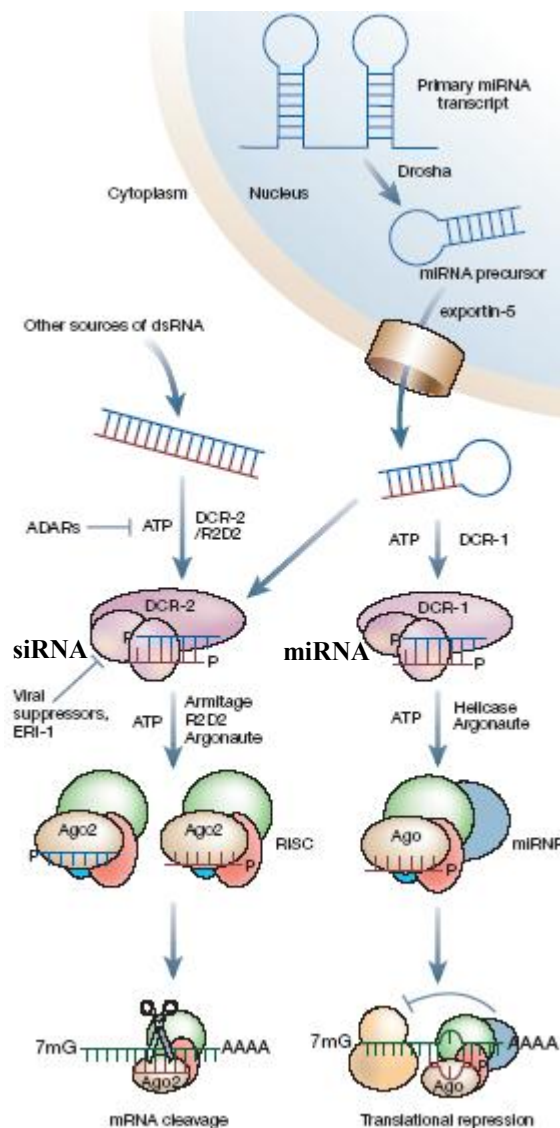


Figure 32 Mécanismes de production et d'action des siRNA et shRNA

D'après Meister et Tuschl, Nature 2004 ⁽¹⁹⁷⁾

Les siRNA peuvent également être synthétisés dans le but d'inhiber spécifiquement l'expression de certains gènes. Si le siRNA n'est pas présent dans les bases de données disponibles ⁽¹⁹⁸⁻²⁰⁰⁾ ou chez les fournisseurs commerciaux comme Ambion, Qiagen, ou Dharmacon, il est recommandé de dessiner de 3 à 5 siRNA par cible, afin d'être sûr d'en avoir au moins un d'efficace. En effet, le choix de la séquence n'est pas trivial et déterminera le degré d'efficacité du siRNA, si efficace il y a. Des algorithmes ont été élaborés à partir d'une quantité croissante d'informations sur les siRNA efficaces ou non. Le design des siRNA doit ainsi obéir à certaines règles que Pei et Tuschl énumèrent dans une publication récente ⁽²⁰¹⁾. De façon globale, le siRNA idéal doit posséder des extrémités 3' cohésives différentes, commencer par une uridine ou une adénine, et contenir un taux de G-C compris entre 30 et 52 %. Il vaut également mieux qu'il ne cible pas les régions des ARNm impliquées dans les liaisons avec des protéines comme les complexes des jonctions exon-exon. D'autre part, le siRNA sera plus efficace s'il contient des séquences palindromiques qui lui confèrent une structure secondaire, ce dont la plupart des algorithmes ne tiennent pas compte, hormis quelques uns ⁽²⁰²⁻²⁰⁴⁾. Tout cela nécessite bien sûr d'avoir une séquence parfaitement annotée de l'ARNm ciblé, et en particulier de connaître ses différents variants et épissages alternatifs.

Même si le siRNA est optimisé, son effet ne perdurera pas au-delà de quelques jours. En effet, les siRNA se diluent au cours du temps dans les cellules du fait de la division cellulaire, rendant leur effet transitoire, de 3 à 5 jours ⁽²⁰⁵⁾. Un certain nombre de fonctions peuvent être analysées dans ces conditions, mais d'autres comme la différenciation cellulaire nécessitent que le *knock down* soit prolongé. Ceci implique la répétition de la transfection, ce qui est difficile à réaliser la plupart du temps. Une solution a été trouvée qui consiste en l'utilisation de plasmides produisant en continu les short-hairpin RNA (shRNA), en forme d'épingle à cheveux ⁽¹⁹⁶⁾. Il est par contre difficile d'estimer la quantité de shRNA effectivement produite, ce qui peut conduire à une toxicité liée à la saturation de l'exportine 5, protéine de la membrane nucléaire, responsable de l'export des duplexes (shRNA ou miRNA) du noyau vers le cytoplasme ⁽²⁰⁶⁾.

- *Les miRNA :*

Ces duplexes sont le résultat de la coupure de dsRNA endogènes, produits par le repliement en épingle à cheveux de transcrits contenant des séquences inversées répétées de 20 à 50 pb. Les miRNA sont responsables d'une répression traductionnelle et régulent finement l'expression des ARNm complémentaires impliqués dans le développement, la mort et la prolifération cellulaires, l'hématopoïèse... ⁽²⁰⁷⁾

Le mécanisme d'action des miRNA est proche de celui des siRNA. La principale différence réside dans leur origine. Les miRNA sont produits de façon endogène en long transcrits primaires (pri-miRNA) puis découpés en épingles à cheveux d'environ 70 nucléotides appelés miRNA précurseurs (pré-miRNA). Dicer les clive ensuite en duplexes de 22 nucléotides avec des extrémités cohésives de 1 à 4 nucléotides ^(208, 209). Contrairement aux siRNA, la complémentarité des miRNA et de leur cible n'a pas besoin d'être parfaite. Si elle l'est, les ARNm sont dégradés comme avec les siRNA, dans le cas contraire, les miRNA bloquent la traduction. L'inconvénient majeur de ces duplexes est leur non spécificité, puisqu'ils ciblent plusieurs gènes à la fois, ce qui rend leur effet complexe et par conséquent leur utilisation difficile. Néanmoins, si un même miRNA cible tout un ensemble de gènes impliqués dans une même fonction délétère, cela pourrait procurer un avantage dans le cadre d'une thérapie.

Utilisation de l'interférence ARN

L'interférence ARN est actuellement l'outil d'inhibition de l'expression génique le plus efficace et le plus spécifique, d'où son intérêt en recherches fondamentale ou appliquée. Son intérêt a, par ailleurs, été souligné par l'attribution du prix Nobel de médecine 2006 à ses découvreurs chez *Caenorhabditis elegans*, Andrew Fire et Craig Mello.

• *L'interférence ARN en recherche fondamentale*

Les ARN interférents sont, avant tout, un puissant outil dans la recherche fondamentale. Un grand nombre de cibles avaient déjà été identifiées *in vitro* et *in vivo* pour de nombreuses pathologies. La plupart d'entre elles n'ont encore pu être transférées sur le terrain clinique, essentiellement en raison d'un défaut d'outil thérapeutique adéquat. Or, les siRNA ont fait la preuve de leur grande efficacité et leur utilisation thérapeutique a très vite été évoquée. En effet, de nombreux travaux *in vitro* ont fait naître l'ambition d'une utilisation thérapeutique de ces siRNA ou shRNA, dans un premier temps contre l'infection du virus HIV. Et si les ARN interférents s'avèrent un outil thérapeutique efficace et sûr, ils seront à l'origine d'une véritable révolution en constituant un nouveau volet de la thérapie génique. Les maladies virales ont été les premières à être étudiées parce que l'administration des siRNA par voie systémique pouvait aisément être mise en place et que le ciblage des gènes viraux, et donc non humains, limitait les risques de toxicité. Dès 2002, Lee *et al.* ⁽²¹⁰⁾, ont ainsi réduit de plus de 4 fois l'expression de gènes viraux dans une lignée humaine d'épithélium rénal avec une construction génique produisant des siRNA sous le contrôle du promoteur Pol III.

L'année suivante, Novina *et al.* ⁽²¹¹⁾ sont parvenus à diminuer l'entrée et la réplication du virus dans des cellules T humaines à l'aide de siRNA dirigés contre le récepteur CD4 et une protéine de la capsid, p24.

• *L'interférence ARN dans les criblages*

Dans un contexte post génomique, l'interférence ARN permet de plus de mettre à jour la fonction de nouvelles protéines dont la séquence génique était jusqu'alors la seule donnée connue (pour revue voir Ueda ; J.Neurogenet ; 2001 ⁽²¹²⁾). Cette technique permet de plus de disséquer les voies métaboliques. L'équipe de Wu a par exemple déterminé une fonction anti-apoptotique pour un marqueur d'adénocarcinome du sein ⁽²¹³⁾. Les protéines dont les fonctions sont ainsi déterminées, peuvent suggérer de nouvelles approches thérapeutiques.

En ciblant un grand nombre de gènes, il est possible d'identifier les gènes impliqués dans un mécanisme. Ainsi, Hanazawa *et al.* ont mis à jour divers gènes responsables du développement des lignées germinales chez *C. elegans* ⁽²¹⁴⁾.

Si la méthode de criblage rend possible l'amélioration de la connaissance fondamentale des mécanismes, elle peut également se mettre au service de la thérapie, puisqu'elle permet de déterminer quels gènes sont impliqués dans les pathologies et ainsi de définir de nouvelles cibles.

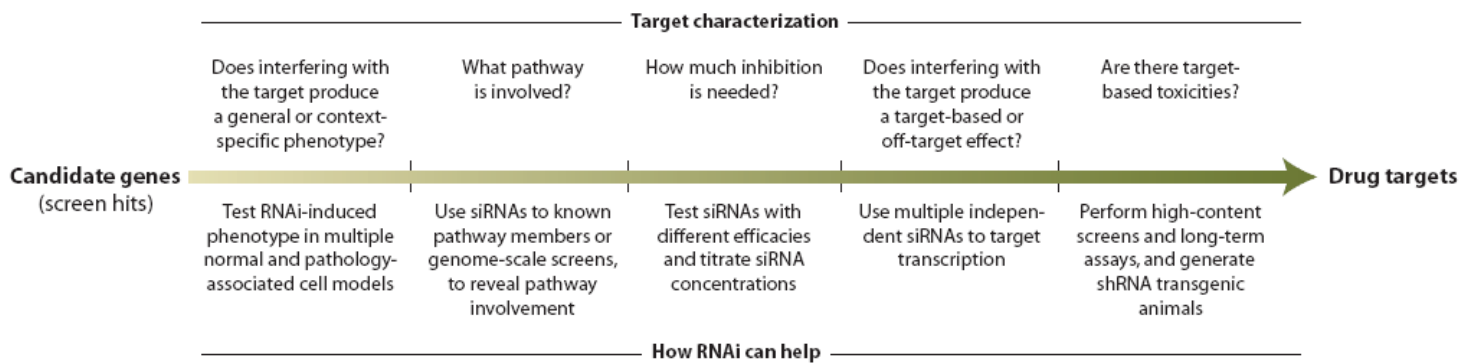


Figure 33 Utilisation de l'ARN interférence dans les méthodes de criblage

D'après Bartz *et al.*, Science STKE, 2005 ⁽²¹⁵⁾

Les cribles fonctionnels requièrent une méthode pour modifier (augmenter ou diminuer) la fonction associée à un gène et l'analyse de sa répercussion sur une fonction, généralement au niveau cellulaire (cf.fig.33). Les cribles les plus fréquents s'adressent à des fonctions aisément observables et quantifiables telles que la prolifération ou l'apoptose. Des fonctions plus complexes sont analysables par le biais des études à haut contenu qui cumulent un grand nombre de paramètres, notamment phénotypiques, accessibles par l'analyse d'images. Ces

dernières analyses techniquement élaborées et difficilement reproductibles sont lourdes et s'avèrent peu compatibles avec de hauts débits.

Le séquençage de différents génomes (homme, souris, rat, levures) autorise désormais une approche pan-génomique des screenings fonctionnels. Il est toutefois nécessaire pour cela de disposer d'outils suffisamment souples pour s'adapter à chaque cible. Ce ciblage spécifique et volontaire de chaque cible n'est à l'heure actuelle possible qu'au niveau de l'ARN. Et les siRNA s'imposent alors comme les outils les plus efficaces. Il est en théorie possible d'en dessiner contre chaque séquence d'intérêt, spécifique du produit d'un gène, des différentes isoformes ou de variants particuliers porteurs d'une mutation ponctuelle ⁽²⁰¹⁾.

Des screenings fonctionnels basés sur l'interférence ARN (utilisant des dsRNA), avec des débits modérés ont d'abord été réalisés sur *C. elegans* (pour revue, voir Sachse, Meth Enz, 2005 ⁽²¹⁶⁾). Ces études ont ensuite été appliquées chez les mammifères. Le séquençage complet des génomes humain et murin a débouché sur une très importante quantité d'informations de séquences. Parmi celles-ci plusieurs milliers de nouvelles séquences codantes. Pour la plupart de ces gènes, les informations de fonction concernant les protéines correspondantes demeurent inconnues.

Les techniques à haut débit maîtrisées jusqu'alors sont les DNA-arrays, essentiellement descriptives, qui permettent l'analyse de l'expression au niveau ARNm jusqu'à une échelle pangénomique, voire au-delà (incluant les différents variants et isoformes), ce qui permet l'étude des variants de transcription.

Toutefois, ces analyses ne permettent pas d'estimer l'expression des protéines qui seules soutiennent la fonction. Les modifications post-traductionnelles (acétylations, glycosylations, phosphorylations ou clivages) préviennent une estimation à partir de ces données de la quantité de protéines correspondant à un gène, et plus encore de la fonction associée.

Des approches à haut débit de l'analyse fonctionnelle des protéines sont requises pour obtenir ces informations, ce qui a nécessité le développement de nouveaux outils. La découverte des siRNA a très vite permis ces développements.

Les premières publications qui ont démontré que l'emploi des siRNA est compatible avec une analyse haut débit sub-génomique sont apparues en 2003. Aza-Blanc *et al.* (2003) ont étudié l'impact de 380 kinases et 130 autres protéines (dont 100 non annotées précédemment) sur l'apoptose de cellules Hela induite par TRAIL ⁽²¹⁷⁾. Ce travail a permis de retrouver des régulateurs déjà connus de cette voie pro-apoptotique et d'en découvrir de nouveaux, comme

DOBI et MIRSA. En 2004, Kittler *et al.* ont criblé 5305 gènes pour rechercher ceux impliqués dans la régulation de la division cellulaire. Seuls 37 gènes furent finalement retenus ⁽²¹⁸⁾. Enfin en 2005, MacKeigan *et al.* analysèrent l'impact de 650 kinases avérées ou putatives et de 222 phosphatases sur la survie de cellules Hela. L'analyse fut étendue avec l'addition de 3 drogues de chimiothérapie : taxol, étoposide et cisplatine. Le knock down de plusieurs kinases et phosphatases augmente effectivement l'efficacité des drogues de chimiothérapie ⁽²¹⁹⁾.

Ces trois publications ont deux importants points communs : la fonction analysée est la survie (ou l'apoptose) et surtout la démarche des auteurs était de réaliser le criblage fonctionnel avec une librairie importante de siRNA qui n'avaient pas été vérifiés préalablement. Il était donc impossible *a priori* de connaître leur efficacité de façon individuelle. Les auteurs se sont basés sur les pourcentages moyens rapportés par le fournisseur ou évalués sur une petite cohorte supposée représentative.

Cette incapacité à garantir l'efficacité des siRNA dès leur design a fait apparaître en parallèle des cribles fonctionnels d'autres cribles haut débits destinés à identifier les siRNA effectivement efficaces ^(220, 221).

Dans tous les cas, les siRNA candidats retenus au cours du criblage haut débit ont été de nouveau étudiés pour confirmer les résultats et les étayer par la démonstration de leur efficacité notamment par qRT-PCR.

L'utilisation des bibliothèques de siRNA validées optimise le screening, mais ceci ne dispense pas que les résultats doivent être confirmés par la diminution au niveau de l'ARN ou de la protéine. Et ces étapes ne peuvent être réalisées à l'heure actuelle à l'échelle pan-génomique de façon systématique.

Enfin, il est évident que les criblages sont tributaires des niveaux d'expression de chaque cible (gène, isoforme, variant autre). L'absence d'expression d'une cible enlève d'emblée tout intérêt de la question posée dans le modèle cellulaire en question. En d'autres termes, à l'analyse pan-génomique envisagée il faut ajouter le masque très restrictif du profil d'expression du génome dans les cellules utilisées.

- *Interférence ARN et cancérologie*

- * *In vitro* :

- Les cancers sont des pathologies résultant de modifications d'expression génique, soit de surexpression d'oncogènes, soit d'inhibition d'anti-oncogènes. Des stratégies anti-sens

pourraient constituer une part de la prise en charge thérapeutique. Avec cet outil, il est ainsi devenu possible d'inhiber l'expression de gènes impliqués dans divers cancers (pour revue voir Brummelkamp ; Cancer Cell, 2002 ⁽²²²⁾) d'autant plus que le mécanisme d'ARN interférence est préservé dans les lignées tumorales ⁽²²³⁾. Les auteurs ont ici transfecté des lignées cellulaires issues de cancers cervical, pulmonaire, hépatique, ovarien et de mélanomes avec des siRNA, complexés à des lipides cationiques, dirigés contre des cibles classiques telles que bcl2, cdk2 et mdm2, et ont ainsi inhibé leur prolifération. D'autres études plus spécifiques à une pathologie donnée ont montré qu'il était possible d'altérer le comportement tumoral global. L'inhibition de k-ras muté dans des cellules issues d'adénocarcinomes pancréatiques diminue à la fois la prolifération ainsi que le potentiel migratoire et angiogénique ⁽²²⁴⁾. De même, une stratégie anti-sens peut induire l'apoptose, en ciblant bax-inhibitor1 dans des cellules de carcinome prostatique ⁽²²⁵⁾ ou la protéine oncogène virale E6 dans des cellules cervicales tumorales HPV positives ⁽²²⁶⁾.

L'utilisation de siRNA dans de telles cellules a permis également de diminuer leur chimio-résistance *in vitro*. Ainsi, toujours dans le cadre du cancer cervical, l'inhibition d'expression des protéines oncogènes virales E6 et E7, réactive la voie de p53 et augmente ainsi la chimio-sensibilité d'un facteur 4 ⁽²²⁷⁾. De même, dans des cellules issues de cancers ovarien et utérin, avec le ciblage de AAG, une glycosylase impliquée dans la réparation des adduits des alkylants.

**In vivo :*

Les si- et shRNA ayant fait la preuve de leur efficacité *in vitro*, leur utilisation thérapeutique a très vite été envisagée, ce qui nécessitait de passer dans un premier temps par l'étape de l'expérimentation animale.

Après son utilisation intensive chez le vers nématode, l'interférence ARN *in vivo* a part ailleurs été menée avec succès chez les mammifères : de la souris en 2002, en passant par le rat en 2005, jusque chez les primates non-humains en 2006. Des siRNA anti-luciférase ou dirigés contre une séquence codant pour une protéine de l'hépatite C ont été utilisés chez la souris ⁽²²⁸⁾, d'autres ciblant AAV-2 dans le ganglion rétinien du rat ⁽²²⁹⁾ ou encore, en systémique, associés à des lysosomes, contre ApoB chez le singe ⁽²³⁰⁾.

Et dans le cadre plus particulier du cancer, une étude chez la souris *nude*, a également montré qu'il serait possible d'améliorer le traitement clinique de référence du cancer ovarien, le Paclitaxel, en utilisant des siRNA dirigés contre la protéine oncogène EphA2, comme traitement adjuvant ⁽²³¹⁾.

Les siRNA sont par conséquent un outil efficace, tant pour définir des cibles potentielles *in vitro* par le biais de criblages, que pour les inhiber *in vivo* et ainsi être transposées sur le terrain clinique.

• *Essais cliniques*

En novembre 2004, le premier test clinique a ainsi été lancé à Cleveland, Ohio, sur des patients atteints de dégénérescence de la macula liée à l'âge (AMD) ^(232, 233). Des siRNA ciblant le VEGF (essai clinique : NCT00259753), ou son récepteur VEGFR1 (essai clinique : NCT00363714), ont été injectés directement en intra-oculaire (substance vitrée) et aucun effet toxique n'est pour l'instant à déplorer. Depuis, un grand nombre d'essais cliniques, à différents stades, ont été lancés dans la lutte contre diverses autres affections et notamment, virales (HIV, Hépatites B et C, RSV) et cancéreuses (hépatiques...) ⁽²³⁴⁾ (cf. tableau 1).

Disease	Stage	RNAi reagent	Delivery	Company/institution
<i>Ocular diseases</i>				
AMD	Preclinical stage	siRNA	Direct intravitreal injection	Quark Biotech
	Clinical trial phase I	siRNA	Direct intravitreal injection	Sirna
	Clinical trial phase II	siRNA	Direct intravitreal injection	Acuity
<i>Viral infections</i>				
Hepatitis B and C	Preclinical stage	shRNA	Liganded nanoparticle	Nucleonics/Intradigm
RSV	Clinical trial phase I	siRNA	Aerosol	Alnylam
HIV	Clinical trial phase I (scheduled for 2007)	shRNA	Lentivirus	Benitec/City of Hope
<i>Cancer</i>				
Hepatic cancer	Preclinical stage	siRNA	Liganded nanoparticle	Calando
Solid tumour cancers	Preclinical stage	siRNA	Liganded nanoparticle	Intradigm
<i>Other disease types</i>				
ALS	Preclinical stage	siRNA	N/A	CytRx
Inflammatory diseases	Preclinical stage	siRNA	Peptide	Nastech

Tableau 1 Essais cliniques utilisant l'interférence ARN

D'après Kim *et al.* 2007 ⁽²³⁴⁾

L'utilisation de l'interférence ARN se heurte malgré tout à deux principales difficultés : leur toxicité et leur administration. En effet, les siRNA peuvent provoquer une toxicité résultant de la production d'interférons ^(235, 236), qui serait dépendante de la séquence, de la quantité ainsi que du mode de délivrance ⁽²³⁷⁾. Pourtant, si elle est détectée *in vitro*, elle n'a pas été confirmée *in vivo* ^(206, 237). Alors qu'aucune production d'interférons n'a été constatée, la production non contrôlée de la quantité de shRNA a été responsable de la mort de souris,

suggérant une toxicité induite par de grandes quantités de ces entités moléculaires. Grimm *et al.* ont en effet observé une toxicité principalement hépatique, accompagnée d'une perte de poids, responsable du décès des animaux après environ un mois d'expression de shRNA, que ceux-ci aient une cible endogène (hAAT), ou non (luciférase). Cette toxicité serait due à une saturation de la machinerie des shRNA/miRNA. Il est quand même à noter, que la toxicité est d'autant plus grande que le shRNA est long, avec une absence d'effet néfaste pour les 19 mers⁽²⁰⁶⁾. Il est donc impératif de maîtriser la quantité de shRNA ou de siRNA effectivement produite ou transfectée. D'autre part, le mode d'administration est un élément non trivial de leur utilisation *in vivo* et *a fortiori* en clinique. Les problèmes rencontrés sont du même ordre que ceux rencontrés lors de la mise en place des thérapies géniques et anti-sens. Les protocoles d'administration *in vivo* sont donc dérivés de ceux utilisés pour les ARN anti-sens et les plasmides, c'est-à-dire qu'elle peut se faire avec le matériel nu ou associé à différents vecteurs tels des liposomes⁽²³⁸⁾, le PEI^(239, 240) ou d'autres agents de transfection, ou encore l'atelocollagen (fragment du collagène I)^(241, 242).

Une autre technique consiste en l'adsorption des siRNA sur des nano-particules, soit pour étudier leur bio-distribution à l'aide d'IRM⁽²⁴³⁾, soit pour cibler une tumeur, comme c'est le cas avec l'ajout de peptides RGD qui se fixent au niveau des intégrines $\alpha V\beta 3$ des vaisseaux néo-formés⁽²³⁹⁾. Même si l'injection sous haute pression ou la vectorisation (rétro)virale sont efficaces chez l'animal, leur transfert en clinique n'est pas évident, car la première n'est pas applicable à l'homme et la seconde n'est aujourd'hui pas encore au point.

L'association des siRNA à du PEI semble à l'heure actuelle la plus prometteuse⁽²⁴⁴⁾. Le PEI augmente leur stabilité *in vitro* comme *in vivo*, et par conséquent leur efficacité. Urban-Klein *et al.* ont démontré une stabilité accrue des siRNA-PEI *in vitro*, ainsi qu'une absence d'efficacité de siRNA nus anti-HER-2 à diminuer la croissance de tumeurs ovariennes implantées chez la souris, comme observée avec les mêmes siRNA associés au PEI⁽²⁴⁰⁾.

• *Interférence ARN et gliomes*

En ce qui concerne le cas particulier des gliomes, de nombreuses études précliniques ont d'ores et déjà été mises en place, ciblant en particulier des gènes impliqués dans la mobilité et l'adhérence cellulaire^(245, 246), l'apoptose^(247, 248) et le récepteur à l'EGF^(249, 250).

Les gliomes sont des tumeurs particulières, de par leur localisation et leur comportement vis-à-vis des traitements. La BHE limite en effet la diffusion des pathogènes, des toxines et par conséquent des traitements, ainsi que celle des siRNA qui sont des molécules d'environ 14 kDa et des plasmides générant les shRNA. De plus, le liquide céphalo-rachidien (LCR) est lui aussi isolé de la circulation systémique par les cellules épithéliales choroïdes. Ces barrières

doivent être franchies pour qu'une thérapie par voie systémique puisse s'appliquer aux gliomes et différentes stratégies sont utilisées à cette fin.

L'une d'entre elles est l'utilisation d'immuno-liposomes ^(238, 249) et plus récemment de nanoparticules recouvertes de siRNA ou de plasmides produisant des shRNA ⁽²⁵¹⁾. Ces dernières miment les molécules de lipoprotéines basse-densité (LDL) et interagissent ainsi avec leur récepteur, provoquant ainsi leur entrée dans l'endothélium de la BHE.

D'autre part, la résection chirurgicale des gliomes étant une étape principale de leur thérapie, la délivrance des siRNA directement dans la cavité tumorale ou à l'aide d'une pompe implantable ⁽²⁵²⁾ pourrait apporter une solution aisément applicable. Cette barrière peut être franchie par l'administration intrathécale, comme cela est par exemple déjà réalisé pour l'herceptine dans le traitement des méningites carcinomateuses. Cette méthode d'injection a d'ailleurs déjà montré son efficacité pour l'administration des siRNA ^(253, 254). Les premières études ont été effectuées avec succès sur des modèles de douleur chez le rat.

Par ailleurs, dans le cas particulier des glioblastomes, l'intégrité de la BHE étant très souvent compromise ⁽²⁵⁵⁾, l'utilisation systémique est facilitée.

MATERIELS ET METHODES

I. IN VITRO

Lignées et culture cellulaires

Les lignées cellulaires U138, U373, U87, CCF et LN229 sont issues d'astrocytomes humains et ont été fournies par l'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). La lignée cellulaire GHD a été obtenue dans notre laboratoire à partir d'un glioblastome de grade IV d'une patiente de 66 ans, localisée au niveau du carrefour temporo-parieto occipital gauche. Son statut a été confirmé par CGH (polysomie du chromosome 7, monosomie du chromosome 10).

Les expériences *in vivo* sont réalisées sur les lignées cellulaires U373 IV3, LN229 IV1 et U87 IV1. Les lignées d'origine ont été injectées en position sous-cutanée chez des souris *nude* de 1 à 3 fois chez l'animal afin d'obtenir un modèle reproductible de prise et de croissance tumorale sous-cutanée. Une fois les tumeurs développées, elles ont été extraites et remises en culture avant d'être éventuellement réinjectées chez l'animal. Le chiffre à la fin du nom indique le nombre de passages chez la souris.

Les cellules sont maintenues en culture dans du DMEM (Cambrex Biosciences, New Jersey, USA), avec 10% de sérum de veau foetal (v/v; AbCys, Paris, France) et incubées dans une atmosphère humide à 5% de CO₂ à 37°C. Elles sont passées avec de la trypsine-EDTA (BioWhittaker, Verviers, Belgique) à une fréquence dépendant de leur croissance.

Inhibition de l'expression génique par les siRNA

De 3 à 5 siRNA ont été dessinés pour chaque gène cible (cf.tableau 2) et fournis sous forme de duplexes (Eurogentec, Belgium) à une concentration de 100µM dans du tampon TRIS.

Dans les expérimentations *in vitro*, les siRNA ont été ajoutés 24h après l'ensemencement à 150 nM dans du milieu de culture, associés avec de l'oligofectamine (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) selon les recommandations du fabricant.

Pour l'expérimentation animale, les siRNA sont dilués dans une solution de glucose à 5%, à raison de 4µl de glucose par microgramme de siRNA. Leur vecteur, la polyéthylénimine ou PEI (*in vivo* jet-PEI, Polyplus-Transfection, Illkirch, France), dilué dans un même volume de glucose, est ajouté aux siRNA à raison de 0,1µl de PEI par microgramme de siRNA. Ce mélange est ajouté à de l'eau afin d'obtenir un volume final de 200µl.

Les différentes séquences des siRNA sont listées ci-dessous (cf.tableau 2)

Gène ciblé	ercc1	ercc2	mutyh	pnkp
1	GGA-GCU-GGC-UAA-GAU-GUG-U	GGA-CGU-CGA-UGG-GAA-AUG-C	GAA-GCA-UGC-UAA-GAA-CAA-C	CAC-ACU-GUA-UUU-GGU-CAA-U
2	UAU-GCC-AUC-UCA-CAG-CCU-C	AGA-CGG-UGC-UCA-GGA-UCA-A	UGG-GAU-GAU-UGC-UGA-GUG-U	AGA-GAC-CCG-CAC-ACC-AGA-A
3	CAG-CAU-CAU-UGU-GAG-CCC-U	UCA-UCA-UCG-AGC-CCU-UUG-A	GCA-CCC-UUG-UUU-CCC-AGC-A	GAA-UCU-UGU-ACC-CAG-AGA-U
4	AUC-CCG-UAC-UGA-AGU-UCG-U	GGA-ACA-AGC-UGC-UCU-UUA-U	GGU-UGU-CCA-CAC-CUU-CUC-U	AGU-CCA-CCU-UUC-UCA-AGA-A
5	GGA-GCU-GGC-UAA-GAU-GUG-U	UGA-CUU-UCU-UAC-CUU-CGA-U	GCU-GAC-AUA-UCA-AGU-AUA-U	CAA-CCG-GUU-UCG-AGA-GAU-G
6	CAA-GGC-CUA-UGA-GCA-GAA-A			
7	ACA-GCU-CAU-CGC-CGC-AUC-A			
8	AGA-GAA-GAU-CUG-GCC-UUA-U			
Gène ciblé	pold1	rad54L	lig1	mad2L2
1	GGA-GAU-GGA-GGC-AGA-ACA-C	CCA-GCA-UUG-UGA-AUA-GAU-G	AGA-CGC-UCA-GCA-GCU-UCU-U	GAA-GAA-UGA-UGU-GGA-GAA-A
2	GUU-GGA-GAU-UGA-CCA-UUA-U	UCA-CCU-CGC-UAA-AGA-AGC-U	GAA-GAU-AGA-CAU-CAU-CAA-A	GAC-UCG-CUG-UUG-UCU-CAU-G
3	UCA-CCG-GUU-ACA-ACA-UCC-A	GGA-GCU-GUU-UAU-CCU-GGA-U	AGA-CAG-CAG-AGG-CCA-GAA-A	CUC-GCA-ACA-UGG-AGA-AGA-U
4	CUU-AGA-CUC-CAC-CAG-CUG-C	UGA-UCU-GCU-UGA-GUA-UUU-C	GCA-GAC-GUU-CUG-CGA-GGU-U	GAA-GAU-CCA-GGU-CAU-CAA-G
5	AUU-CAG-AUG-GGA-UAC-CUC-C	GCA-GUG-AGA-CCC-AGA-UCC-A	GCA-GAU-CCA-GCC-AUU-CCA-A	UGA-GCA-GGA-UGU-CCA-CAU-G
Gène ciblé	RUVBL2	MGC13170	GFP	Mgmt
1	AUC-UUC-UCC-CUG-GAG-AUG-A	CAA-GGA-CUU-GGC-UGC-UGA-G	GAC-GUA-AAC-GGC-CAC-AAG-UUC	AAG-CTG-GAG-CTG-TCT-GGT-TGT
2	ACU-GAC-CCU-CAA-GAC-CAC-A	GGA-GAA-GGU-GGA-UAA-GUG-G	GCA-AGC-UGA-CCC-TGA-AGT-TC	AAG-GTT-GTG-AAA-TTC-GGA-GAA
3	ACG-CAA-GGG-UAC-AGA-AGU-G	GAA-GGU-GGA-UAA-GUG-GGC-U	GCA-AGC-UGA-CCC-UGA-AGU-U	

Tableau 2 Séquence des siRNA utilisés

Survie cellulaire et chimio-résistance

Les cellules ont été ensemencées en plaque 96 puits. Les drogues de chimiothérapie, le cisplatine (CDDP, Merck, USA) et le témozolomide (TMZ; Schering-Plough, Levallois-Perret, France) sont ajoutées après 48h. Le témozolomide a été dissous dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) à 10 mg/ml et conservé à -20°C avant utilisation.

La viabilité cellulaire est déterminée en mesurant l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules. Cette enzyme transforme le MTT soluble (ou Bromure de 3(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium), de couleur jaune, en cristaux de formazan bleus absorbant à 540 nm. La quantité de cristaux formés est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. Le MTT est ajouté au milieu de culture des cellules à une concentration finale de 0,5 mg/ml. Au bout de 4 heures, les puits sont vidés et le MTT dissous avec un mélange de DMSO et d'éthanol (50 % / 50 %). La densité optique est lue à 540 nm.

La chimio-résistance a été rapportée à un indice (CI) correspondant à la population cellulaire qui a survécu à la chimiothérapie. Il a été calculé ainsi : le nombre de cellules (DO) après chimiothérapie / le nombre de cellules (DO) dans les conditions contrôles.

Le bénéfice de la transfection a été représenté par l'indice de sensibilisation à la drogue induite par siRNA (DS) correspondant à la population cellulaire (%) qui a survécu au simple traitement de chimiothérapie mais meurt avec ce même traitement précédé par la transfection des siRNA. Il a été calculé ainsi: (CI siRNA GFP – CI siRNA X) / CI siRNA GFP x 100.

Les différences significatives entre les séries ont été testées par ANOVA avec le logiciel Statview (SAS institute). Les différences ont été considérées significatives quand p<0.05 (*) et très significatives quand p<0.01 (**).

PCR

La Hot Star Taq polymérase (Qiagen, Turnberry Lane, USA) amplifie les séquences d'ADN à partir de matrices d'ADN complémentaire ou génomique, avec des amorces spécifiques (cf. tableau 3). Les produits sont séparés sur gel d'agarose 2% ou 3% (p/v ; Euromedex, Souffelweyersheim, France) contenant du bromure d'éthidium (Eurobio, Courtaboeuf, France) et visualisés dans un lecteur de gel (QuantityOne, Biorad, Hercules, USA).

Quantitative Real Time – Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

Principe

La qRT-PCR permet d'évaluer de manière absolue la quantité d'un transcrit dans un échantillon donné. La quantité de l'amplifiat est mesurée à chaque cycle grâce au SYBR Green (Roche, France), un fluorophore qui émet de la lumière seulement quand il est lié à de l'ADN double brin (cf. fig. 34). Cette quantité, en phase exponentielle de l'amplification, est proportionnelle à la quantité de transcrit de départ. Pour cela, il est toutefois nécessaire de réaliser au préalable une gamme étalon d'ADNc de quantités connues.

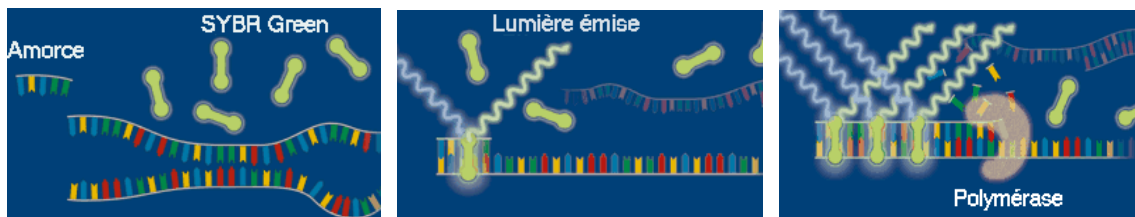


Figure 34 Principe d'action du SYBR Green

Les molécules de SYBER Green s'insèrent dans les brins d'ADN lors de la polymérisation et le signal de fluorescence augmente.

Etablissement des gammes étalon

Les ARN de différentes lignées sont extraits sur colonnes de silice (NucleoSpin, Macherey-Nagel). Les ADNc sont purifiés (Mini Elute, PCR Purification Kit, Qiagen, France) après transcription réverse (M-MLV Reverse transcriptase Rnase H minus, Promega, Madison, USA). Les échantillons d'ADNc sont amplifiés dans un Thermo Cycler (Biometra, Biolabo, Archamps, France) avec des amorces spécifiques (cf. tableau 3). Cet amplifiat a été dosé sur un lecteur Biorad (QuantityOne, Biorad, Hercules, USA) et dilué en une gamme de quantités. Les différents points de la gamme sont dosés en PCR quantitative avec le Light Cycler (Roche, France). Les gammes ont été validées lorsque leur efficacité était comprise entre 1,8 et 2, c'est-à-dire lorsque la quantité de produit PCR était multipliée d'un facteur compris entre 1,8 et 2 à chaque cycle.

Gène	Ref	Matrice	taille transcrit ou gène	début (pb)	Séquence	Tm	T° utilisée	Taille (pb) ADNc	Taille (pb) ADNg
Cyclophiline A	NC_000007	ADNc	718	351 489	TTCATCTGCACTGCCAAGAC TCGAGTTGTCCACAGTCAGC	60,0 60,0	60,8	158	1570
		ADNg	7 638	3 558 3 775	CTTGCAGATTTGGCACACTTCATGGTT CCTTACCACTCAGTCTTGGCAGTGCAG	69,8 69,9	70	/	244
Ercc1	NM_001983	ADNc	1 097	436 537	GGCGACGTAATTCCCGACTA AGTTCTTCCCCAGGCTCTGC	62,2 63,1	60,8	121	1247
		ADNg	15 506	666 794	CAGTCTTCCCTTGAGGCTCCAAGACC CTTGTCCATCTCTCAGACTCGGCAATG	70,7 70,0	70	/	150
Ercc2	NM_000400	ADNc	2 355	1 583 1 763	CGGAACATATGGGAACCTCCT TACTTCTCCAGGGCGACACT	60,3 59,8	64	200	1595
		ADNg	20 184	770 889	AGCAGCAGTGATAGCGAGGAGACTG GCATGTAGGAGAAGTCTCGGGGTAGA	69,9 70,1	70	/	241
Mutyh	NM_012222	ADNc	1 838	1 102 1 282	GTCCTGACGTGGAGGATGT CCTCTGCACCAGCAGAAATTT	60,1 60,4	64	200	373
		ADNg	12 429	465 631	CCTTCTTTGGATCACAACGCTCAATC CGCTGAACTAGCCACGAGGAGACTAC	70,3 69,9	70	/	193
Pnkp	NM_007254	ADNc	1 715	1 495 1 700	TCGAGAGATGACGGACTCCT TTTATTGTGGAGGGGAGCTG	59,9 60,0	60	206	289
		ADNg	7 558	228 409	GTAACCCACGAAAGCGAAACGATTAT GGATCCTCCGTTAGCAGATTTGCCTCT	69,9 70,0	70	/	208
MGMT	NM_002412	ADNc	807	202 362	AGCTGATGCCGTGGAGGT ACGACTCTTGCTGGAAAACG	61,8 60,4	60	161	/
		ADNg	301 082	69 871 70 044	CAACCACGAGTCCGCTCTCTCAAAACAG CCAAATGTTCAATGCTCATCAACCAACC	69,9 69,9	70	/	200
Isoformes Ercc2	NM_000400	ADNc	2 355	83 174	TACCCCGAGCAGTTCTCCTA GGCCAACAGGGATACTGTCT	59,8 59,0	64	111	1096
	BT_006883	ADNc	1 218	935 1 183	TGCTGGAGTACGTGAAGTGG TTTTTGGTTCCTGCTGCTTC	59,9 60,3	64	269	2369
	AK_092872	ADNc	2 405	1 375 1 455	ACTGCCCTCATCTCTCTCCA GGGACAGTGCCCAGATGTG	59,9 61,4	64	101	203
	Non décrite	ADNc	?	988 1 296	GCTGTGGGCTCTCTACTTGG ATGCAGCTGAAGTGCAGGAT	60,1 61,0	64	328	414
	AK_130849	ADNc	1 438	19 465	GCTCGATGATGATGGTGAAG ATGCAGCTGAAGTGCAGGAT	59,2 61,0	64	466	4290

Tableau 3 Paramètres des différentes PCR de ces travaux

Nous établissons ainsi une équation reliant la quantité effective d'ADNc (et donc d'ARNm) et le nombre de cycles en qPCR (ou Crossing Points, CP) :

Pour cela la masse molaire de l'amplifiat a été calculée de la manière suivante :

$MM = ((Ax312,2) + (Gx328,2) + (Cx288,2) + (Tx303,2) - 61) + ((Tx312,2) + (Cx328,2) + (Gx288,2) + (Ax303,2) - 61)$, où A, C, T et G sont le nombre de chacun des nucléotides correspondants dans le mono-brin.

On peut alors passer de la concentration en masse (ng/μl) mesurée avec le lecteur de gel, à une concentration moléculaire (fmol/μl).

Chaque point de la gamme étant constitué de 5μl d'échantillon, la quantité de produit de départ est égale à la concentration multipliée par 5.

	Taille de l'amplifiat	Concentration du produit (ng/ μ l)	Masse molaire du produit (g/mol)	Concentration du produit (fmol/ μ l)	Quantité du produit (fmol)	Equation
Ercc1	121	11,5	74 415	154,5	772,7	Qté = 41,747e(-0,614xCP)
Ercc2	200	2,2	123 070	17,9	89,4	Qté = 7,6605e(-0,6028xCP)
Mutyh	200	3,5	123 088	28,4	142,2	Qté = 1,6556e(-0,6337xCP)
Pnkp	206	12,6	126 775	99,4	496,9	Qté = 1493,7e(-0,68xCP)
Mgmt	161	220	99 058	2220,9	11104,6	Qté = 126,545e(-0,6676xCP)

Tableau 4 Paramètres concernant les qRT-PCR pour les gènes *ercc1*, *ercc2*, *mutyh*, *pnkp* et *mgmt*. CP = Crossing Point

Mesure de l'expression génique par qRT-PCR

Vingt-quatre heures ou 48h après la transfection des siRNA, les ARN cellulaires totaux sont extraits sur colonne de silice (NucleoSpin, Macherey-Nagel) selon les recommandations du fournisseur. Cinq cents nanogrammes d'ARN totaux sont dilués dans de l'eau milliQ stérile pour obtenir un volume final de 12 μ l puis ajoutés à 8 μ l d'un mix de transcription inverse (Promega pour l'ensemble des produits, Madisson, USA):

1 μ l d'eau, 4 μ l de tampon de l'enzyme (M-MLV RT 5x Reaction Buffer), 1 μ l de dNTP, 0,5 μ l de polyT, 0,5 μ l d'enzyme (M-MLV Reverse transcriptase Rnase H minus) et 1 μ l de RNAsine.

La réaction est réalisée à une température de 40°C pendant 1h30 puis durant 15 minutes à 70°C.

Les échantillons d'ADNc ainsi obtenus sont dilués dans l'eau pour obtenir un volume final de 100 μ l. Cette solution est alors aliquotée par 5 μ l et conservée à -20°C. A chaque aliquot d'ADNc à tester, on ajoute 5 μ l de mix de qRT-PCR :

2,25 μ l d'eau, 1 μ l de MgCl₂, 1 μ l de SYBR Green, 0,5 μ l d'UNG et 0,25 μ l d'amorces spécifiques du gène d'intérêt (100 μ M).

Les échantillons d'ADNc ainsi préparés sont amplifiés dans un Light Cycler (Roche, France). Des points de la gamme sont également ajoutés aux échantillons lors de chaque PCR, afin de les normaliser entre elles. Les quantités d'ADNc sont finalement déterminées grâce à la gamme étalon spécifique préalablement établie.

Afin de corriger les variations inter-échantillons indépendantes des variations spécifiques du gène étudié, nous disposions de 2 PCR de normalisation. La première était une PCR d'un gène de la tomate qui permettait de mesurer les différences d'efficacité de la reverse transcription, puisque nous ajoutions au mix de RT de l'ARN de tomate. Pour cela, la même quantité d'ARN de tomate est ajoutée à chaque échantillon ⁽²⁵⁶⁾. La seconde était une PCR d'un gène de ménage : la cyclophiline A, qui était quant à elle un témoin de charge des échantillons.

La correction était effectuée avec la cyclophiline A. La donnée fournie par la PCR tomate sert à déterminer s'il s'est produit un problème au niveau de la RT.

Les mesures ont été réalisées au moins 3 fois pour chaque échantillon, et les résultats exprimés sont la moyenne d'au moins 3 échantillons indépendants (provenant d'expériences *in vitro* indépendantes).

II. EXPERIMENTATION ANIMALE

Les expériences *in vivo* sont pratiquées sur des souris femelles *nude* ou des C57/bl6 de 7 semaines, soit d'environ 20 grammes, fournies pour une part par la société Charles River (CHARLES RIVER LABORATORIES France, L'Arbresle) et pour les autres par la société Harlan (Gannat, France). Les souris *nude* sont élevées dans des enceintes protégées. Les anesthésies avant les expérimentations sont effectuées par injection intra-péritonéale de chloral hydrate 4 % (m/v) dans de l'eau distillée, à raison de 10 µl par gramme de souris ou par un mélange Kétamine 10g/100ml (Imalgen®, Virbac, France) / Xylazine 2g/100ml (Rompun®) : 400µl d'Imalgen avec 200µl de Rompun dans 4ml qsp de NaCl.

Toutes les expériences sont effectuées dans des conditions d'hébergement et d'expérimentation respectant les règles d'éthique expérimentale chez l'animal.

Modèles tumoraux

Les modèles tumoraux sous-cutanés ont été réalisés en injectant 100 µl d'une suspension de 10^5 à 3.10^6 cellules tumorales au niveau de la cuisse droite de souris *nude* femelles. On laisse les tumeurs se développer au moins jusqu'à l'apparition d'un bouton tumoral, soit une grosseur mesurant environ 2mm sur 2mm, avant de commencer les traitements.

Les tumeurs cérébrales sont produites par l'injection de 2 à 4µl d'une solution cellulaire contenant de 10^4 à $5 \cdot 10^4$ cellules tumorales, à l'aide d'une seringue de précision (Hamilton, Massy, France), dans un cadre stéréotaxique, à 2 mm à droite du bregma et à 2,5 mm de profondeur, soit au niveau du striatum (ou noyau caudé, Cpu).

Injection des siRNA

Les siRNA sont dilués dans une solution de glucose à 5%, à raison de 4µl de glucose par microgramme de siRNA. Leur vecteur, le PEI (*in vivo* jet-PEI, Polyplus, Illkirch, France), dilué dans un même volume de glucose, est ajouté aux siRNA à raison de 0,1µl de PEI (150 mM) par microgramme de siRNA soit un rapport N/P=5. Le mélange ainsi formé est ajouté à de l'eau, qsp 200µl, et injecté par voie péritonéale.

Traitement de chimiothérapie

Les souris sont traitées avec du témozolomide (Temodal; Schering-Plough, Levallois-Perret, France) dilué dans du jus d'orange, à différentes concentrations. La solution est administrée aux souris *per os* selon la technique du gavage.

Sacrifice des souris

Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale à la fin des expérimentations.

Mesure des volumes tumoraux

Les tumeurs sont mesurées à l'aide d'un pied à coulisse tous les 2 ou 3 jours. Le volume tumoral, exprimé en mm^3 , est la multiplication des 3 dimensions :

$V = \text{longueur} \times \text{largeur} \times \text{hauteur}$.

Imagerie

Marquage radioactif des siRNA modifiés (CK2βm et GFPm)

Le marquage est réalisé sur glace par une méthode d'oxydation à la Chloramine T (Heinze, 2006). On dilue 50 µl de siRNA modifiés (67,5 µg) dans 50 µL d'eau stérile. L'ajout de 10 µl d'une solution de chloramine T (Riedel-De Haëns, Suisse) à 5 mg/ml est suivi d'une addition de 10 µl de $\text{Na-}^{125}\text{I}$ (Perkin Elmer, Boston, USA) soit 1 mCi (37MBq). L'oxydation est réalisée durant 2 minutes sous agitation. La réaction est stoppée par ajout de 40 µl d'agent réducteur: le pyrosulfite de sodium à 4 mg/ml dans l'eau (Fluka, Allemagne).

Le rendement de marquage est évalué par chromatographie sur couche mince. Le produit est déposé sur de fines plaques de gel de silice greffée (C18 ; Merck). La migration s'effectue dans un solvant acétonitrile / NaCl 0,9 % (60 / 40). Après avoir séché les plaques, la radioactivité est détectée par un analyseur linéaire (Berthold) Seuls les échantillons contenant moins de 5% d'iode libre sont utilisés.

La stabilité du composé *in vivo* est évaluée dans l'urine par chromatographie sur couche mince à 1 et 2 heures après injection.

Injection des siRNA

Les siRNA sont dilués dans une solution de glucose à 5%, à raison de 4µl de glucose par µg de siRNA. Leur vecteur, le polyéthylénimine ou PEI (in vivo jet-PEI, Polyplus, Illkirch, France), dilué dans un même volume de glucose, est ajouté aux siRNA à raison de 0,1µl de PEI par µg de siRNA. Ce mélange est ajouté à du sérum physiologique afin d'obtenir un volume final de 200µl. L'injection des siRNA radiomarqués est réalisée dans la veine caudale à raison de 10 µg par souris, soit une quantité de radioactivité proche de 150 µCi.

Imagerie du petit animal in vivo

Le suivi des siRNA radiomarqués injectés à l'état de traces dans l'organisme est réalisé par détection externe de la radioactivité grâce à une gamma caméra dédiée au petit animal (Biospace Mesures, Paris, France). Cette caméra, équipée d'un collimateur spécifique pour l'iode 125, permet d'établir l'imagerie du siRNA *in vivo* pour des souris saines (n=6) ou porteuses de tumeur (n=6). L'acquisition des images en mode planaire est réalisée en continu pendant 2 heures à partir de l'administration des siRNA complexés au PEI. Une acquisition tomographique en mode TEMP est par la suite réalisée durant 30 minutes et l'animal est ensuite sacrifié par dislocation cervicale.

Analyses post mortem pour la biodistribution de l'imagerie

Le foie, le poumon, la rate, les reins, le muscle squelettique, le sang, la graisse, l'urine, le tissu tumoral, le cerveau, la bile, l'estomac, la thyroïde et le cœur sont prélevés. Ces échantillons sont pesés puis la quantité de radioactivité de molécules marquées par organe est déterminée à l'aide d'un compteur gamma (Cobra-II auto-gamma, Packard) afin d'établir la biodistribution *ex vivo* du ¹²⁵I-siRNA.

Expression des résultats et analyses statistiques

Les résultats de la biodistribution par prélèvement d'organes sont exprimés en pourcentage de la dose injectée par gramme d'organe (%DI/g d'organe). Les résultats ainsi obtenus révèlent la quantité de radiotracer fixée dans les différents organes en fonction de la dose injectée. La comparaison des résultats obtenus a fait l'objet d'un test t de Student. La limite de significativité est fixée à 5%.

RESULTATS

I. BIO-INFORMATIQUE :

Gènes du 1p/19q

La première partie de notre travail a consisté à trouver des gènes potentiellement impliqués dans les mécanismes de résistance à la chimiothérapie.

Nous nous sommes intéressés aux régions chromosomiques 1p et 19q car leur LOH est la donnée cytogénétique qui différencie les gliomes sensibles des résistants. Plus de 1 700 gènes se trouvent au niveau de ces régions. Nous avons par conséquent dû faire un choix parmi ceux-ci. Les gènes candidats donnent des produits impliqués dans diverses fonctions. Ils contribuent à la réparation des altérations de l'ADN, à l'apoptose et au métabolisme des agents xénobiotiques environnementaux ou médicamenteux. Nous avons identifié une cinquantaine de gènes au total, impliqués dans ces différentes fonctions (cf. Annexe IV). Notre priorité a été l'étude des gènes de réparation de l'ADN en considérant que les agents de chimiothérapie majoritairement utilisés créent des modifications de l'ADN.

Wood *et al.* ^(127, 138) ont répertorié environ 150 produits de gènes qui jouent un rôle plus ou moins important dans les différents systèmes de réparation (cf. Annexes III).

Parmi ceux-ci, nous nous sommes particulièrement intéressés à ceux dont le gène se situe au niveau d'une région particulière dans la cytogénétique des gliomes, les bras chromosomiques 1p et 19q. En effet, Cairncross *et al.* ⁽⁶⁶⁾ ont mis en évidence la sensibilité particulière d'une catégorie de gliomes, les oligodendrogliomes. Ils ont ensuite corrélé cette chimio-sensibilité à la perte d'une portion des bras chromosomiques 1p et 19q ⁽³⁴⁾. Une zone de délétion commune plus précise a été définie par Smith *et al.* ⁽⁷³⁾ et regroupe les régions chromosomiques 1p36-p32 et 19q13.2-q13.4.

Nous avons ainsi établi une liste de gènes de réparation appartenant à cette zone du génome (cf. tableau 5). Nous avons également joint un gène de la même région qui s'apparente au gène MDR : MGC13170 ⁽²⁵⁷⁾.

DNA repair genes	DNA repair system	Reference	Location
<i>ercc1</i>	NER	NM_001983	19q13.2-3
<i>ercc2</i>	NER	NM_000400	19q13.3
<i>lig1</i>	NER	NM_000234	19q13.2-3
<i>mad2L2</i>	ADN polymerase	NM_006341	1p36
<i>mutyh</i>	BER	NM_012222	1p34.3
<i>pnkp</i>	BER	NM_007254	19q13.3-4
<i>pold 1</i>	NER and MMR	NM_002691	19q13.3
<i>rad 54L</i>	Homologous Recombination	NM_003579	1p32
<i>ruvbl2</i>	Homologous Recombination	NM_006666	19q13.3
MGC13170	/	NM_199249	19q13.3

Tableau 5 Tableau des gènes de réparation de la zone commune de délétion du 1p/19q

II. ETABLISSEMENT DU TEST DE CHIMIO-SENSIBILITE

Nous voulions étudier l'implication des gènes des régions chromosomiques 1p et 19q dans les mécanismes de chimio-résistance. Il nous fallait pour cela observer l'impact de l'inhibition de leur fonction sur des lignées résistantes en présence de drogue.

Aucune des techniques nécessaires à ces travaux n'étaient en place dans le laboratoire. Il nous a donc fallu réaliser de nombreuses mises au point, tant au niveau de l'inhibition d'expression, que des traitements de chimiothérapie *in vitro*, et surtout nous avons dû développer un test fonctionnel tenant compte de ces 2 volets conjointement.

Transfection :

Au début de ces travaux, les siRNA venaient de faire leur apparition dans les laboratoires. Si aujourd'hui les algorithmes de design ne sont pas parfaits, ils sont néanmoins performants en comparaison des premiers. D'autre part, les lignées d'astrocytomes n'avaient pas encore fait l'objet d'études par cette technique. Tout était donc à faire en matière de mise au point de la transfection sur nos modèles. En l'absence d'autre critère d'observation de la diminution d'expression, nous l'avons mesurée par une technique de RT-PCR, que nous avons mise au point de façon à nous placer dans des conditions où les moindres variations de quantité d'ARNm seraient visibles. Nous avons effectué les mises au point avec des siRNA dirigés contre le gène de réparation *ercc1*, que la littérature nous désignait comme le meilleur candidat de l'étude. La *cyclophiline A*, gène de ménage, et un siRNA dirigé contre la Green Fluorescent Protein (GFP) nous ont servi de témoins dans l'ensemble de ces mises au point.

SiRNA dans les conditions couramment utilisées

Trois séquences différentes de siRNA *ercc1* (*ercc1-1*, *ercc1-2* et *ercc1-3*) ont été dessinées et synthétisées par la société Eurogentec (cf. tableau 2). Nous les avons mélangées en proportions égales et testées sur des cellules U373 dans des conditions de transfection recommandées par le fabricant soit 150nM, avec le JetSi (Polyplus, Illkirch, France) comme vecteur de transfection (cf. fig. 35). Les cellules ont été récupérées 96h après la transfection.

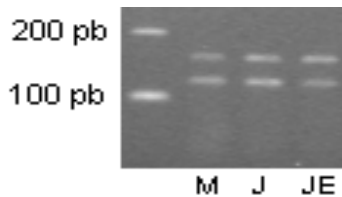


Figure 35 Mesure de la quantité des ARNm des gènes *cyclophiline A* et *ercc1* dans la lignée U373
Produits PCR des gènes *cyclophiline A* (en haut : 158 pb) et *ercc1* (en bas : 121 pb) séparés sur gel d'agarose à 3 % (m/v). M : contrôle avec milieu seul - J : JetSi - E : siRNA *ercc1* (pool)

La quantité d'ARNm du gène ciblé diminue, néanmoins, cette diminution était légère. Nous avons donc optimisé l'inhibition au niveau de l'agent de transfection, de la séquence de siRNA choisie, du temps d'incubation et des concentrations de siRNA. Les paramètres de transfection sont en effet très variables d'un type cellulaire à l'autre et l'efficacité des siRNA est également très dépendante de leur séquence.

Optimisation de l'utilisation des siRNA

- *agent de transfection*

Nous avons dans un premier temps comparé deux agents de transfection : l'oligofectamine (Invitrogen) et le JetSi et retenu celui qui présente à la fois la plus grande efficacité et une moindre toxicité pour les lignées cellulaires sur lesquelles nous travaillons (cf. fig. 36). Les 3 séquences de siRNA ont de nouveau été utilisées ensemble.

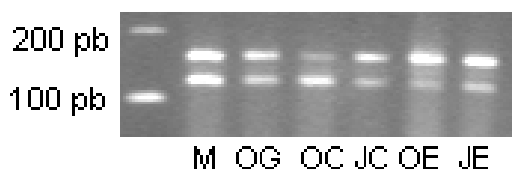


Figure 36 Mesure de la quantité des ARNm des gènes *cyclophiline A* et *ercc1* dans la lignée U373.
Produits PCR des gènes *cyclophiline A* (en haut : 158 pb) et *ercc1* (en bas : 121 pb) séparés sur gel d'agarose à 3 % (m/v). M : contrôle avec milieu seul - O : Oligofectamine - J : JetSi - G : siRNA GFP - C : siRNA *Cyclophiline A* - E : siRNA *ercc1* (pool)

La diminution de la quantité d'ARNm pour les 2 gènes est beaucoup plus importante lorsque nous utilisons l'oligofectamine. De plus, le JetSi a une plus grande toxicité qui se traduit par une mort cellulaire accrue alors que l'oligofectamine n'a aucune toxicité. Nous avons par conséquent décidé d'utiliser l'oligofectamine pour la suite des expériences.

- *Autres agents de transfection*

Nous avons par la suite essayé d'autres agents de transfection, le Fugène (Roche, France) et la Nanofectine, mais ils se sont révélés moins efficaces que l'oligofectamine pour chimio-sensibiliser nos lignées (cf.fig.37).

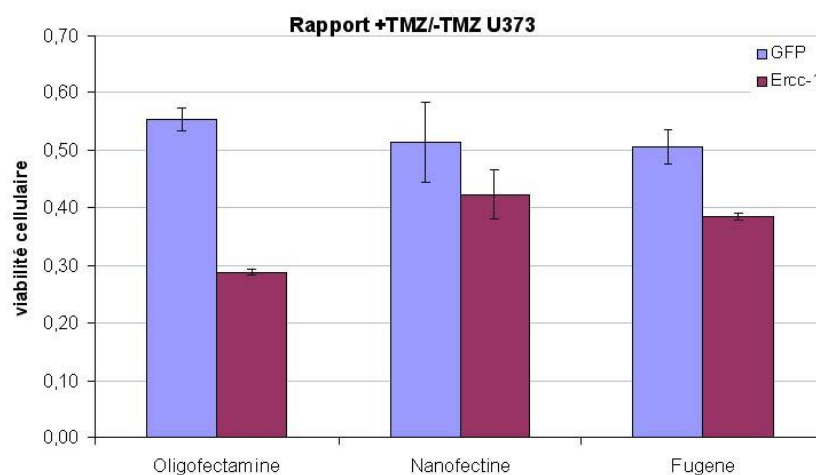


Figure 37 Efficacité de 3 transfectants

Des cellules U373 ont été transfectées avec des siRNA *gfp* ou *ercc1* à l'aide de 3 transfectants différents : l'oligofectamine, la nanofectine et le fugène. Les cellules ont également été traitées avec du témozolomide (TMZ). Les différents effets sur la chimio-sensibilisation ont été comparés.

- *Temps d'incubation des siRNA*

Nous voulions également observer la cinétique d'action des siRNA afin de déterminer le temps d'incubation optimum des siRNA avec les cellules. Nous avons pour cela extrait les ARNm des cellules après différents temps d'incubation en présence de siRNA *ercc1*. L'inhibition génique est observable pour chaque temps d'incubation, et de plus forte intensité entre 48h et 72h (cf.fig 38).

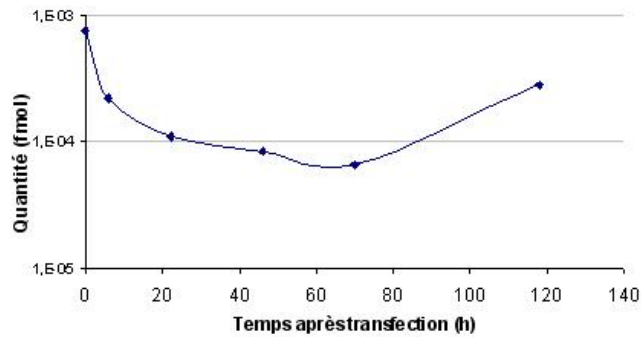


Figure 38 Inhibition génique par des siRNA Ercc1
Des cellules U373 ont été transfectées avec des siRNA ercc1 et les quantités d'ARN ercc1 ont été mesurées à différents temps par qRT-PCR.

- *Efficacité de chacune des séquences*

Nous avons ensuite déterminé l'efficacité de chacune des séquences de siRNA séparément 48h après l'administration dans le but de n'utiliser que la ou les séquences les plus efficaces (cf.fig.39).

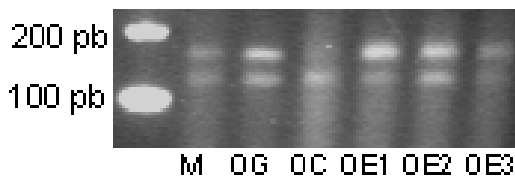


Figure 39 Mesure de la quantité des gènes *cyclophiline A* et *ercc1*.

Produits PCR des gènes *cyclophiline A* (en haut : 158pb) et *ercc1* (en bas : 121pb) séparés sur gel d'agarose à 3 % (m/v).
M : contrôle avec milieu seul O : oligofectamine – G : siRNA GFP – E1 à E3 : séquences de siRNA *ercc1*

Les efficacités des séquences de siRNA ercc1 peuvent se classer selon l'ordre suivant : E1>E3>>E2. Nous avons par conséquent utilisé le siRNA ercc1-1 pour la suite des travaux.

Chimiothérapie

Une fois les transfections au point, il nous fallait également établir un protocole de chimiothérapie qui permettrait la mise en évidence de l'éventuel effet chimio-sensibilisant d'un siRNA. Nous devons dans un premier temps trouver une drogue de chimiothérapie qui s'adaptait à notre test, c'est-à-dire principalement une drogue dont les effets seraient reproductibles d'une expérience à l'autre.

Différentes drogues de chimiothérapie étaient à notre disposition et nous voulions déterminer la mieux adaptée à un test fonctionnel en plaques 96 puits. Pour chacune de ces drogues, nous avons testé une gamme de concentrations afin de trouver la dose efficace. Nous avons déterminé en parallèle le temps de traitement adéquat. Le délai entre l'ensemencement et l'ajout de drogue a également été recherché.

La fotémustine

Notre étude a tout d'abord porté sur la fotémustine alors utilisée dans l'unité.

Le protocole d'utilisation établi est un traitement de 17 heures à 0,5 mg/mL, réalisé 72 heures après l'ensemencement (cf.fig.40). Malheureusement, les résultats n'étaient pas reproductibles pour des raisons de variations inter-lots : les solutions de fotémustine dont nous disposions provenaient de flacons déjà entamés qui ne peuvent être ré-utilisés pour les patients. Il nous était donc impossible de vérifier les conditions de conservation antérieures à celles du laboratoire, ni même la date d'ouverture du flacon. Cette drogue fut par conséquent éliminée de l'étude.

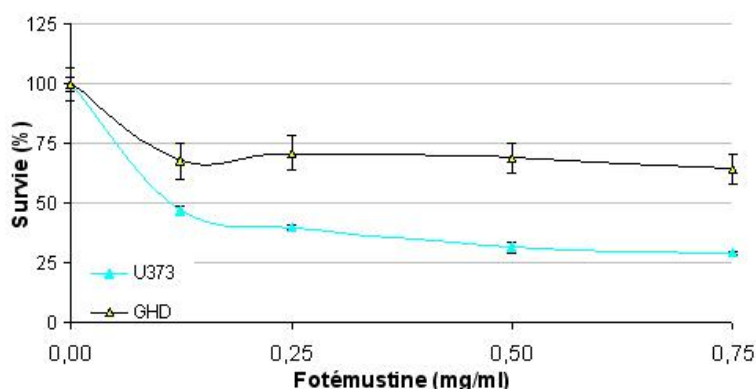


Figure 40 Effet de la fotémustine

Des cellules U373 et GHD ont été incubées en présence de concentrations croissantes de fotémustine

Le témozolomide (TMZ)

Cette drogue se présente sous forme de poudre. Nous avons, au début de l'étude, éprouvé des difficultés à la resuspendre car sa solubilité en solution aqueuse est mauvaise. De ce fait, nous ne pouvions déterminer la quantité réelle de produit utilisée après la reconstitution. De plus, cette poudre est très volatile, donc très dangereuse à manipuler. Enfin, nous avons également constaté une perte quasi-totale de l'activité après une congélation en solution aqueuse. Ceci impliquait donc de préparer une solution extemporanément, ce qui nous est impossible puisque nous n'avons pas le matériel indispensable pour garantir une sécurité totale.

L'utilisation du témozolomide avait donc été abandonnée dans un premier temps.

Le cisplatine (CDDP)

Ce cytotoxique platiné de l'ADN est stable à température ambiante en solution aqueuse. L' IC_{50} est proche de 5.10^{-6} M (cf.fig.41). Les résultats sont hautement reproductibles et cette

drogue ne présente aucune contrainte de conservation puisqu'il se conserve à température ambiante sans perte d'efficacité. Le protocole d'utilisation établi pour le cisplatine est un traitement sur 96 heures, à raison de 5.10^{-6} M final.

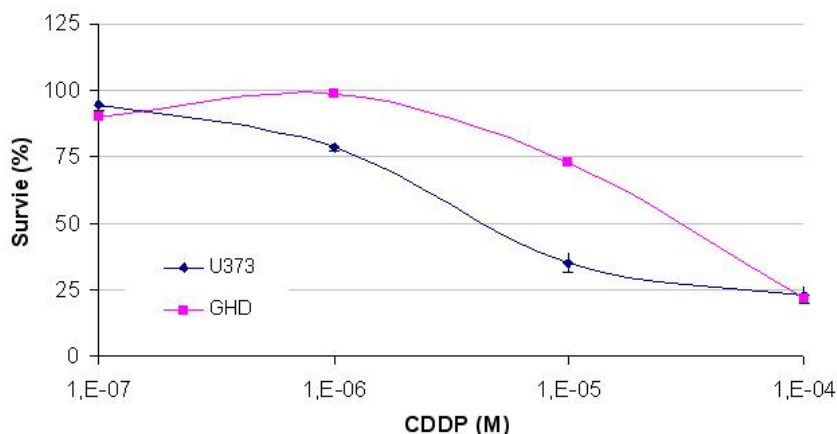


Figure 41 Effet du CDDP

Des cellules U373 et GHD ont été incubées en présence de concentrations croissantes de cisplatine

Test fonctionnel

Une fois les protocoles de transfection et de chimiothérapie établis, nous avons pu développer le test fonctionnel permettant d'éprouver le rôle des différents gènes candidats dans les mécanismes de chimio-résistance. Nous voulions pouvoir tester une grande variété de siRNA simultanément sans pour autant utiliser de grandes quantités de cellules, ni de siRNA, ni même de drogue. Il était donc intéressant de miniaturiser notre test, tout en restant dans des proportions où la reproductibilité ne serait pas sacrifiée. Le format plaque 96 puits étaient par conséquent un bon compromis, puisqu'il propose 60 puits utilisables (sans effet « de bord ») avec des volumes de l'ordre de la centaine de microlitres, modérément sensibles aux imprécisions de volume. De plus, les plaques de culture offrent l'avantage d'une lecture automatique de la DO à l'aide d'un lecteur de plaque.

Des gammes d'ensemencements cellulaires nous ont permis de déterminer qu'une quantité moyenne de 5 000 cellules par puits dans 100 μ L de milieu de culture était idéale pour notre test. C'est-à-dire qu'à la fin de notre test de chimio-sensibilité, d'une part, les DO obtenues avec le MTT restent dans une gamme dynamique permettant l'observation des variations de survie, et que d'autre part, les cellules n'atteignent pas la confluence, ce qui aurait saturé le signal.

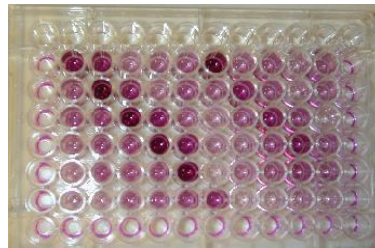


Figure 42 Plaque 96 puits avec des puits contenant diverses concentrations de MTT

Séquence des traitements

Des cellules d'astrocytomes sont donc cultivées en plaque 96 puits en présence ou en absence de siRNA et de CDDP, afin de voir si leur sensibilité à l'agent de chimiothérapie est modifiée par l'inhibition d'expression du gène d'intérêt. L'ordre des étapes de l'expérience et les durées d'incubation des siRNA et du CDDP ont été établis après détermination de la fenêtre d'action du CDDP (24 heures) et du temps d'efficacité optimum des siRNA (48 heures). Nous savons d'une part que les siRNA diminuent la concentration des ARNm *ercc1* dès 24h et que le CDDP agit en moins de 24h. D'autre part, la réparation des adduits de l'ADN s'effectue essentiellement dans les 6h après leur apparition ⁽¹⁶³⁾. Nous avons d'ailleurs vérifié cette rapidité d'action en changeant le milieu à différents temps après le traitement. En effectuant cette opération à 1h, la mortalité cellulaire était comparable à la situation sans changement de milieu. La drogue agit donc bien en moins d'une heure. Nous avons alors décidé de transfecter les cellules 24 heures avant le traitement au CDDP, pour que l'inhibition génique soit la plus efficace lorsque la réparation de l'ADN est la plus active en réponse aux lésions causées par la drogue.

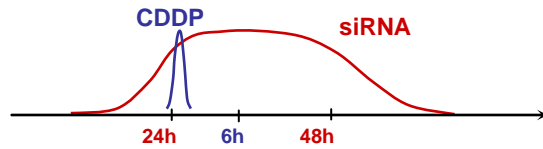


Figure 43 Schéma des fenêtres d'actions des siRNA et du CDDP

Le déroulement classique d'un test de chimio-sensibilité est donc le suivant :

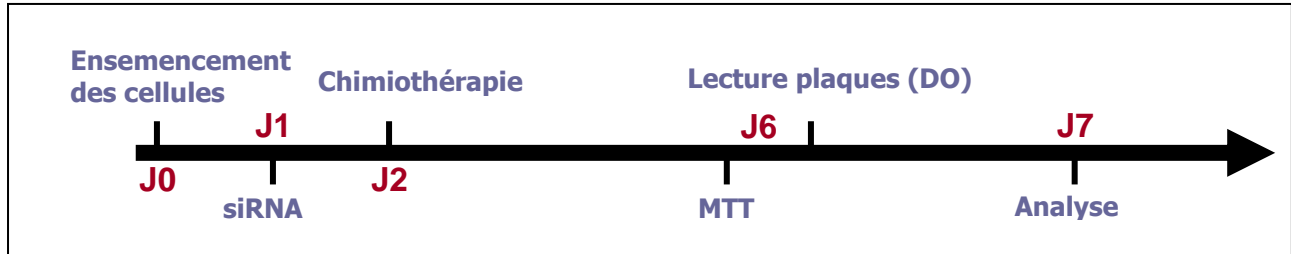


Figure 44 Déroulement d'un test de chimio-sensibilité

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 96 puits avec 5 000 cellules par puits dans 100 μL de milieu de culture. Le lendemain, les siRNA sont transfectés avec de l'oligofectamine à raison de 0,2 μg de siRNA par puits (150nM). Puis, 24h après la transfection, les cellules sont traitées avec du CDDP ($5 \cdot 10^{-6}$ M final). Quatre jours plus tard, on mesure la viabilité cellulaire relative des différents puits avec le MTT. Les différentes DO (DO avec et sans drogue pour un même siRNA) et leurs rapports sont analysés pour déterminer l'effet du siRNA sur la chimio-sensibilisation.

L'élaboration de ce test basée sur des données du laboratoire et de la littérature a permis d'entamer l'étude des siRNA d'intérêt.

Validation

Nous avons d'abord éprouvé le test à partir des siRNA dirigés contre notre meilleur gène candidat : le gène *ercc1*. Ceci devait d'une part valider l'efficacité du test et la fonction chimio-sensibilisante du siRNA *ercc1* d'autre part. Nous avons donc inhibé l'expression de ce gène de réparation dans des cellules issues d'astrocytomes résistantes à la chimiothérapie, la lignée U373. Nous avons observé l'effet de cette inhibition sur la survie des cellules cultivées en présence et en absence de cisplatine (CDDP).

Le CDDP diminue la survie cellulaire de 38,5 % lorsque les cellules U373 ont été transfectées avec des siRNA *ercc1* alors qu'il la diminue seulement de 19,8 % dans la condition témoin (GFP). On a ainsi un CI_{gfp} de 80,2% et un CI_{ercc1} de 61,5%, soit un DS de 18,7 (cf.fig.45).

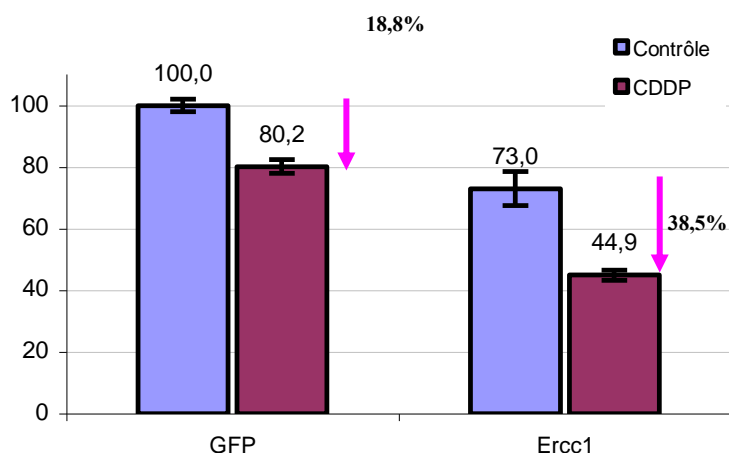


Figure 45 Chimio-sensibilisation de cellules U373 transfectées avec le siRNA *ercc1*

Survie cellulaire (MTT) de cellules U373 transfectées avec des siRNA *ercc1* (150 nM) en absence (Contrôle) et présence de drogue (CDDP) (5.10^{-6} M). Toutes les valeurs ont été rapportées à la survie obtenue avec le siRNA témoin GFP en absence de CDDP. Le traitement au CDDP a été effectué 24h après la transfection, le test MTT, 96h après le traitement au CDDP.

Ces résultats suggèrent que l'inhibition d'expression de *ercc1* sensibilise les cellules U373 au cisplatine. Ces résultats étaient encourageants et nous les avons reproduits sur une autre lignée cellulaire afin de démontrer l'implication générale de ce gène dans la chimio-résistance des gliomes. Nous avons donc observé l'effet de l'inhibition d'expression de *ercc1* dans les cellules GHD, lignée primaire, établie dans le laboratoire à partir de prélèvements d'astrocytomes.

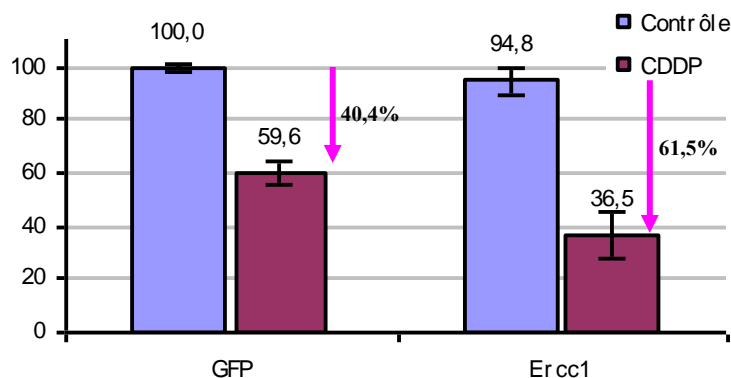


Figure 46 Chimio-sensibilisation de cellules GHD transfectées avec le siRNA *ercc1*

Survie cellulaire (MTT) de cellules GHD transfectées avec des siRNA *ercc1* (150 nM) en absence (Contrôle) et présence de drogue (CDDP) (5.10^{-6} M). Toutes les valeurs ont été rapportées à la survie obtenue avec le siRNA témoin GFP en absence de CDDP. Le traitement au CDDP a été effectué 24h après la transfection, le test MTT, 96h après le traitement au CDDP.

Tout comme dans les cellules U373, l'inhibition d'expression de *ercc1* dans les cellules GHD entraîne une mortalité accrue en présence de CDDP (21 %) par rapport au témoin siRNA GFP (cf.fig.46).

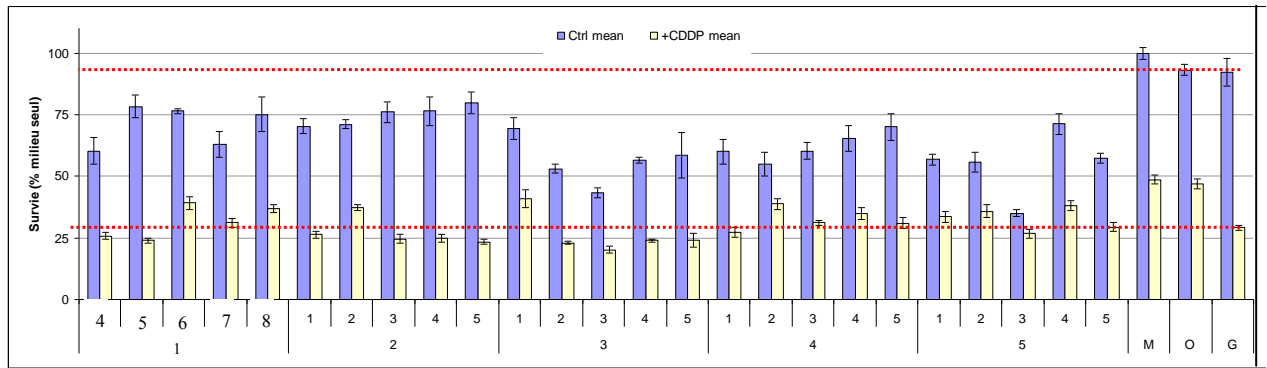
Ces résultats démontraient que *ercc1* était probablement impliqué dans les mécanismes de chimio-résistance des cellules issues d'astrocytomes et surtout que l'inhibition de son expression permettrait de sensibiliser ces cellules au traitement.

Ce résultat valide le test fonctionnel. Nous avons vérifié l'importance de la séquence des traitements en réalisant la transfection en même temps ou 24h après l'addition de CDDP. Aucun effet n'était observable dans ces conditions.

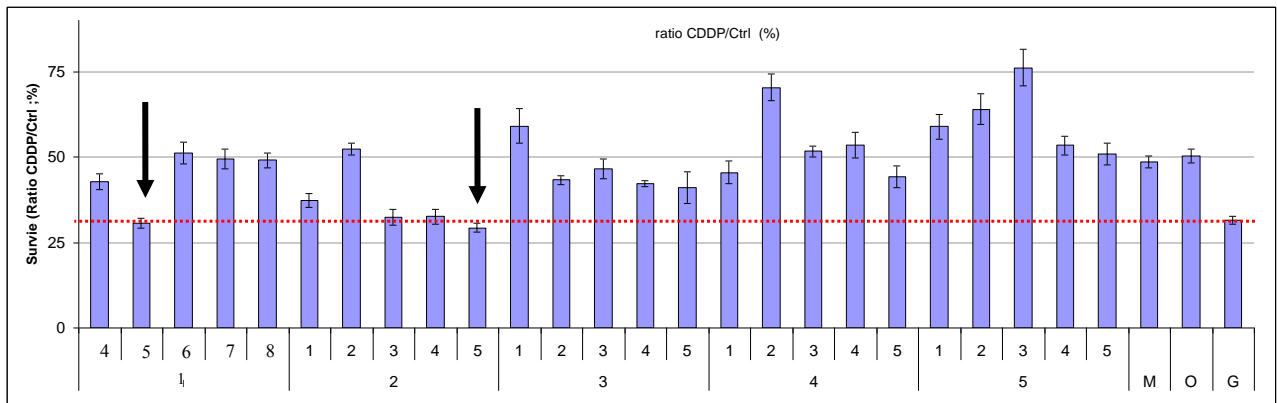
III. ETUDE FONCTIONNELLE DES GENES CANDIDATS

Criblage préliminaire des gènes de réparation

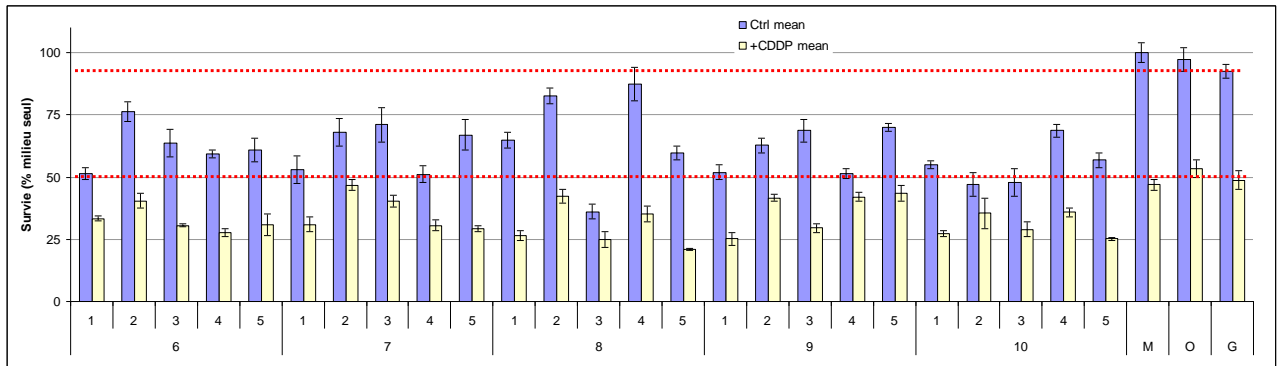
Notre hypothèse était que la chimio-résistance des astrocytomes est le résultat de l'expression, ou de la sur-expression, de gènes présents au niveau des régions chromosomiques 1p et 19q. Nous avons ainsi recherché parmi des gènes candidats, autres que *ercc1*, ceux dont l'inhibition de l'expression pouvait sensibiliser à la chimiothérapie. Nous avons pour cela effectué un criblage sur 10 gènes, avec 5 séquences différentes de siRNA par gène (cf.fig.47). Cela nous a permis de sélectionner certaines séquences augmentant la chimio-sensibilité de cellules résistantes.



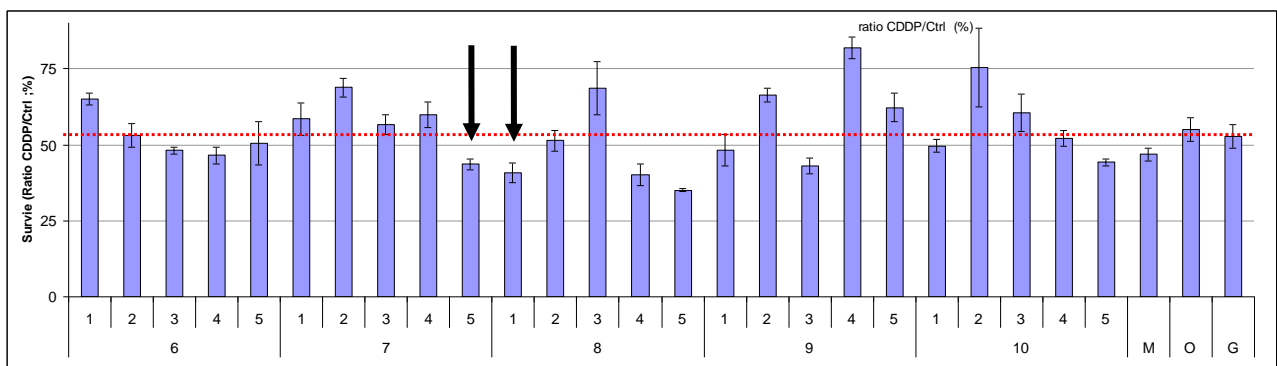
A.



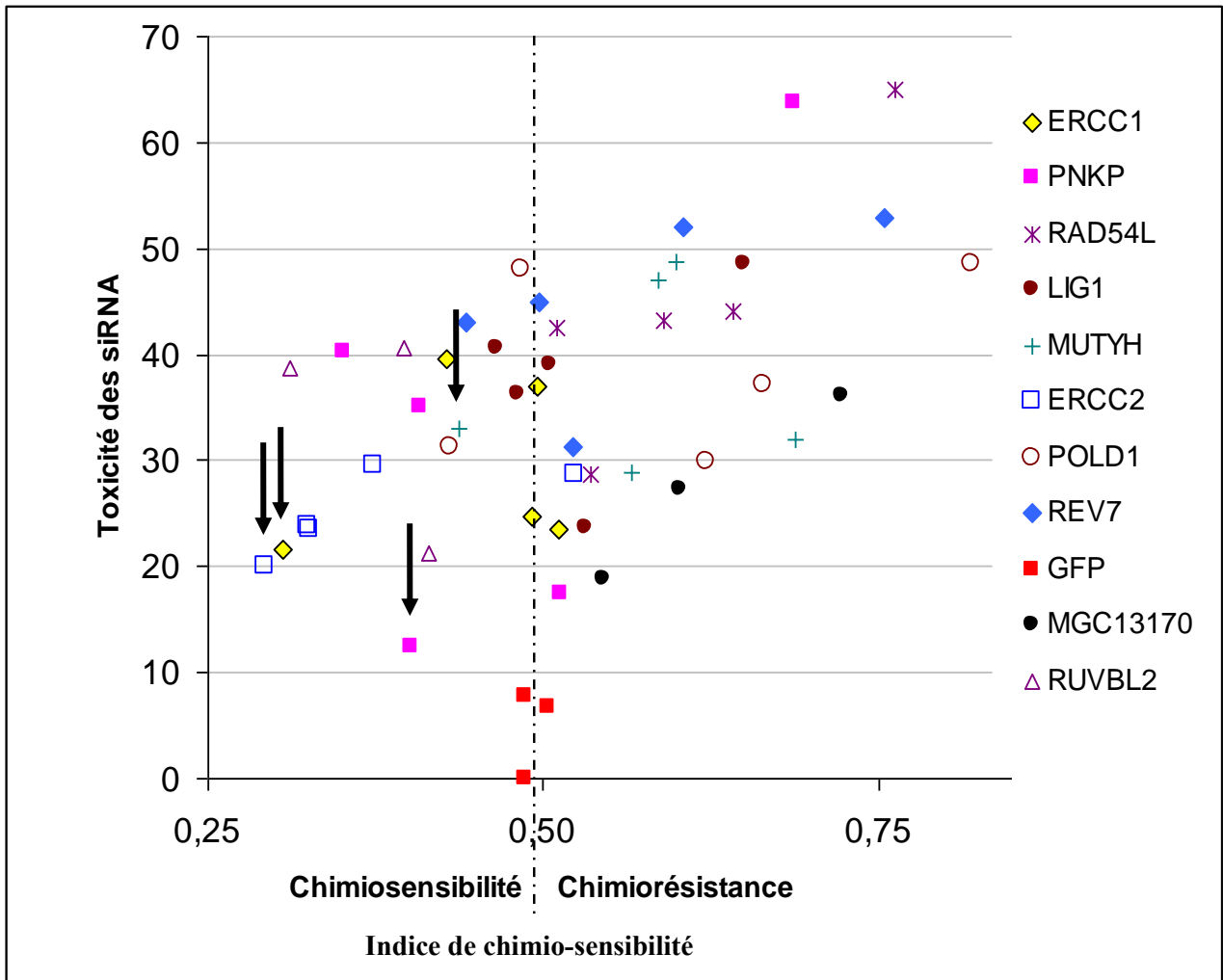
B.



C.



D.



E.

Figure 47 Criblage des siRNA dirigés contre les gènes de réparation de l'ADN

Viabilité cellulaire (MTT) de cellules GHD transfectées avec des siRNA. Les siRNA des différents gènes testés (1 : ERCC1 ; 2 : ERCC2 ; 3 : GADD4B-1 ; 4 : GPX4 ; 5 : RADU4L ; 6 : LIG1 ; 7 : MUTYH ; 8 : PNKP ; 9 : POLD1 ; 10 :REV7 ; G : siRNA GFP) ont été utilisés à la concentration de 150 nM. Chaque gène a été ciblé par 5 séquences différentes de siRNA (1 à 5). Le niveau de survie de référence est déterminé par le siRNA GFP (lignes rouges). Dans la condition M, les cellules n'ont pas été transfectées et dans la condition O, elles ont été mises en contact seulement avec le transfectant. Le traitement au CDDP a été effectué 24h après la transfection, le test MTT, 96h après le traitement au CDDP. **A** et **C** : Viabilité avec et sans CDDP ; **B** et **D** : Survie cellulaire. Toutes les valeurs de survie en présence de CDDP (5.10^{-6} M) ont été rapportées à la survie obtenue en absence de CDDP. **E**. En ordonnée est représentée la toxicité propre du siRNA en absence de tout autre traitement, et en abscisse, le ratio de l'effet du siRNA en présence du CDDP sur l'effet du siRNA seul (Indice de Chimio-sensibilité : CI). Les siRNA sont chimio-sensibilisants lorsque le CI est inférieur à celui du siRNA GFP (0,5) et chimio-protecteurs lorsqu'il est supérieur. Les flèches noires représentent les siRNA choisis pour la suite de l'étude.

Les séquences de siRNA retenues pour leur apparent effet chimio-sensibilisant sont : ercc1-5 ; ercc2-5 ; mutyh-5 et pnkp-1 (cf.fig.47). D'autres séquences, entraînant une mortalité importante, ont été écartées à cause d'une toxicité intrinsèque des siRNA.

Projet iCancéroDrops

Parallèlement aux expériences citées précédemment, s'est mis en place le projet iCanceroDrops financé par la Ligue Nationale Contre le Cancer, en collaboration avec le CEA (laboratoire Biopuce, équipe de F. Châtelain et l'INSERM EMI 104, équipe d'O. Filhol-Cochet), l'équipe de M. Billaud (FRE 2692 CNRS, Lyon).

Ce projet a été une part importante du travail de thèse qui devait nous permettre le criblage haut débit de la fonction des 50 gènes des régions 1p 19q en format puce.

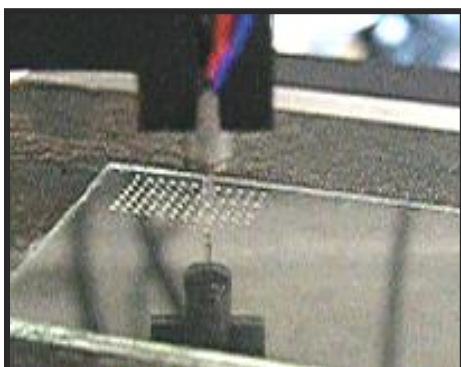


Figure 48 Robot en train de spotter des cellules en gouttes sur une puce de verre (Robot Scienion)

Un robot spotter (cf.fig.48) se trouvait au CEA. Un groupe de quatre personnes impliquées dans le projet, dont je fais partie, ont suivi des formations dispensées sur place pour le manipuler et le programmer. Le robot pouvait d'une part être dirigé manuellement ou bien programmé grâce au logiciel correspondant. Il dispensait des gouttes de suspensions cellulaires sur une lame de verre (puce) ainsi que les différentes solutions que l'on veut ajouter aux cellules : siRNA et drogues de chimiothérapie selon le plan de plaque programmé. L'incubation en chambre humide permettait de cultiver les cellules adhérentes plusieurs jours.

D'autre part, nous avons élaboré avec précision les protocoles des différentes expériences. En effet, le format puce à cellules de par ses caractéristiques imposant des contraintes, notre modèle d'étude ne pouvait pas être transféré tel quel. Un bon exemple de ceci est l'impossibilité d'utiliser le test MTT pour une lecture automatique de la viabilité cellulaire. L'analyse d'image nécessitait de pouvoir compter les cellules, alors que le test MTT entraîne la lyse cellulaire. Nous avons ainsi dû utiliser des marquages fluorescents pour l'analyse des phénotypes recherchés : viabilité cellulaire (kit live-dead, Baclight- Molecular Probes), prolifération (DiI) et apoptose (annexin V).

Avec l'aide de nos remarques et suggestions au concepteur, le logiciel IMSTAR a été développé parallèlement dans le but de collecter automatiquement les données de chaque plot (cf.fig.49), sur différents types cellulaires.

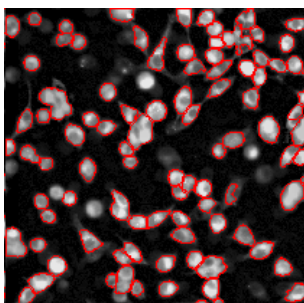


Figure 49 Analyse d'image par le logiciel IMSTAR.

Le contour des cellules est déterminé par un algorithme particulier à chaque type cellulaire

Une base de données recueillait les informations et résultats de chacune des expériences.

Les avancements dans le projet étaient régulièrement consignés dans les rapports de travail "iCanceroDrops" rédigés par les différents membres de notre groupe de travail et présentés devant Mme Godet à la LNCC (Paris) au cours de réunions bimensuelles.

Les premiers criblages ont, dans un premier temps, servi à la mise au point du robot. Puis, l'effet de l'inhibition d'expression de *ercc-1* a été étudié sur des cellules U373 en présence ou non de CDDP, avec 5 séquences différentes de siRNA dirigés contre l'ARNm de *ercc1* (*ercc1-4* à *ercc1-8*). Nous avons observé un effet chimio-sensibilisant pour la plupart de ces séquences. Il est à noter que le siRNA *ercc1-5* est de même séquence que le siRNA retenu lors des mises au point du début des travaux.

Cela a permis de valider les procédures mises en place au format puce à cellules.

Un article basé essentiellement sur la technique, et dont *ercc1* illustre la validité, a été publié :

A "DropChip" Cell Array for DNA and siRNA Transfection Combined with Drug Screening

Béatrice Schaack,¹ *Julien Reboud*,¹ *Stéphanie Combe*,¹ *Brigitte Fouqué*,¹ *François Berger*,³ ***Sandra Boccard***,³
Odile Filhol-Cochet,² and *François Chatelain*¹

¹ Laboratoire Biopuces, bat 4020, CEA, 17 rue des martyrs, F-38054 Grenoble Cedex 9, France

² INSERM EMI 104, bat 4020, CEA, 17 rue des martyrs, F-38054 Grenoble Cedex 9, France

³ INSERM U318, University Hospital of Grenoble, F-38043 Grenoble, France

NanoBiotechnology

Copyright © 2005 Humana Press Inc.

All rights of any nature whatsoever are reserved.

ISSN 1551-1286/05/01:183-190/\$30.00

DOI: 10.1385/Nano:1:2:183

Texte intégral en annexe V

Ce projet devait nous permettre, par un criblage haut débit de la fonction des différents gènes des régions 1p/19q, de dégrossir le travail sur les 250 siRNA. Toutefois, le criblage n'a jamais pu atteindre un haut-débit comme nous l'avions prévu pour analyser les 250 siRNA des 50 gènes. Les principaux écueils auxquels s'est heurté le criblage ont été la reproductibilité du spottage et l'efficacité de l'analyse d'image.

Autres gènes

Une autre dizaine de gènes a néanmoins été criblée dans ce format puce-à-cellules. Ceux qui semblaient intéressants ont fait l'objet d'études plus approfondies dans notre laboratoire et nous avons confirmé l'intérêt de deux d'entre eux : CYP2A6 et CYP4B1 (cf.fig.50).

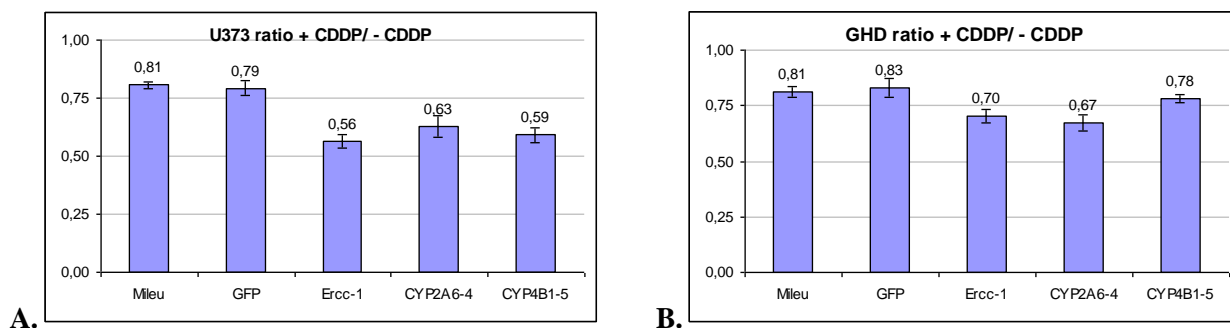


Figure 50 Chimio-sensibilisation de cellules U373 transfectées avec les siRNA CYP2A6 et CYP4B1
Effet de l'inhibition d'expression des gènes CYP2A6 et CYP4B1 sur la chimio-sensibilité des cellules U373 (A) et GHD (B).

Projet kinases

La transposition du test de chimio-sensibilité au format haut-débit a pu être effective grâce à notre collaboration avec la société TRANSAT. Nous avons ainsi criblé les gènes de kinases et phosphatases afin de rechercher leur rôle également dans la chimio-résistance mais aussi dans la prolifération. La société TRANSAT a en effet développé une collection de siRNA ciblant les kinases et phosphatases, avec le soutien de la LNCC. Cet outil est de toute première importance si l'on considère la place que prennent ces enzymes dans les mécanismes de progression tumorale.

La phosphorylation / déphosphorylation est le processus le mieux connu et sans doute le plus répandu de régulation de l'activité des protéines intracellulaires. Il est donc intimement lié à des mécanismes cellulaires clés comme la progression dans le cycle cellulaire, la survie/apoptose, l'adhérence intercellulaire ou au substratum, la communication intercellulaire...

Ce sont autant de points de dysfonctionnements cellulaires impliqués dans la progression tumorale. Pour tous, l'altération de la fonction de kinases et/ou phosphatases a été démontrée. Ces altérations qui jalonnent la progression tumorale (touchant par exemple PDGFR, EGFR, PTEN dans les gliomes ⁽¹⁹⁾) constituent alors des cibles thérapeutiques évidentes.

Les agents thérapeutiques emblématiques sont le Gleevec (ou Imatinib) ciblant PDGF-R, c-Kit et Abl, l'Iressa ciblant EGF-R, l'herceptine ciblant Erb-B2.

Les kinases et phosphatases sont encore l'objet d'intenses études dans des essais cliniques puisqu'elles représentent la cible de la moitié des petites molécules testées actuellement (Janice Reichert, communication SNO, Dallas, 2007).

L'importance de ces deux super-familles d'enzymes dans la biologie cellulaire justifie pleinement leur étude, quelle que soit la fonction cellulaire analysée. De plus, certaines kinases comme ATR, ATM ou DNA-PK sont impliquées dans la résistance à la chimiothérapie ⁽²⁵⁸⁾. Enfin, même s'il s'agit d'enzymes essentielles, les kinases et phosphatases comportent plus de 700 (518 kinases et 185 phosphatases) membres dont seules une centaine sont réellement connues.

Ces observations ont motivé notre étude collaborative sur l'implication des kinases et phosphatases dans la chimio-résistance des gliomes.

L'idée de cette collaboration était de transposer à un format d'un débit supérieur notre test de chimio-sensibilité. La société TRANSAT a, à sa disposition, du matériel robotisé qui permet d'augmenter l'échelle de production des résultats.



Figure 51 Protocole des tests de prolifération/chimio-sensibilité

Les cellules sont ensemencées en plaque 96, et transfectées le lendemain avec des siRNA dirigés contre des phosphatases et des kinases. Le traitement de chimiothérapie est appliqué 48h plus tard, et la viabilité est lue au 5^{ème} jour avec un test ATP.

Cette transposition n'a nécessité que peu de modifications par rapport à notre propre modèle. Le test est malgré tout effectué en format plaque 96 puits. Les cellules utilisées sont des U373 et la drogue de chimiothérapie, le cisplatine, tous deux fournis par notre laboratoire. La séquence des événements a également été conservée.

Les seuls changements appliqués concernent la cinétique et la révélation du test. A la différence du protocole établi précédemment, 2 jours sont laissés entre la transfection des siRNA et le traitement au CDDP. Quant au résultat, il est lu 2 jours, et non plus 4, après la chimiothérapie. Ces modifications sont adaptées à une lecture plus rapide.

Pour évaluer la viabilité cellulaire La société TRANSAT a opté pour un test ATP, écartant le test MTT jugé trop peu sensible, avec une gamme dynamique trop restreinte.

Un résultat n'est validé que lorsque le siRNA *erccl1* a induit un effet chimio-sensibilisant, et qu'au moins 2 siRNA sur les 3 dirigés contre le même gène ont induit le même phénotype. De plus, un gène est jugé d'intérêt lorsqu'il est responsable d'un effet au moins supérieur au quart de celui de *erccl1*, considéré comme contrôle positif.

La banque de siRNA dirigés contre les kinases/phosphatases était constituée de 3 siRNA qui, pour un certain nombre d'entre eux, ont été validés.

Ces travaux ont ainsi permis d'identifier 65 kinases et 17 phosphatases impliquées dans la chimio-résistance. De façon intéressante, parmi elles, 25 kinases et 9 phosphatases sont également impliquées dans la prolifération.

Les siRNA ATM ont par exemple entraîné la sensibilisation au CDDP des cellules U373 (cf.fig.52), impliquant cette kinase dans les mécanismes de chimio-résistance.

Viabilité cellulaire après traitement au CDDP

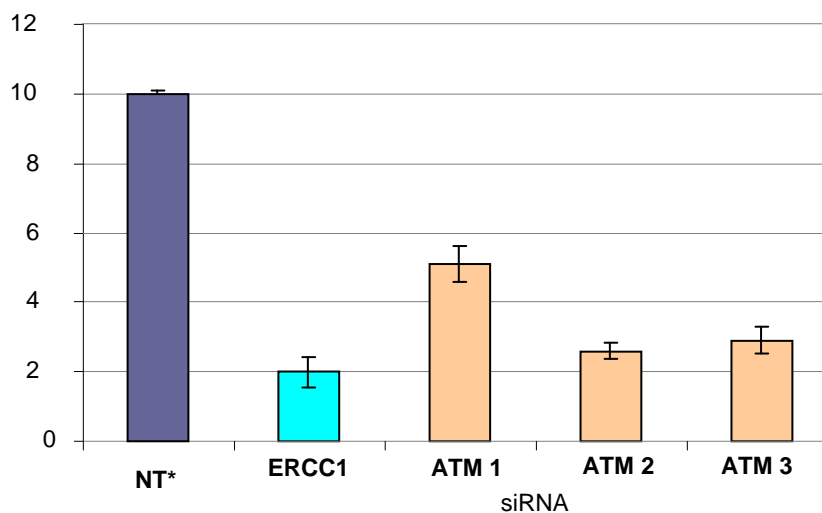


Figure 52 Effet de la transfection de siRNA ATM sur la chimio-sensibilité

Des cellules U373 ont été transfectées avec des siRNA ercc1 (150nM) et ATM, 24h après leur ensemencement en plaque 96 puits. Le CDDP est ajouté 48h après les siRNA et la viabilité est mesurée 2 jours après, par un test ATP.

L'expression de toutes les cibles a été mesurée dans les cellules U373 (Affymetrix) dans le cadre du programme CIT, soutenu par la LNCC. Cette analyse a été réalisée en parallèle sur des tumeurs humaines. L'analyse de ces données est en cours. La connaissance de l'expression de chacune des cibles dans le modèle d'étude valide les résultats obtenus avec chaque siRNA. Leur intérêt en tant que cible thérapeutique potentielle est quant à lui appuyé par l'expression mesurée dans le gliome.

Validation des résultats préliminaires

Les étapes de criblage ont permis de suggérer l'effet chimio-sensibilisant de nouveaux siRNA. Ces résultats préliminaires sur les lignées GHD et U373 ont été confirmés par la suite.

Extension de l'étude aux autres lignées

Cette étude a ensuite été étendue à 4 nouvelles lignées issues d'astrocytomes : LN229, U87, U138 et CCF. Nous observons un profil de sensibilisation différent pour chaque lignée. Toutefois, il est important de noter que le siRNA ercc1 augmente de manière très significative la mortalité des cellules traitées avec le CDDP pour 4 lignées sur 6. Il a par ailleurs l'effet le plus fort en sensibilisant les cellules de 14,1% à 24,9%, contre une sensibilisation de 10,1% à 17,6% pour les autres gènes (cf. tableau 6).

Il apparaît donc que ce gène a une place prépondérante dans les mécanismes de résistance à la chimiothérapie des gliomes.

	GFP		Ercc-1			Ercc-2			Mutyh			Pnkp		
	Mean	sem	moy	sem	DS	moy	sem	DS	moy	sem	DS	moy	sem	DS
U87	0,60	+/- 0,03												
LN229	0,77	+/- 0,04	0,58	+/- 0,03	24,7 **	0,64	+/- 0,02	16,9 **						
U138	0,59	+/- 0,02	0,50	+/- 0,02	14,1 **									
U373	0,74	+/- 0,04	0,59	+/- 0,02	19,9 **	0,62	+/- 0,02	15,8 **	0,61	+/- 0,02	16,9 **	0,61	+/- 0,03	17,6 **
GHD	0,59	+/- 0,04	0,45	+/- 0,02	24,9 **	0,53	+/- 0,04	10,1 *	0,53	+/- 0,03	10,8 *	0,52	+/- 0,02	12,1 *
CCF	0,88	+/- 0,05												

Tableau 6 Indice de chimio-sensibilité (CI) et sensibilisation à la drogue (DS) induite par les siRNA.

Données obtenues dans les conditions contrôle (siRNA GFP) et avec les siRNA d'intérêt sur 6 lignées de gliomes traitées au CDDP. Ces résultats sont la moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes. Toutes les analyses ont été réalisées et seuls les résultats significatifs sont présentés (** : différence très significative ($p < 0,01$) et * : différence significative ($p < 0,05$)).

Transposition du test de chimio-sensibilisation au témozolomide

Le témozolomide étant devenu le traitement de référence des gliomes en 2005, suite à la parution d'un essai clinique de phase III ⁽⁴⁴⁾, nous avons transposé notre étude à cet agent pour donner le maximum de pertinence à notre étude. En le diluant dans du DMSO, nous avons résolu les problèmes rencontrés au début de l'étude. Le TMZ dissous dans le DMSO peut être conservé à -20°C. Il conserve la quasi-totalité de son efficacité après 1 cycle de congélation alors qu'un deuxième le rend complètement inactif.

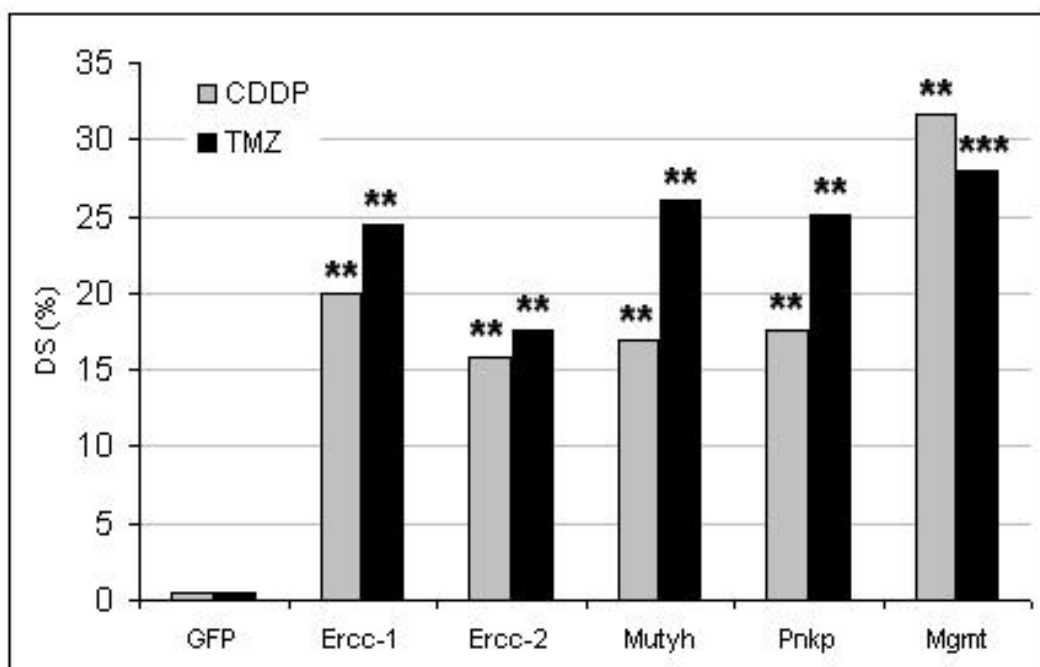


Figure 53 Indice de sensibilisation à la drogue (DS) induite par les siRNA d'intérêt

Valeurs comparées aux conditions contrôle (siRNA GFP) sur la lignée U373 traitée au cisplatine (CDDP) ou au témozolomide (TMZ). Ces résultats sont la moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes. Les analyses ont été réalisées et les résultats significatifs sont présentés ainsi : ** = $p < 0,01$ et * = $p < 0,05$.

	GFP		Ercc-1			Ercc-2			Mutyh			Pnkp		
	Mean	sem	moy	CI	sem	DS	moy	CI	sem	DS	moy	CI	sem	DS
U373	0,67	+/- 0,02	0,51	+/- 0,02		24,5 **	0,55	+/- 0,03		17,6 **	0,50	+/- 0,02		26,0 **
GHD	0,56	+/- 0,02	0,51	+/- 0,02		9,5 **								

Tableau 7 Indice de chimio-sensibilité (CI) et sensibilisation à la drogue (DS) induite par les siRNA. Obtenus dans les conditions contrôle (siRNA GFP) et avec les siRNA d'intérêt sur 2 lignées de gliomes, U373 et GHD traitées au TMZ. Ces résultats sont la moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes. Toutes les analyses ont été réalisées et seuls les résultats significatifs sont présentés (** : différence très significative (p<0,01) et * : différence significative (p<0,05)).

Les résultats obtenus sur la lignée U373 sont comparables à ceux obtenus avec le CDDP (cf.fig.53). Les effets sur GHD sont moins importants qu'avec le CDDP et passent en dessous du seuil de significativité statistique pour 3 gènes sur 4 (cf.tableau 7). Ces derniers résultats fonctionnels confirment la validité de notre démarche avec cette drogue utilisée en routine, avec en particulier le rôle majeur du gène *ercc1* dans les mécanismes de chimio-résistance.

Dans ces expériences, un siRNA dirigé contre *mgmt* a servi de contrôle positif, puisque la protéine correspondante est en grande partie responsable du retrait des O⁶-méthylguanines.

L'ensemble des travaux a été présenté au congrès annuel de l'EANO, à Vienne, Autriche, en septembre 2006 (cf. Annexe VII) : <http://www.medacad.org/eano2006/content/eano2006.htm> (P057/PB037 et P009/PB004) et a été soumis au journal *Plos Genetics* (cf. Annexe VIII)

Combinaisons des siRNA validés

Notre hypothèse de départ étant que la chimio-sensibilité des oligodendrogliomes résulte de la diminution combinée d'expression de plusieurs gènes des régions 1p et 19q, nous avons supposé que l'on sensibiliserait davantage les cellules en inhibant simultanément l'expression de plusieurs gènes. Nous avons donc transfecté les lignées avec des mélanges des différents siRNA déjà validés.

Combinaisons par 2

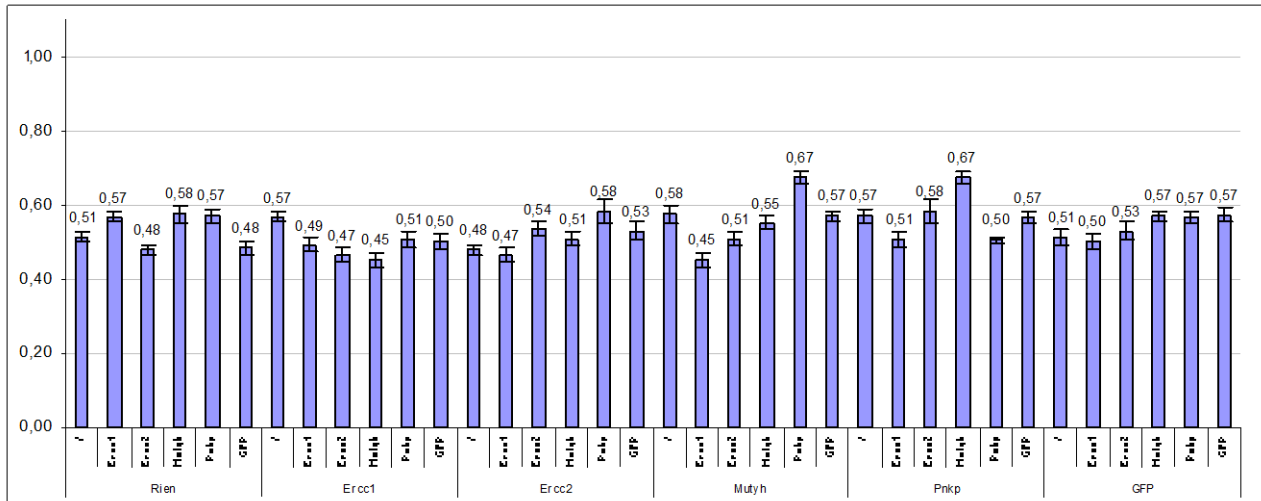
Nous avons commencé par les combinaisons deux par deux, en quantité totale équivalente à précédemment, soit 21 combinaisons sur les deux lignées U373 et GHD. Pour chacune de ces lignées nous avons déterminé 2 combinaisons relativement efficaces par rapport au contrôle GFP (cf.fig.54):

Pour GHD : Ercc1/Mutyh (55% de mortalité) et Ercc1/Ercc2 (53% de mortalité)

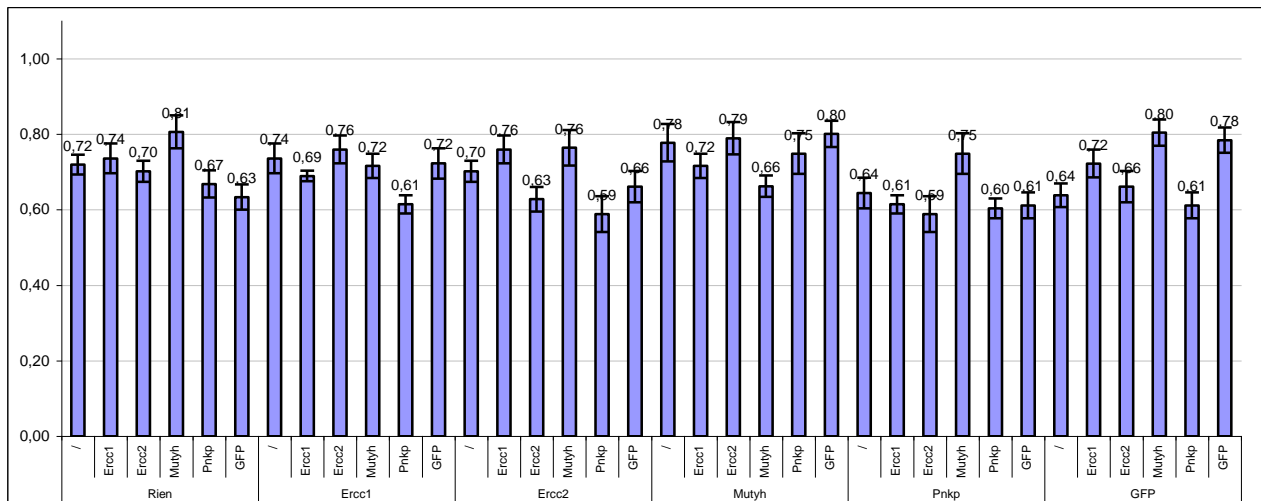
Pour U373 : Ercc1/Pnkp (39% de mortalité) et Ercc2/Pnkp (41% de mortalité)

Mais des analyses plus focalisées (incluant également de nombreuses modifications de paramètres tels que les quantités et proportions de siRNA) n'ont pas permis de valider ces résultats.

La même analyse, réalisée sur les autres lignées, n'a pas apporté plus de résultats.



A. GHD



B. U373

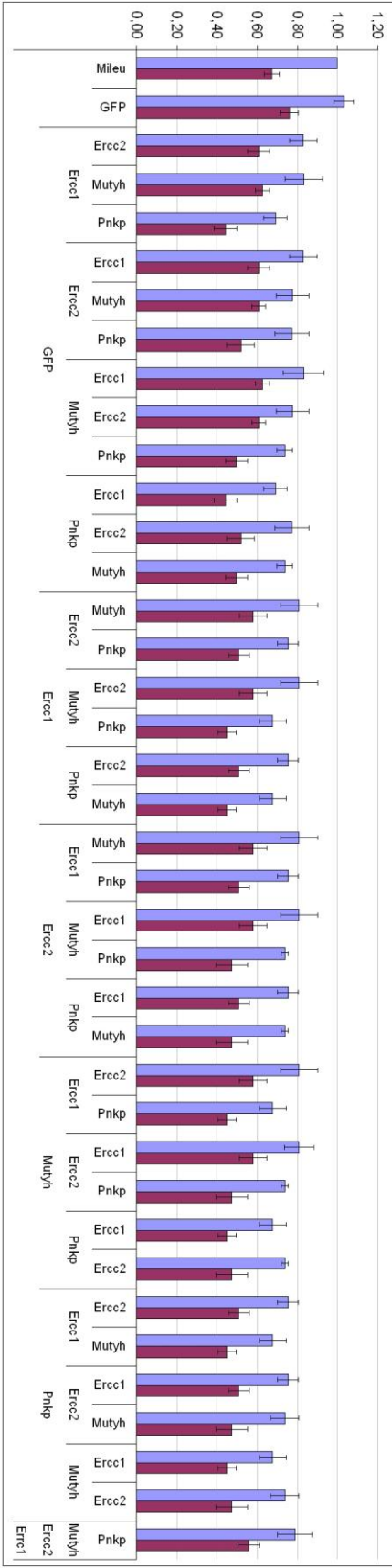
Figure 54 Effet chimio-sensibilisant des combinaisons de siRNA par 2

Survie cellulaire des lignées GHD (A) et U373 (B) transfectées avec des siRNA. Toutes les valeurs de survie en présence de CDDP (5.10^{-6} M) ont été rapportées à la survie obtenue en absence de CDDP.

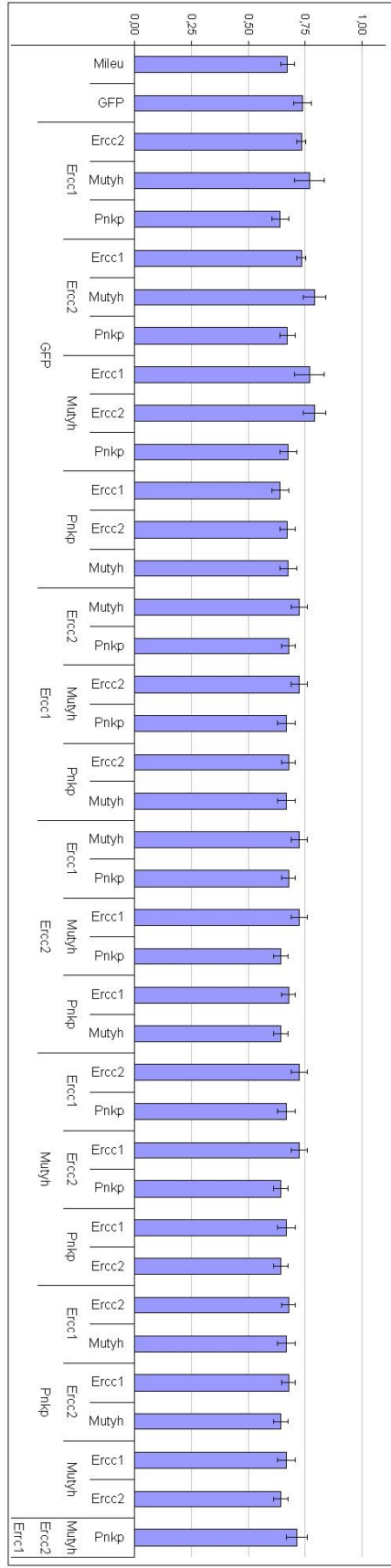
Combinaisons par 3 et 4

Nous avons ensuite essayé les combinaisons de 3 et 4 siRNA sur les lignées de gliomes GHD et U373. Finalement, aucune combinaison de 3 siRNA n'est efficace. La combinaison de 4 qui aurait pu offrir une solution « universelle » incluant les 4 siRNA d'intérêt en même temps n'a pas d'effet non plus (cf.fig.55). Ces différents résultats reflètent peut-être seulement notre incompréhension des mécanismes de transfection croisée et donc notre incapacité à la mettre en œuvre.

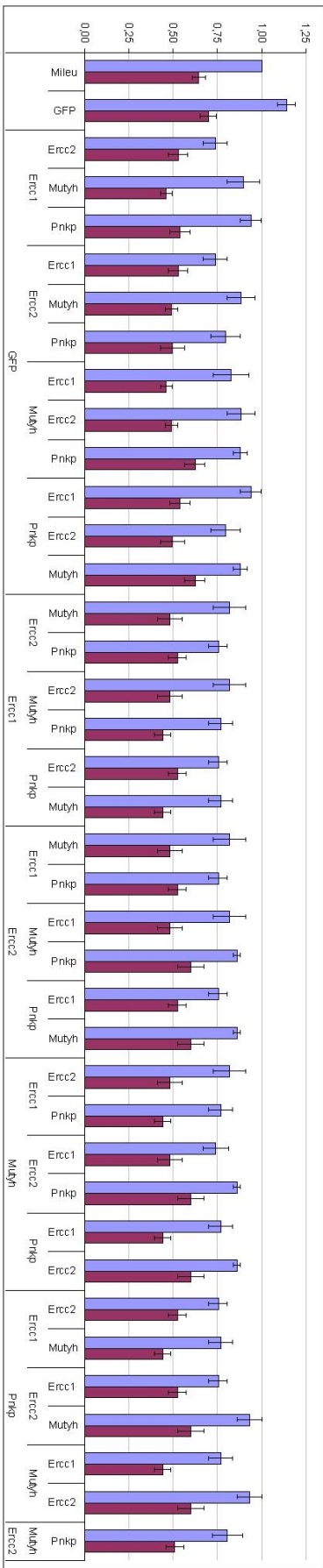
Il est malgré tout important de noter que dans l'ensemble de ces expériences, le siRNA ercc1 seul n'entraîne pas un effet chimio-sensibilisant comparable à celui observé précédemment. Ce qui signifie qu'à quantité équivalente, la manipulation des siRNA avant leur addition au milieu de culture les rend moins, si ce n'est plus du tout, efficaces. Nous ignorons à l'heure actuelle les raisons de cette perte d'efficacité.



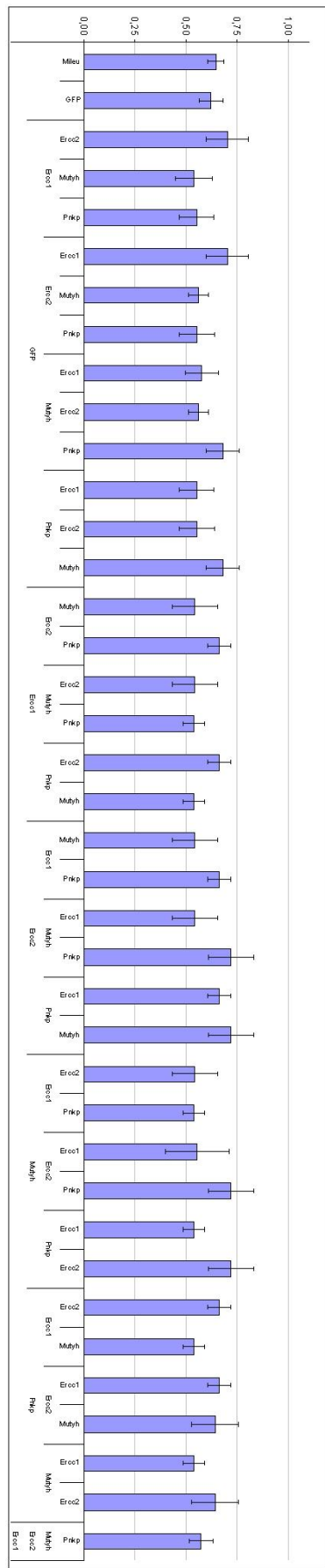
A.GHD



B.GHD



C.U373



D.U373

Figure 55 Effet des combinaisons de siRNA par 3 et 4

Survie cellulaire des lignées GHD (**A.** et **B.**) et U373 (**C.** et **D.**) transfectées avec des siRNA. **A.** et **C.** DO en absence (bleu) et en présence (rouge) de CDDP (5.10^{-6} M). **B.** et **D.** Survie cellulaire : rapports de la DO CDDP/DO contrôle.

L'ensemble des données sur les différentes lignées de gliomes nous a conduit à conclure que le gène *ercc1* est impliqué de la façon la plus générale dans la chimio-résistance des gliomes. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature concernant les autres types de tumeurs, ce qui désignait *ercc1* comme le candidat le plus prometteur pour une future étude clinique.

Validation de l'effet des siRNA au niveau moléculaire

Parallèlement aux études fonctionnelles, nous avons mesuré la quantité d'ARNm des 4 gènes cibles par PCR quantitative (qRT-PCR) afin d'évaluer le pourcentage d'inhibition de l'expression et sa spécificité, dans le but d'une part de conforter au niveau moléculaire l'effet mesuré au niveau fonctionnel et d'autre part de tenter de comprendre les variabilités de l'effet des siRNA entre les différentes lignées.

Mise au point des qRT-PCR

Il était nécessaire dans un premier temps de produire une gamme de concentrations d'ADNc de chacun des gènes concernés (cf.tableau 8 et fig.56) afin de déterminer l'équation exponentielle reliant le nombre de cycles d'amplification à la concentration initiale d'ADNc, et donc d'ARNm.

	Taille de l'amplifiat	Concentration du produit (ng/μl)	Masse molaire du produit (g/mol)	Concentration du produit (fmol/μl)	Equation
Erccl	121	11,5	74 415	154,5	Qté = 41,747e(-0,614xCP)
Erccl2	200	2,2	123 070	17,9	Qté = 7,6605e(-0,6028xCP)
Mutyh	200	3,5	123 088	28,4	Qté = 1,6556e(-0,6337xCP)
Pnkp	206	12,6	126 775	99,4	Qté = 1493,7e(-0,68xCP)
Mgmt	161	220	99 058	2220,9	Qté = 126,55e(-0,6676xCP)

Tableau 8 Paramètres des qRT-PCR

Pour les gènes *ercc1*, *ercc2*, *mutyh*, *pnkp* et *mgmt*. CP = Crossing Point

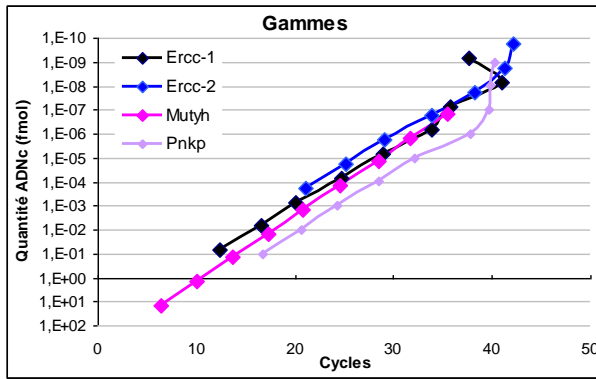


Figure 56 Gammes d'ADNc analysées en qRT-PCR. Les différents points d'une gamme de dilution d'une quantité connue d'ADNc de chacun des gènes d'intérêt sont analysés en qRT-PCR.

Inhibition d'expression induite par les siRNA

Les siRNA diminuent l'expression de tous les gènes d'intérêt sur les deux lignées testées, GHD et U373 : de 44,2 % (U373 ; pnkp) à 95,7 % (U373 ; ercc2) (cf. tableau 9). L'inhibition efficace de l'expression d'un gène (>95%) ne peut se traduire au niveau fonctionnel que s'il est impliqué.

	quantified mRNA	Inhibition (%)	p (ANOVA)
GHD	ercc1	58,6	0,019
	ercc2	61,6	0,011
	mutyh	71,0	0,004
	pnkp	83,8	0,005
U373	ercc1	77,4	0,018
	ercc2	95,7	0,003
	mutyh	72,9	0,007
	pnkp	44,2	0,013
	mgmt	80,4	<0,0001

Tableau 9 Efficacité des siRNA

Pourcentage d'inhibition d'expression du gène ciblé par le siRNA par rapport à la condition témoin (siRNA GFP).

Etude de l'expression des gènes d'intérêt

• Dans les lignées cellulaires

Nous avons ensuite recherché une corrélation entre l'expression des gènes et la chimio-sensibilisation ou l'impact des siRNA. Nous avons pour cela mesuré l'expression des divers gènes, en absence (expression basale) et en présence (expression induite) de drogue de chimiothérapie dans les différentes lignées (cf. tableau 10).

		GHD		LN229		U138		U373		U87		CCF	
		Qty	sem	Qty	sem	Qty	sem	Qty	sem	Qty	sem	Qty	sem
Ercc1	Basal	33	13	33	13	40	17	11	5	25	10	8	4
	Induced	35	15	78	30	97	36	12	6	25	10	12	6
	%	104		233		242		110		99		148	
Ercc2	Basal	10	3	4	1	21	4	14	1	5	1	2	1
	Induced	17	5	11	1	66	15	17	4	5	1	3	1
	%	163		268		312		122		96		196	
Mutyh	Basal	108	19	137	52	185	43	49	33	91	28	45	20
	Induced	114	14	439	44	469	157	135	41	101	37	117	40
	%	105		320		254		278		110		257	
Pnkp	Basal	94	28	137	35	550	116	115	31	224	50	76	20
	Induced	83	23	283	70	1 198	171	149	4	196	63	130	29
	%	88		206		218		130		88		171	

Tableau 10 Expression des gènes d'intérêt dans les lignées

Expression (en 10^{-6} fmol) des 4 gènes d'intérêt dans les 6 lignées d'astrocytomes en absence (basal) et en présence de CDDP (induced), ainsi que le pourcentage d'induction calculé.

Il n'existe pas de lien direct et simple entre l'expression des gènes de réparation, au niveau de l'ARNm, et la chimio-résistance ou la sensibilité aux siRNA. L'évaluation de l'expression des gènes au niveau de l'ARN ne permet donc pas d'expliquer ou de pronostiquer la sensibilité d'une cellule à un siRNA, même si l'on détermine l'implication de ce gène dans la fonction étudiée.

• Dans les tumeurs

Nous avons également mesuré l'expression des 4 gènes d'intérêt dans des extraits de tumeurs répondant (oligodendrogliomes) ou non (glioblastomes) aux traitements. Pour 3 des 4 gènes (*ercc1*, *ercc2* et *mutyh*), l'expression est jusqu'à 2 fois moindre dans les tumeurs sensibles que dans celles qui résistent à la chimiothérapie (cf. fig.57). Si *pnpk* participe à la réparation des dommages de l'ADN causés par la chimiothérapie, il n'est pas responsable de la différence de sensibilité à la chimiothérapie observée entre les oligodendrogliomes et les glioblastomes.

Par contre, la surexpression et l'implication de *ercc1*, *ercc2* et *mutyh*, pourrait rendre compte, pour une part, de la chimio-résistance des astrocytomes.

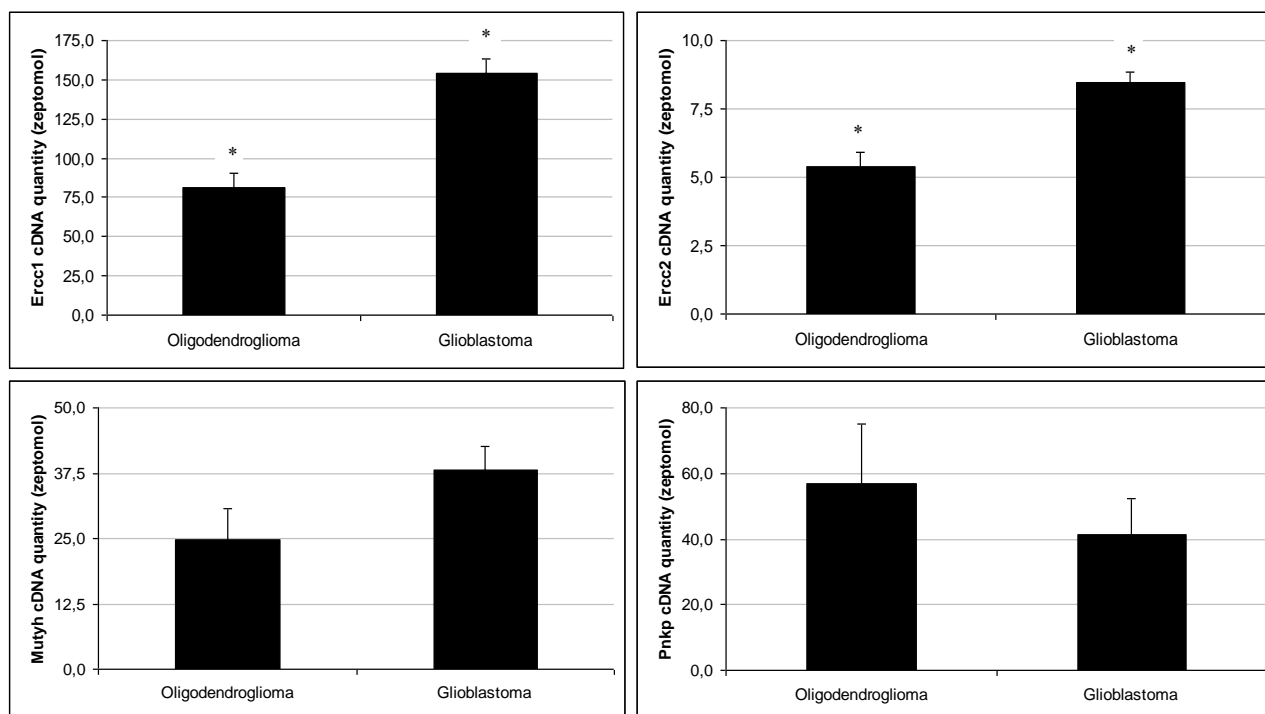


Figure 57 Expression des gènes d'intérêt dans les tumeurs humaines
 Expression des gènes *ercc1*, *ercc2*, *mutyh* et *pnkp* (10^{-21} mol) mesurée par qRT-PCR à partir d'ARN extraits de tumeurs prélevées chez des patients, répondant (oligodendrogliomes, n=5) ou non (glioblastomes, n=5) à la chimiothérapie. Les résultats sont statistiquement significatifs quand $p < 0,005$ (*).

Ces travaux, réalisés pour l'instant sur quelques échantillons, demandent néanmoins à être confirmés sur une plus grande cohorte de tumeurs.

Dépôt de brevet

Un brevet protégeant l'utilisation de siRNA comme outil thérapeutique dans le contexte de la chimio-sensibilisation des cellules cancéreuses a été déposé le 23 juillet 2007 (cf. Annexe VI).

Titre : « Sensitization of cancer cells to therapy using siRNA targeting genes from the 1p and 19q chromosomal region ».

Inventeurs : BERGER François, PELLETIER Laurent, ISSARTEL Jean-Paul, BOCCARD Sandra

Priorité : Europe 06291241.5 du 31 juillet 2006

IV. ANALYSE PRECLINIQUE DE L'INTERET D'UNE STRATEGIE DE KNOCK DOWN DES GENES DE REPARATION

Les résultats obtenus dans la partie *in vitro*, leur application thérapeutique prometteuse ainsi que l'absence de littérature démontrant sans équivoque l'accessibilité des siRNA aux tumeurs, ont suscité au sein de notre équipe l'ambition d'un projet plus vaste soumis au Professeur Jacqueline Godet, Présidente de la Ligue Nationale Contre le Cancer.

Un consortium de « validation préclinique de siRNA d'intérêt pour la thérapie anti-cancéreuse » a ainsi été créé. Il regroupe cinq laboratoires académiques ainsi que deux entreprises de biotechnologie et a pour but d'amener au stade d'étude clinique. Ce projet a émergé en grande partie à partir du projet iCancérodrops dont les résultats nécessitaient de nouveaux développements. Les études précliniques en cours doivent démontrer l'efficacité, la spécificité, l'absence de toxicité, la stabilité ainsi que la localisation tissulaire des produits chez l'animal. Dans cette étude multicentrique, différents siRNA sont en cours de validation pour leur intérêt thérapeutique.

Au terme de l'étape *in vitro* des travaux, nous avons à notre disposition 3 gènes de réparation de l'ADN candidats pour chimio-sensibiliser les tumeurs à des agents alkylants. Le but ultime de ce projet étant de développer un traitement chimio-sensibilisant qui améliorerait la prise en charge médicale des patients porteurs de gliomes, une étape préclinique s'imposait.

Ces études ont nécessité dans un premier temps de nombreuses mises au point afin d'établir des modèles pertinents pour mettre à l'épreuve chacune des stratégies.

Mise au point de modèles tumoraux chez la souris

Tumeurs en position sous-cutanée

Nos résultats *in vitro* ont été obtenus sur différentes lignées cellulaires d'astrocytomes. Il était par conséquent important de développer des modèles *in vivo* de ces lignées, qui assurent à la fois une prise tumorale rapide, homogène et reproductible.

Toutes les lignées ne sont pas tumorigènes, même dans un organisme immuno-déficient tel que la souris *nude*. Nous avons donc développé 3 modèles tumoraux, à partir des lignées U373, U87 et LN229.

La prise tumorale de ces lignées d'origine, pouvait atteindre jusqu'à plus de 3 mois avec un taux d'échec d'environ 30% et une cinétique inégale, ce qui était incompatible avec la réalisation d'expériences *in vivo*. Par passages successifs chez l'animal et remises en culture, nous avons

obtenu des lignées « *in vivo* » qui peuvent former des tumeurs en 2 semaines chez plus de 95% des animaux, et dont la croissance est homogène d'un animal à l'autre.

Nous avons ainsi établi 3 nouvelles lignées pour les tumeurs sous-cutanées : U373 IV3, LN229 IV1 et U87 IV1, dont nous avons congelé un grand nombre d'ampoules dans l'azote, afin de partir des mêmes cellules pour chaque expérimentation.

Nous avons aussi défini une quantité de cellules à injecter pour que les tumeurs apparaissent de manière homogène en 2 semaines. Il nous fallait ainsi injecter 750 000 cellules dans un volume de 100 µl de milieu de culture.

Tumeurs en position intra-cérébrale

Notre sujet d'étude étant les gliomes, nous ne pouvions nous contenter de travailler sur des tumeurs hétérotopiques. Nos expérimentations ont dû par conséquent être réalisées sur des modèles de tumeurs cérébrales. Nous avons dans un premier temps utilisé les lignées établies précédemment. Malheureusement, les tumeurs se développaient majoritairement en position intra-crâniale mais extra-cérébrale.

Mise au point de l'administration des siRNA

Dans le cadre du projet iCancéroDrops financé par la LNCC, nous avons collaboré avec l'équipe du Dr O. Filhol-Cochet pour la réalisation d'expérimentations chez l'animal en ciblant le gène CK2 β . Ce siRNA est spécifique de l'ARNm de la sous-unité régulatrice β de la Casein Kinase 2 (CK2) dont l'activité est dérégulée dans les cellules tumorales ⁽²⁵⁹⁾. CK2 est un complexe tétramérique composé de 2 sous-unités catalytiques (CK2 α et CK2 α') et de 2 sous-unités régulatrices (CK2 β 2). L'activité de CK2 β est régulée par l'association des sous-unités catalytiques avec les sous-unités régulatrices. La protéine CK2 β est engagée dans diverses voies de signalisation cellulaires et notamment dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose ⁽²⁶⁰⁾. L'implication de CK2 β dans le développement du phénotype anormal en fait une cible thérapeutique potentielle pour le traitement des cancers.

Le gène CK2 β possède un potentiel oncogénique direct et indirect ^(259, 261) et l'efficacité de son knock down est indépendante d'un traitement adjuvant tel que la chimiothérapie. L'utilisation de siRNA dans un premier temps, permettait de s'affranchir de la mise au point d'un modèle de double traitement siRNA/chimiothérapie. Nous avons ainsi injecté des siRNA dirigés contre CK2 β à des souris *nude* porteuses de tumeurs murines en position sous-cutanée, GL26.

Suite à nos lectures de la littérature et à des discussions avec d'autres équipes qui commençaient à s'intéresser à l'utilisation des siRNA *in vivo*, nous avons commencé par injecter quotidiennement, pendant 2 semaines et par voie intra-péritonéale, 2 µg de siRNA nu, dilués dans de l'eau. Les injections ont débuté quand les tumeurs avaient un volume d'environ 250mm³. Nous avons alors constaté une diminution de la masse tumorale d'environ 35% (cf.fig.58) lorsque les souris étaient traitées avec les siRNA CK2β, comparé à 2 autres siRNA.

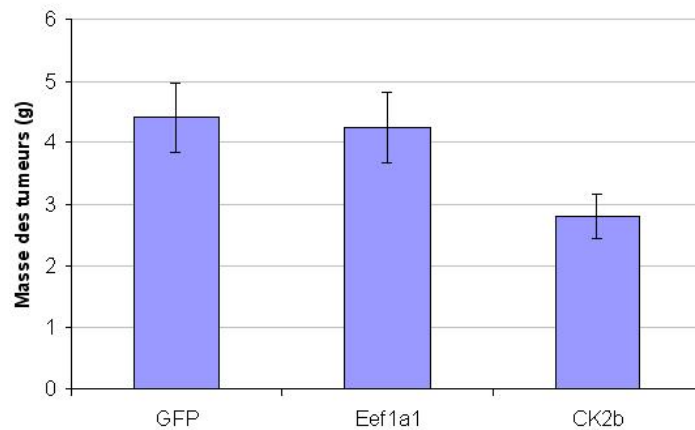


Figure 58 Effet du siRNA CK2β sur la croissance de tumeurs GL26

21 souris *nude* porteuses de tumeurs GL26 en position sous-cutanée ont reçu des injections quotidiennes de 2 µg de siRNA GFP, Eef1a1 ou CK2β, dilués dans de l'eau. Les souris sont sacrifiées après les 2 semaines de traitement et les tumeurs sont pesées.

Après cette première expérience, nous avons cherché à optimiser le protocole. Pour cela, nous avons utilisé d'autres méthodes de transfection. Les siRNA ont été injectés mélangés à un transfectant, le PEI (in vivo Jet PEI, Polyplus, France) ou avec un groupement cholestérol greffé. Les siRNA-cholestérol n'ont apporté aucune amélioration de l'effet anti-tumoral, au contraire du PEI avec lequel nous avons obtenu une diminution d'environ 50% de la masse tumorale (cf.fig.58).

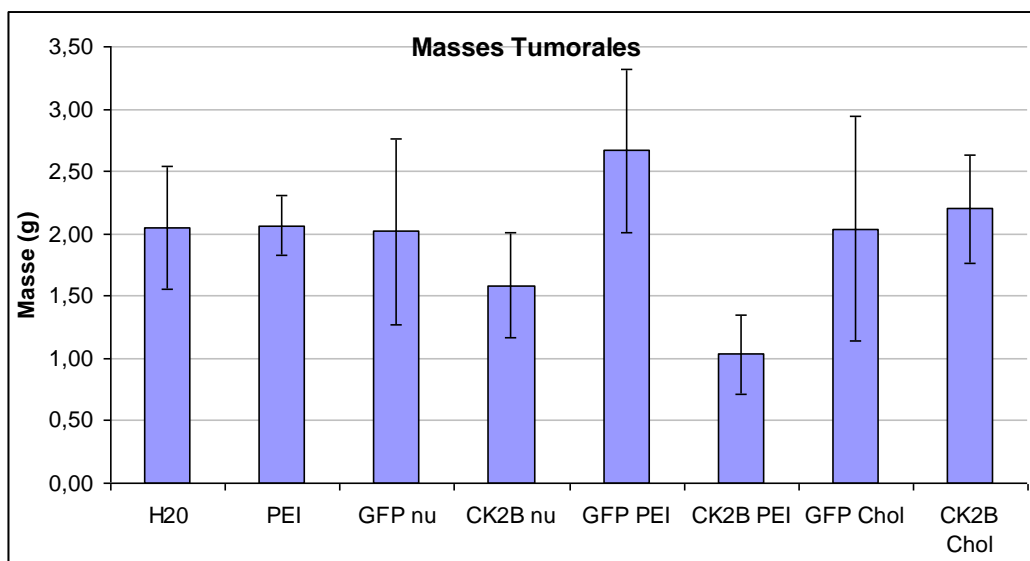


Figure 59 Effet de différents traitements siRNA CK2 β sur la croissance tumorale
 Masses de tumeurs GL26 implantées en position sous-cutanée chez des souris *nude* en fonction des différents traitements : siRNA GFP ou CK2 β nu, associés à des groupements cholestérol ou transfectés avec du PEI.

Des expérimentations plus approfondies sur l'effet du siRNA CK2B ont été réalisées en testant d'autres conditions d'injection telles que l'espacement temporel des injections (cf.fig.60).

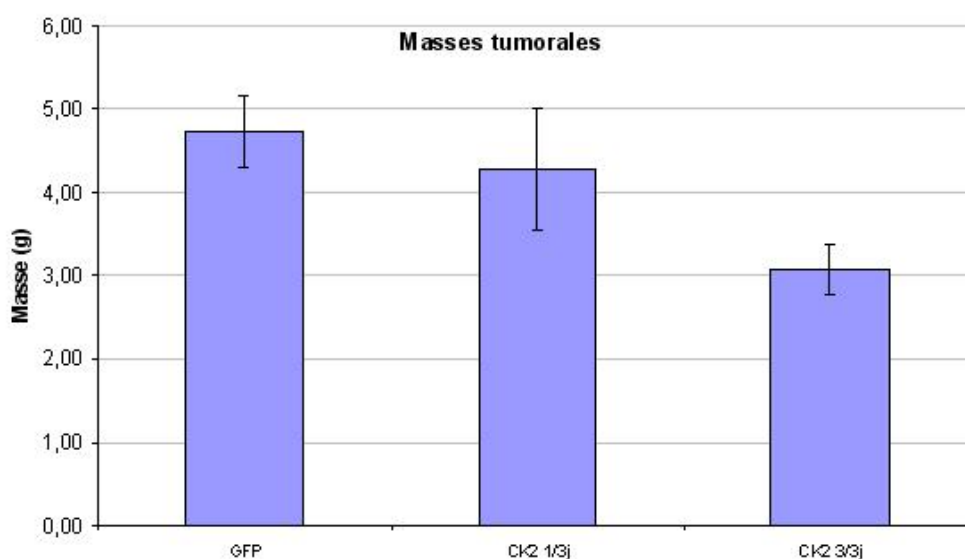


Figure 60 Effet de différents traitements siRNA CK2 β sur la croissance tumorale
 Masses tumorales (g) de souris *nude* en fonction des différents traitements : siRNA GFP ou CK2 β transfectés avec du PEI-glucose, tous les jours ou 1 jour sur 3 (1/3j) pendant 10 jours.

Il est ressorti de ces diverses expériences, que la condition qui diminuait au mieux le développement de la tumeur était 2 μ g de siRNA dans du PEI-glucose, administré tous les 2 jours.

Nous avons ensuite effectué un test de survie, en injectant les cellules tumorales non plus en position sous-cutanée, mais en position intra-cérébrale. Nous avons pour cela réalisé un test de Kaplan-Meier, dont le résultat a été négatif (cf.fig.61).

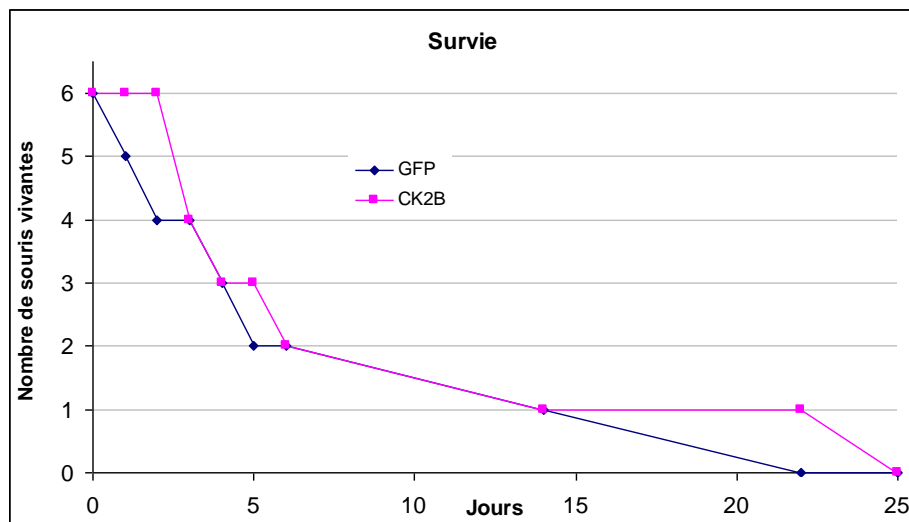


Figure 61 Survie de souris porteuses de tumeurs intra-cérébrales GL26
Survie des souris (jours) en fonction des différents traitements : siRNA GFP ou CK2 β , transfectés avec du PEI-glucose chez des souris C57/bl6 Charles River, tous les jours pendant 10 jours. Le jour J1 correspond à la date de la première souris morte, et qui correspond à 30 jours post-implantation.

Ces expériences ont permis, outre la démonstration d'un effet thérapeutique des siRNA CK2 β , de mettre au point et de valider, l'utilisation et l'efficacité des siRNA dans nos conditions expérimentales. La transposition à l'animal de nos résultats obtenus *in vitro* était ainsi aisément applicable. Nous avons donc amorcé leur validation *in vivo*.

Mise en place du protocole de chimiothérapie

Afin de transposer nos résultats *in vitro* chez l'animal, nous avons dans un premier temps défini les meilleures conditions de chimiothérapie (Temodal®) sur les lignées tumorales établies précédemment, c'est-à-dire une concentration suboptimale permettant l'observation d'un éventuel effet des siRNA sur la croissance tumorale. Nous avons ainsi testé 3 concentrations à partir des paramètres définis dans certains travaux de la littérature ⁽²⁶²⁾, à savoir 42 mg/kg, ce qui équivaut pour une souris de 20g à 0,84mg (cf.fig.62).

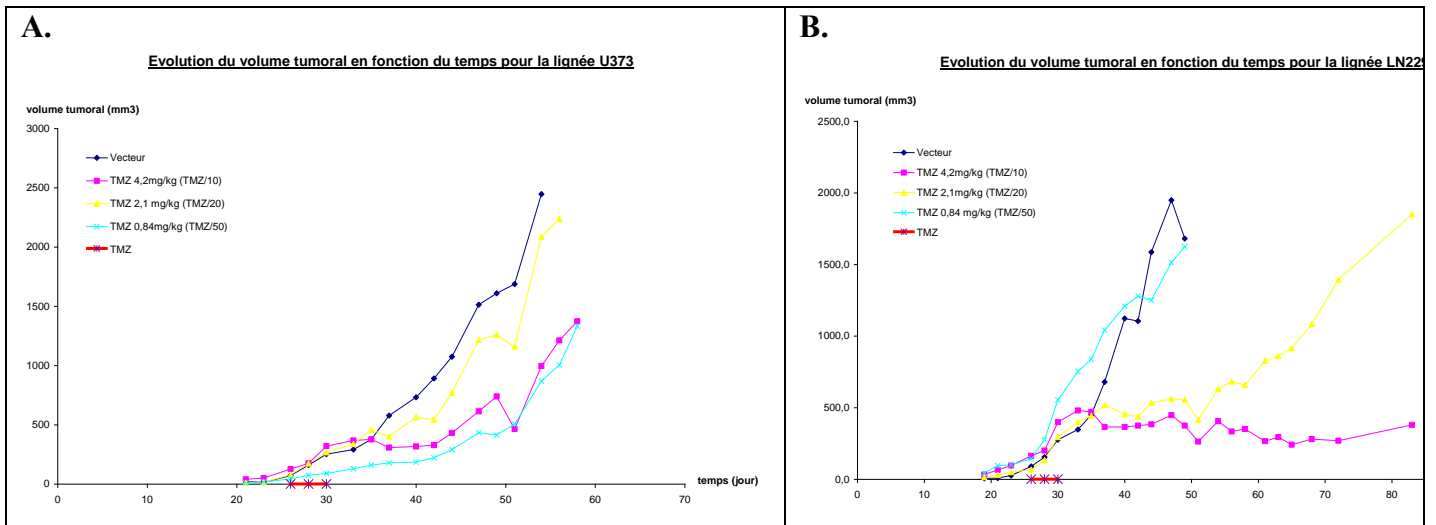


Figure 62 Effet de différents traitements de chimiothérapie sur la croissance de tumeurs sous-cutanées.

Volume (en mm³) de tumeurs sous-cutanées U373 IV3 (A) et LN229 IV1 (B) injectées à des souris *nude*, traitées *per os* pendant 5 jours avec 4 concentrations différentes de Temodal® (TMZ) dilué dans du jus d'orange (Vecteur). Groupes A et E : vecteur ; Groupes B et F : TMZ à 4,2mg/kg (TMZ/10) ; Groupes C et G : TMZ à 2,1mg/kg (TMZ/20) ; Groupes D et H : TMZ à 0,84mg/kg (TMZ/50).

A la vue de l'ensemble des données, nous avons décidé d'utiliser la chimiothérapie diluée au dixième pour la lignée U373 IV3 et au vingtième pour la lignée LN229 IV1.

Effet du traitement chimio-sensibilisant sur la croissance de tumeurs en position sous-cutanée

Nous avons pour commencer implanté des cellules U373 IV3 en position sous-cutanée chez des souris *nude*. Lorsque les tumeurs ont commencé à apparaître, c'est-à-dire à former un bouton visible sous la peau, nous avons injecté pendant 10 jours, deux siRNA différents dirigés contre le gène *erccl1* (*erccl1-1* et *erccl1-3*). Pendant les 5 derniers jours de ces traitements, nous avons également appliqué la chimiothérapie. Les tumeurs ont été mesurées régulièrement pour évaluer l'effet des traitements. Cette expérience a été réalisée 4 fois (cf.fig.63) :

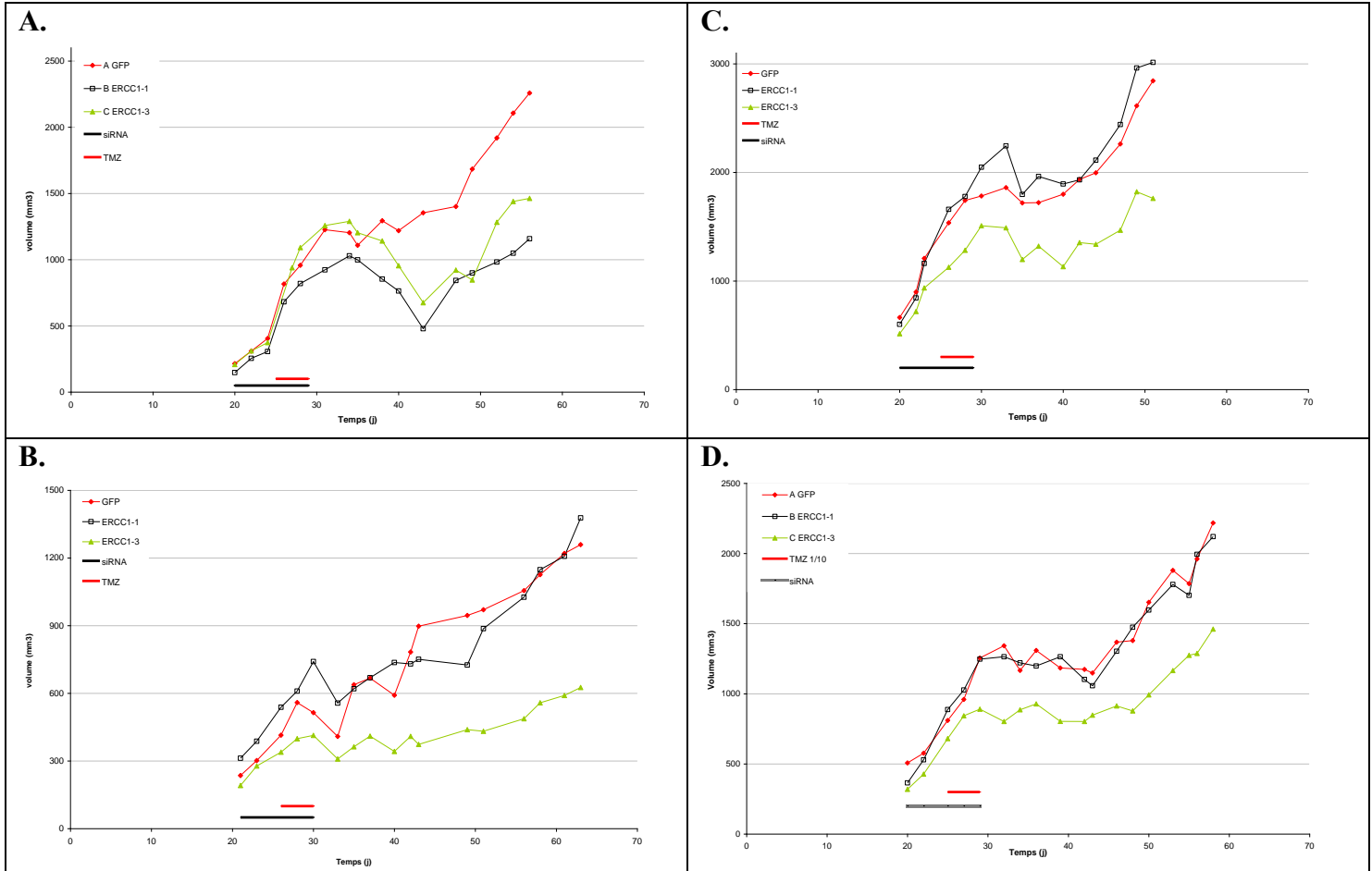


Figure 63 Effet des différents traitements de siRNA sur la croissance de tumeurs sous-cutanées U373 IV3.

Volume (en mm³) de tumeurs sous-cutanées U373 IV3 injectées à des souris *nude*, traitées 10 jours par voie intrapéritonéale avec 4 µg de siRNA GFP (noir), ercc1-1 (rouge), ercc1-3 (verte) et au témozolomide (4,2mg/kg) *per os* pendant les 5 derniers jours du traitement siRNA. Cette expérience a été reproduite 4 fois (A. à D.)

L'ensemble des résultats de ces 4 expériences a été analysé d'un point de vue statistique. Il en ressort que le siRNA ercc1-3 diminue de plus de 36% le volume tumoral, et de 30% la masse tumorale (cf.fig.64).

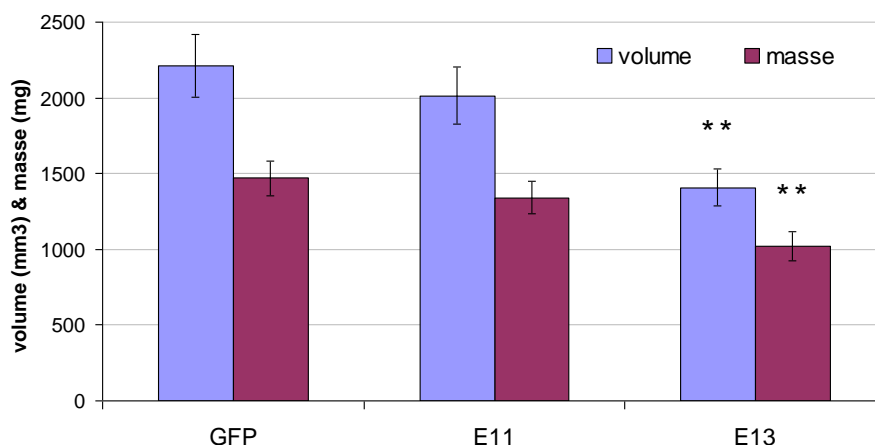


Figure 64 Effet des différents traitements de siRNA sur la croissance de tumeurs sous-cutanées U373 IV3.

Volume (en mm³) et masse (en mg) de tumeurs sous-cutanées U373 IV3 injectées à des souris nude, traitées 10 jours par voie intra-péritonéale avec 4 µg de siRNA GFP, ercc1-1, ercc1-3, et au témozolomide (TMZ/10) *per os* pendant les 5 derniers jours du traitement siRNA. (** : p<0,001)

Effet du traitement chimio-sensibilisant sur la croissance de tumeurs en position intra-crânienne

Le tropisme des gliomes étant cérébral, nous avons par la suite testé l'effet de ce même traitement sur des tumeurs implantées dans le cerveau des souris. Nous avons cette fois encore utilisé la lignée U373 IV3.

La première expérience a été un test de survie de Kaplan-Meyer réalisé sur 2 groupes de 12 souris chacun. Les souris mortes ont été comptabilisées chaque jour. Toutes les souris ne sont pas mortes à la fin de l'expérience.

Ce résultat montre une tendance d'une amélioration du pronostic due à l'injection de siRNA ercc1-1. Il n'est toutefois pas statistiquement significatif (cf.fig.65).

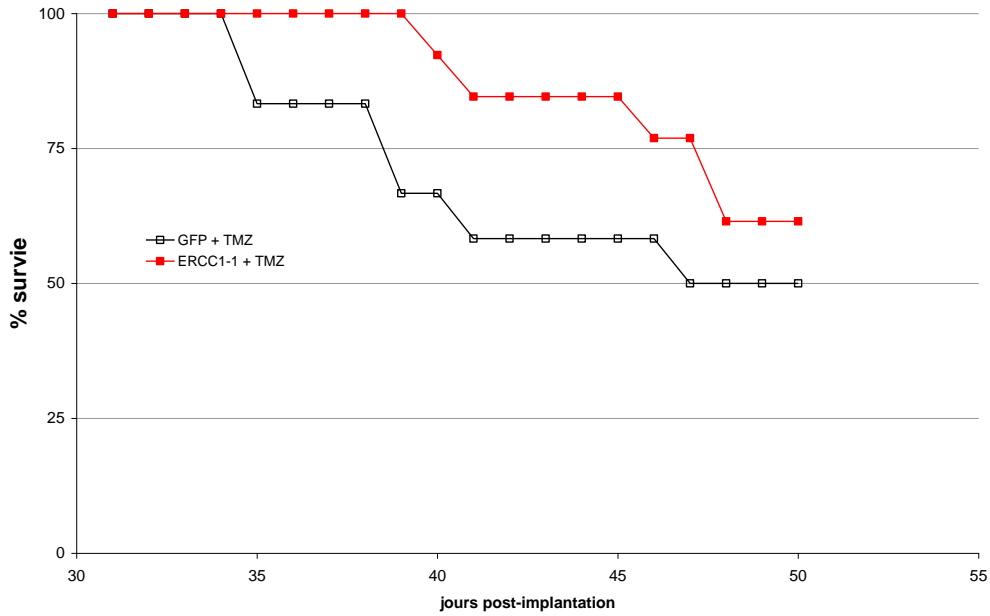


Figure 65 Test de survie de souris implantées en position intra-cérébrale avec des cellules U373 IV3

Des cellules U373 IV3 ont été implantées dans le cerveau de souris *nudes*. Deux semaines après l'implantation, les souris ont été traitées 10 jours par voie intra-péritonéale avec 4 µg de siRNA GFP et *ercc1-1* et au témozolomide (TMZ/20) *per os* pendant les 5 derniers jours du traitement siRNA. Les souris décédées ont été comptabilisées quotidiennement.

Pour la deuxième expérience, les souris ont toutes été sacrifiées au même jour, aux environs de 2 mois. Les tumeurs cérébrales ont été prélevées et pesées (cf.fig.66).

Là encore, le résultat montre une tendance en faveur du traitement *ercc1*, mais il n'est pas statistiquement significatif.

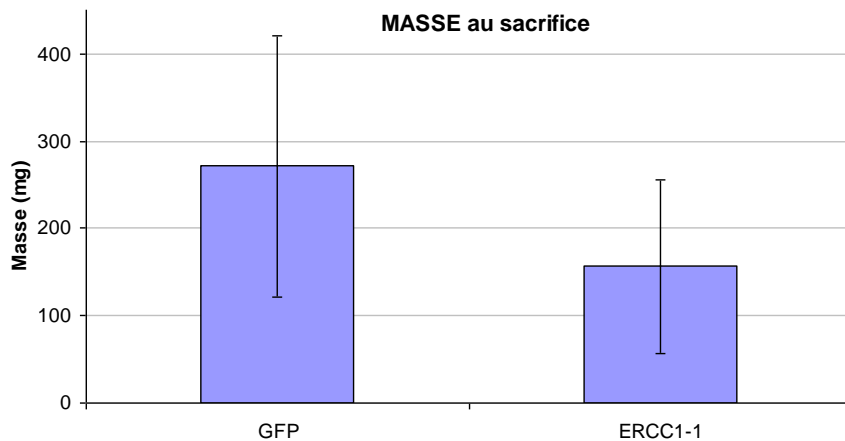


Figure 66 Masse des tumeurs U373 IV3 implantées en position intra-cérébrale chez la souris *nude*

Masse (en mg) de tumeurs intra-crâniennes U373 IV3 injectées à des souris *nude*, traitées 10 jours par voie intra-péritonéale avec 4 µg de siRNA GFP et *ercc1-1* et au témozolomide (TMZ/10) *per os* pendant les 5 derniers jours du traitement siRNA.

Contrairement à ce que nous avons observé dans les expérimentations sous-cutanées, le développement des tumeurs dans le cerveau n'a été ni systématique ni régulier. Malgré leur injection en profondeur dans le *striatum*, les cellules tumorales ont eu tendance à se développer entre le cerveau et la boîte crânienne, déformant cette dernière sans entraîner forcément de symptômes neurologiques.

Nous avons dans un premier temps pensé que ce phénomène provenait d'un reflux des cellules en dehors du cerveau après l'injection, et décidé d'implanter les cellules prises dans un petit bloc d'Agar afin d'empêcher cette migration des cellules en dehors du lieu d'injection.

Finalement, nous pensons qu'en réalité, ce problème proviendrait plutôt du fait que l'établissement de la lignée a été fait dans la patte de la souris, ce qui a certainement entraîné la sélection d'un contingent cellulaire à tropisme principalement sous-cutané.

Nous avons ainsi initié l'établissement de nouvelles lignées issues toujours des lignées commerciales U373, LN229 et U87 que nous avons injectées dans le cerveau de souris *nude*, afin cette fois-ci de sélectionner des populations à tropisme cérébral.

V. ANALYSE DE LA BIO-DISTRIBUTION DE LA MOLECULE THERAPEUTIQUE

Toujours dans le contexte du Consortium, nous avons réalisé l'imagerie de siRNA, en collaboration avec l'unité INSERM U877, Radiopharmaceutiques Biocliniques (D.Fagret) et EMI 104 (C. Cochet).

Etant donné le potentiel thérapeutique que représentent les siRNA, beaucoup de travaux ont pour vocation de préparer leur administration chez l'Homme. En tant que médicaments potentiels, les siRNA doivent faire l'objet d'études pharmaco-toxicologiques complètes. Si l'efficacité, l'administration ou encore la toxicologie sont aujourd'hui connues, il reste à déterminer le devenir de ces molécules dans l'organisme. Les différentes études menées dans ce sens sont parcellaires⁽²⁴³⁾ et ne permettent pas d'établir la pharmacocinétique des siRNA.

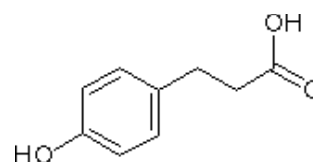
La technique d'imagerie choisie est l'imagerie nucléaire. Cette technique repose sur l'injection par voie intraveineuse de molécules d'intérêt radiomarquées appelées radiopharmaceutiques, spécifiques d'une cible ou d'un mécanisme biologique remarquable. On peut ainsi obtenir des images fonctionnelles et métaboliques de la cible par détection externe des émissions radioactives à l'aide de caméras sensibles aux émissions gamma (Tomographie d'Emission MonoPhotonique, TEMP) ou aux positons (Tomographie par Emission de Positons, TEP).

L'originalité de cette étude réside dans le fait que tous les aspects de l'utilisation d'un siRNA *in vivo* sont évalués. En effet, bien que de nombreuses études aient été menées pour démontrer l'efficacité des siRNA, aucune étude complète n'a été réalisée sur la pharmacocinétique d'une molécule pourtant destinée à être administrée à l'Homme. Peu d'études ont mis en évidence une biodistribution des siRNA et les résultats obtenus ne sont que parcellaires. Ces travaux sont pour la plupart restreints à la seule vérification de la biodistribution des siRNA à un temps donné⁽²⁴³⁾ et ne permettent pas d'établir les caractéristiques pharmacocinétiques du produit. De plus, peu d'études prennent en compte l'efficacité du siRNA testé : les siRNA utilisés ne possèdent pas de cibles thérapeutiques ou encore ne sont pas soumis à comparaison avec un siRNA contrôle^(240, 263). Cette étude a donc consisté à mettre au point toutes les étapes nécessaires à la réalisation de l'imagerie d'un siRNA *in vivo*.

Nous avons utilisé pour cela 2 siRNA : un siRNA fonctionnel spécifique de CK2 β et un siRNA contrôle dirigé contre la GFP. Afin de réaliser leur radiomarquage les siRNA ont été modifiés chimiquement. Après avoir vérifié la fonctionnalité des siRNA modifiés nous avons réalisé le radiomarquage à l'iode¹²⁵. Nous avons réalisé les mêmes analyses pour les siRNA halogénés (marqués à l'iode 125). Nous avons alors pu mettre en place le protocole d'imagerie moléculaire *in vivo*. Le prélèvement d'organes permet d'établir la biodistribution des siRNA iodés. L'intégrité du radiotraceur est évaluée suite à l'imagerie.

Avant toute chose, il a été nécessaire d'apporter une modification chimique aux siRNA natifs afin de pouvoir greffer un hétéro-atome d'iode¹²⁵ radioactif. Le docteur JP Mathieu (INSERM U877) en concertation avec la société Eurogentec nous a orienté vers un composé du type 3' 4 Hydroxyphénol (cf.fig.67). La modification peut être portée au niveau des 4 extrémités du siRNA. Cependant nous avons choisi de placer la modification sur une seule extrémité en 3' du brin sens du duplex afin de conserver des éléments aussi proches que possible des molécules natives. Les deux brins ne se séparent qu'une fois entrés dans la cellule, il semble donc légitime de penser que la localisation du brin passager permet de suivre le processus d'ARN interférence.

Figure 67 Nature de la modification chimique.
Formule de l'acide propionique 3-(4 Hydroxyphényl).



Nous avons vérifié que cette modification chimique n'altérait pas les propriétés fonctionnelles des siRNA et n'induisait pas de toxicité sur les cellules U373 IV3 en culture. Les études *in vitro* mettent en effet en évidence la préservation de l'efficacité du siRNA iodé d'intérêt (CK2 β iodé). L'halogénéation des siRNA n'altère pas leur fonction puisque leur efficacité est constante. En effet, les siRNA CK2 β présentent une efficacité d'inhibition de 91% ($2,38.10^{-7}$ à $2,08.10^{-8}$ ng/ μ l ; $p < 0,01$), 93% ($2,34.10^{-7}$ à $1,70.10^{-8}$ ng/ μ l ; $p < 0,01$) et 93% ($2,22.10^{-7}$ à $1,60.10^{-8}$ ng/ μ l ; $p < 0,01$) lorsqu'ils sont respectivement natifs, modifiés, modifiés halogénés par rapport aux siRNA GFP correspondants (cf.fig.68).

Nous pouvons donc considérer que le processus de marquage en lui même et l'ajout de l'hétéro-atome d'Iode n'altèrent pas la fonction des siRNA.

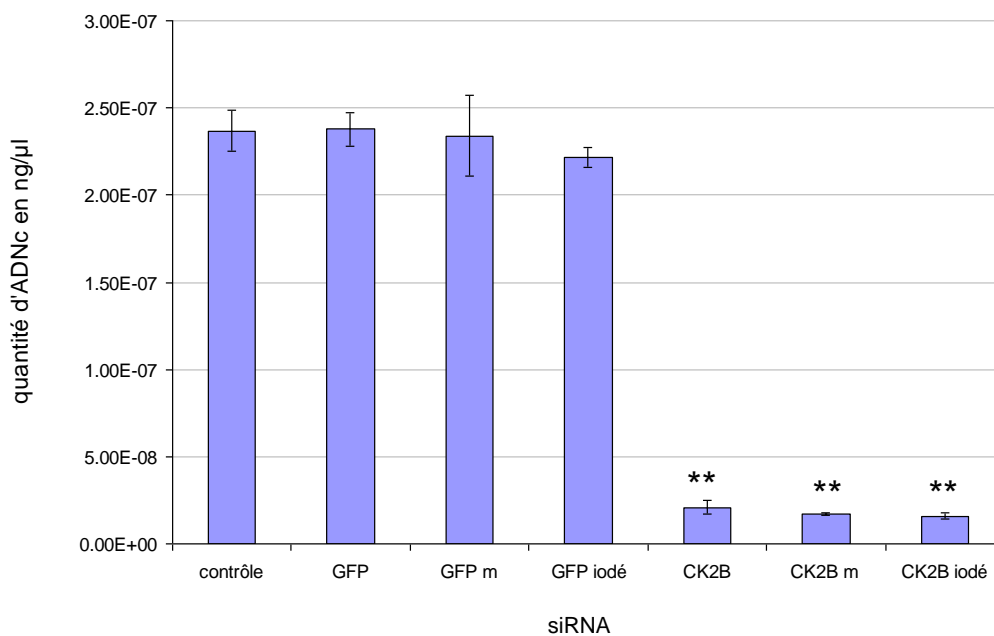


Figure 68 Impact du radiomarquage sur la fonction des siRNA.

La quantité d'ARNm spécifiques de CK2β est évaluée en qRT-PCR 24 heures après transfection. Nous avons analysé de façon statistique les résultats obtenus avec les siRNA CK2β natif, CK2βm et CK2βi. (n=3 par condition testée).

Biodistribution des siRNA in vivo

Après avoir qualifié les siRNA radiomarqués *in vitro*, nous avons quantifié leur distribution au niveau de chaque organe, 1 et 2 heures après leur injection en position intra-péritonéale chez des souris portant ou non des tumeurs.

Les profils de biodistribution *ex vivo* sont similaires que les souris portent une tumeur ou non. La présence de la tumeur n'affecte donc pas significativement la biodistribution des siRNA iodés.

L'activité est stable au cours du temps dans les différents organes sauf pour la rate et le foie où elle a tendance à diminuer. L'élimination est assurée à part égale par les voies hépatobiliaire et rénale comme en témoignent les fortes activités urinaire, biliaire et hépatique observées à 60 et 120 minutes. Par contre, il n'y a pas d'augmentation significative de la captation dans la thyroïde et l'estomac au cours du temps, signe d'une absence de désiodation importante des siRNA halogénés (cf.fig.69).

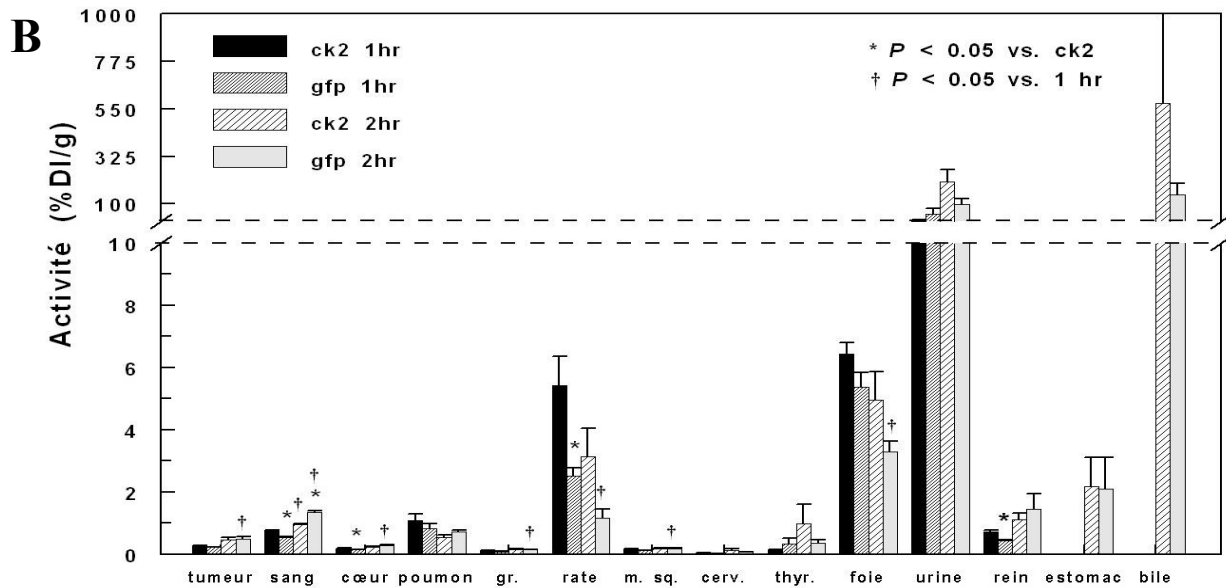
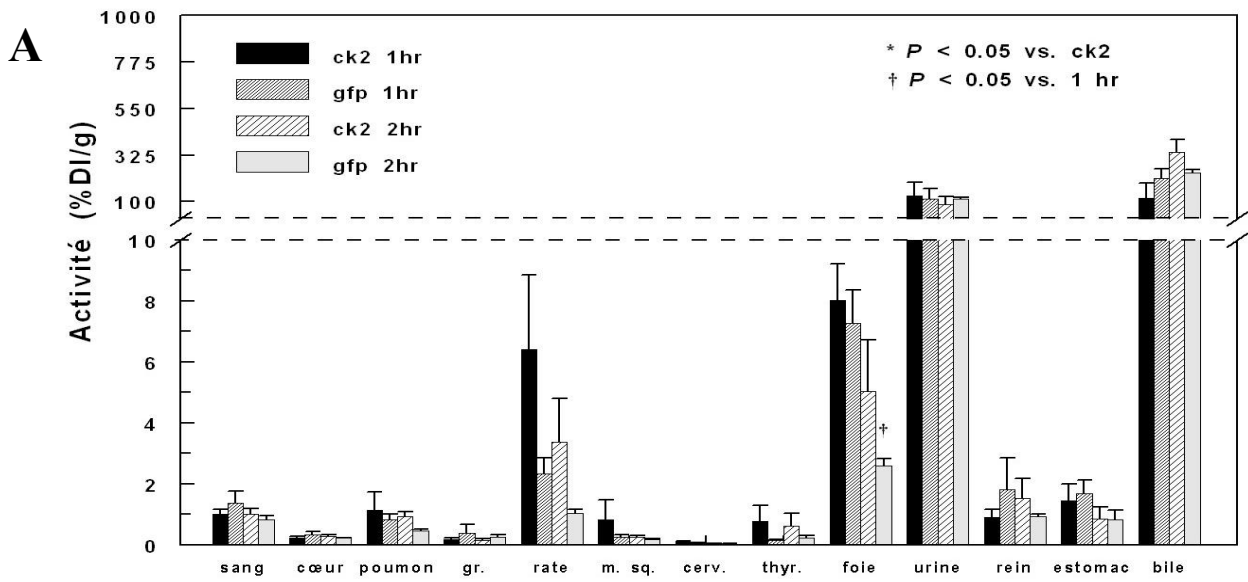


Figure 69 Biodistribution des siRNA halogénés

A : souris porteuses de tumeur sous-cutanées à 1 et 2 heures (respectivement $n=8$ et $n=6$) après injection des siRNA. **B** : souris contrôle à 1 et 2 heures (respectivement $n=8$ et $n=6$) après injection des siRNA. **gr.** : graisse abdominale; **m. sq.** : muscle squelettique; **cerv.** : cerveau; **thyr.** : thyroïde.

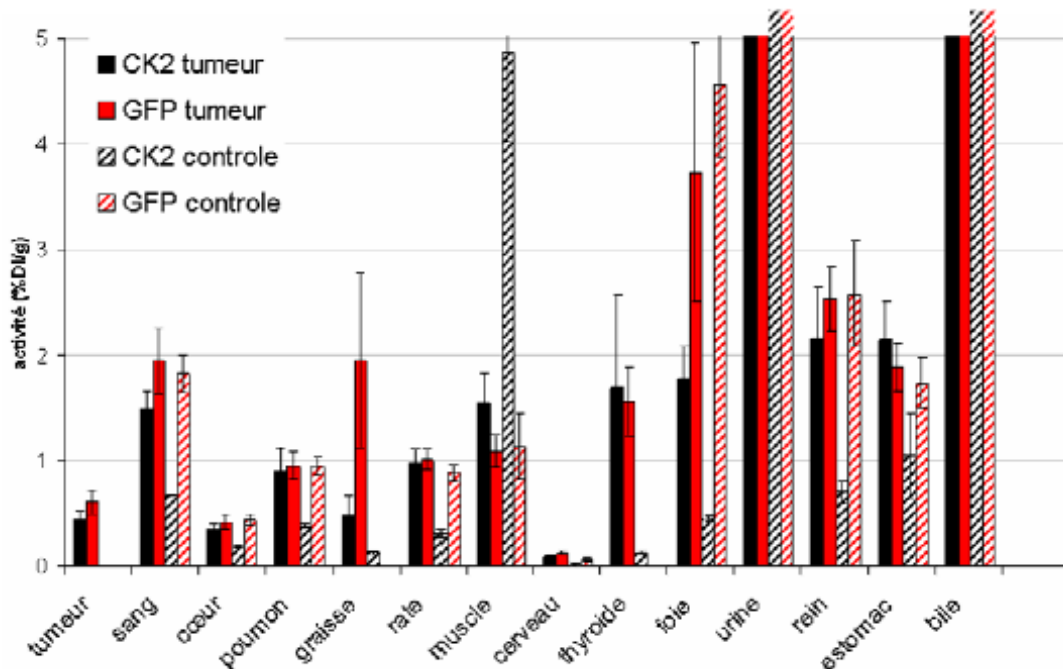


Figure 70 Biodistribution des siRNA halogénés

Souris porteuses de tumeur intra-crâniennes U373 IV3 : ■ CK2 β iodé (n=8) et ■ GFP iodé (n=5) ; Souris contrôles : ▨ CK2 β iodé (n=3) et ▩ GFP iodé (n=4)

Alors que les siRNA ne se distribuent pas dans le cerveau, ils sont retrouvés en quantité significative dans la tumeur intra-crânienne (cf.fig.70).

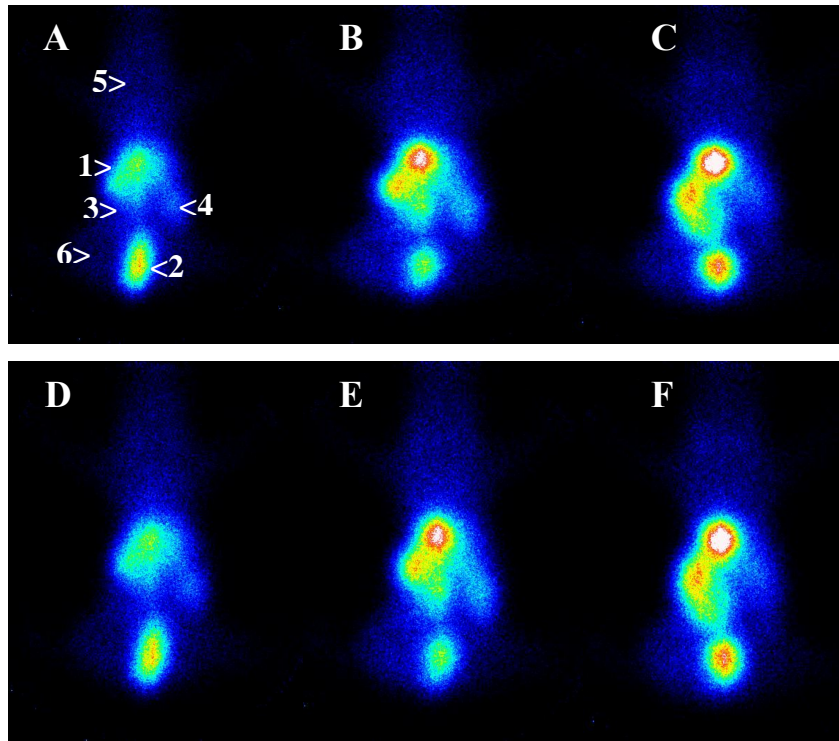


Figure 71 Exemples d'images planaires *in vivo* de corps entier de souris. Les images sont réalisées à 15, 60 et 120 minutes après injection des siRNA CK2 (respectivement A, B, C) et GFP (respectivement D, E, F). Les images présentées sont représentatives de la biodistribution des siRNA *in vivo*.

Aux différents temps étudiés, la captation est élevée dans la zone hépatobiliaire (1) et la vessie (2). A partir de 60 minutes, on peut observer la présence d'une activité faible au niveau des reins (3), de la rate (4), de la thyroïde (5) et de la tumeur (6) (cf.fig.71).

Stabilité des siRNA radiomarqués

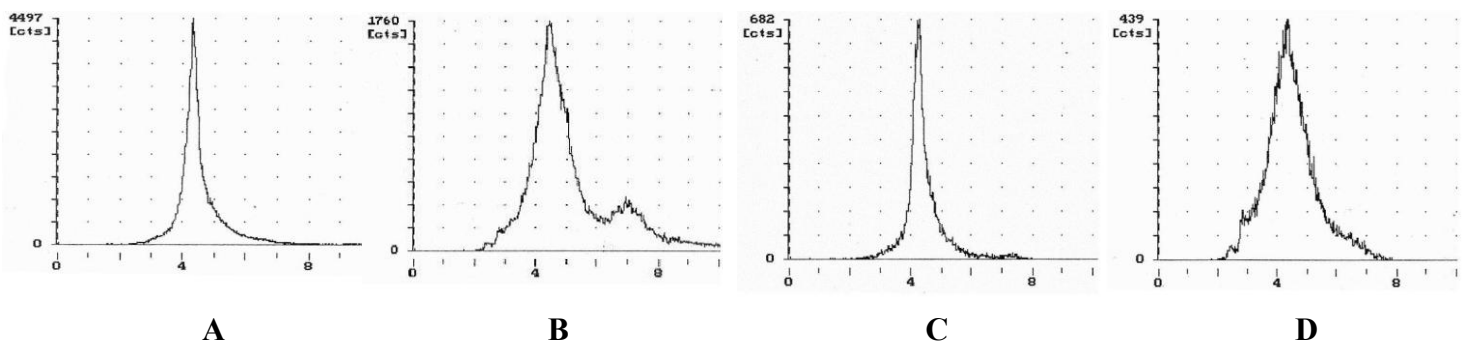


Figure 72 Intégrité du produit dans le temps après passage *in vivo*

Les analyses sont réalisées sur le produit brut après radiomarquage et dans l'urine 2h après injection des siRNA. **A**: siRNA GFPi après radiomarquage; **B** : siRNA GFPi 2 heures après injection; **C** : siRNA CK2βi après radiomarquage; **D** : siRNA CK2βi 2 heures après injection.

Deux heures après l'administration des siRNA, les profils chromatographiques obtenus sont plus étendus. Le produit présente donc des impuretés mais en faible quantité. Le profil du siRNA GFP iodé présente un pic d'iode libre, signe d'une désiodation. Cependant ce phénomène est discret et ne doit pas modifier l'interprétation des résultats en imagerie (cf.fig.72).

Biodistribution des siRNA halogénés au cours du temps.

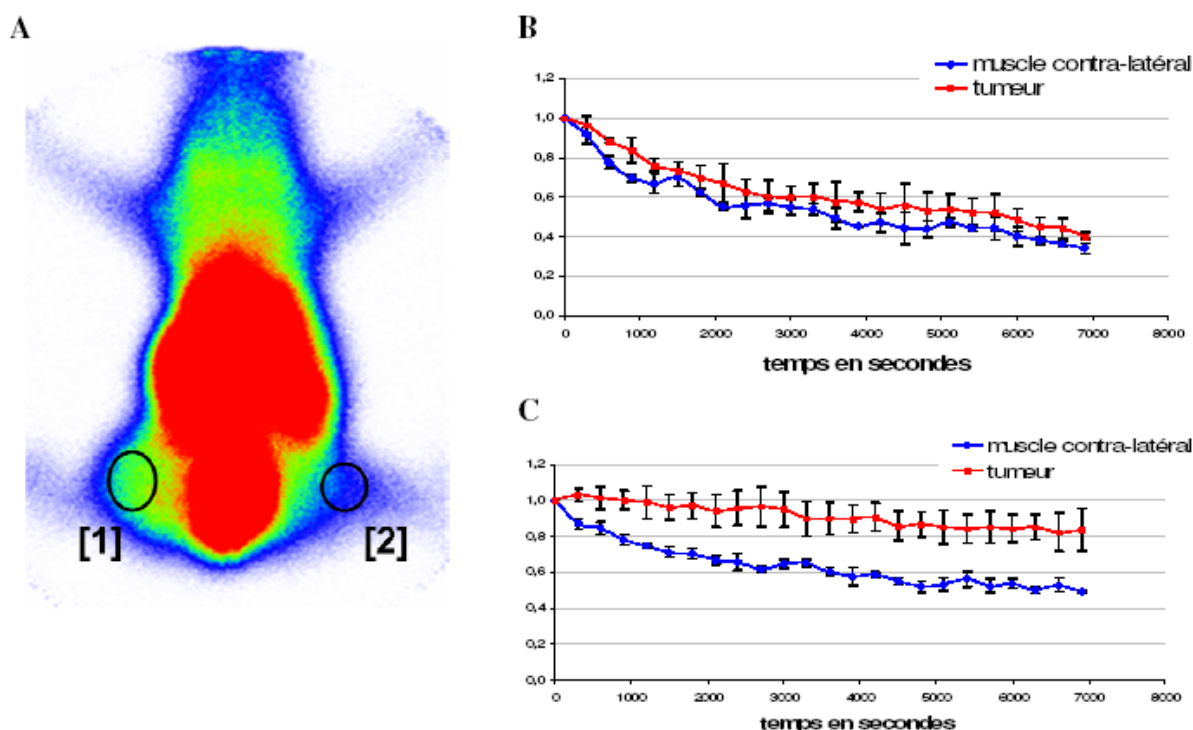


Figure 73 Evolution de la quantité de siRNA dans la tumeur et le muscle contra-latéral. A: exemple d'image d'une souris porteuse de tumeur injectée avec le siRNA CK2β iodé; [1]: emplacement de la tumeur; [2] : emplacement du muscle contra-latéral. B : évolution de l'activité chez les souris injectées avec le siRNA GFP iodé (n=2). C : évolution de l'activité chez les souris injectées avec le siRNA CK2β iodé (n=3). Les quantités relevées sont mises en corrélation avec les résultats de la biodistribution *ex vivo* et rapportées à la dose injectée par gramme d'organe. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur obtenue à t= 0 dans chaque organe.

En réalisant des zones d'intérêt au niveau de la tumeur (A [1]) et du muscle contra-latéral (A [2]), on peut quantifier l'activité à des intervalles de temps réguliers. Les cinétiques de captation du siRNA GFP iodé dans la tumeur et le muscle contra-latéral sont similaires. En 2 heures, la quantité de siRNA GFP iodé diminue ainsi de 60% dans la tumeur et de 66% dans le muscle contra-latéral. De la même manière, la quantité de siRNA CK2β iodé diminue en continu dans le muscle contra-latéral (52%). Cependant ce siRNA est plus persistant dans le tissu tumoral et ne présente qu'une diminution de 16% en 2 heures (cf.fig.73).

Conclusion de l'imagerie

La quantification de la radioactivité par organe fait apparaître une diffusion des siRNA dans l'ensemble de l'organisme. Ainsi de nombreux organes comme le cœur, le poumon ou encore le muscle squelettique pourraient faire l'objet de traitement par l'intermédiaire des siRNA.

En ce qui concerne le cerveau, il semble protégé par la BHE. Par contre, les tumeurs implantées en position intra-crânienne captent bien les siRNA, ce qui est compatible avec notre stratégie thérapeutique.

DISCUSSION

Les gliomes, et plus particulièrement les glioblastomes, sont, de par leur sombre pronostic, des entités cancéreuses très préoccupantes. En raison de leur résistance aux traitements radio- et chimiothérapeutiques, la médiane de survie des gliomes reste faible et nous ne disposons toujours pas de solution curatrice. Cette situation résulte d'une part d'une prise en charge tardive et d'autre part du manque d'efficacité des traitements actuels. S'il n'existe à l'heure actuelle aucun marqueur diagnostique précoce de la maladie, l'amélioration de la prise en charge thérapeutique peut être envisagée. Cet objectif peut être abordé sous deux angles : trouver de nouveaux outils thérapeutiques (rayonnement, drogue...) ou potentialiser les thérapies existantes. Les travaux présentés ici s'inscrivent dans ce dernier cadre.

Le but de ces travaux était effectivement de développer une approche de chimio-sensibilisation des gliomes reposant sur la neutralisation des mécanismes de chimio-résistance, afin d'augmenter l'effet cytotoxique des traitements sur les cellules cancéreuses des glioblastomes. Nous avons utilisé les différences de chimio-sensibilité des glioblastomes et des oligodendrogliomes comme une clé pour mettre en évidence des mécanismes moléculaires nouveaux. Nous nous sommes focalisés sur les anomalies cytogénétiques statistiquement associées à la chimio-sensibilité des oligodendrogliomes : la perte d'hétérozygotie des bras chromosomiques 1p et 19q⁽³⁵⁾. Nous avons posé l'hypothèse que la diminution d'expression des gènes de ces régions ainsi induite, serait responsable de la diminution de résistance à la chimiothérapie. Et par conséquent, que ces gènes étaient responsables de la chimio-résistance des glioblastomes.

Dans un premier temps, nous avons effectué une étude bio-informatique de la zone. Ces régions comportent plus de 1 700 gènes et nous avons donc dû faire un choix parmi ceux-ci, ce qui nous a conduit à sélectionner une cinquantaine de gènes impliqués dans des fonctions aussi diverses que le métabolisme, le cycle cellulaire, la signalisation et la réparation de l'ADN.

La stratégie choisie ici consistait, non pas à augmenter l'efficacité propre des drogues, mais à diminuer la résistance des cellules vis-à-vis de celle-ci.

Afin d'évaluer leur éventuelle implication dans la chimio-résistance des glioblastomes, il nous fallait interférer avec leur fonction et observer l'effet induit sur le comportement de cellules issues de gliomes. Puisque notre hypothèse était que l'expression de ces gènes était responsable de cette résistance, nous avons décidé d'inhiber leur expression. L'outil que nous avons choisi pour cela, est l'interférence ARN, pour sa spécificité et son efficacité. Nous avons utilisé au moins 3 siRNA par

gène, ce qui correspondait au total à 150 siRNA à tester. Sans aucun outil de criblage haut-débit à notre disposition au laboratoire, nous avons dû faire un choix parmi la cinquantaine de candidats.

Nous avons donné la priorité aux gènes de réparation de l'ADN car leur implication dans ces mécanismes est majeure. Nous avons pour cela dû mettre en place un test de chimio-sensibilité *in vitro* puis *in vivo*.

La suite des travaux a pris trop de temps pour étudier les 40 gènes restant. Ces gènes seront probablement étudiés dans le laboratoire dans des études ultérieures.

Pertinence des modèles

L'étude a débuté par des étapes *in vitro*. Nous avons utilisé des lignées d'astrocytomes habituellement utilisées dans les travaux sur les gliomes, à savoir U373 et U87. Néanmoins, conscients de la distance qu'il existe entre la tumeur originelle et une lignée cellulaire qui a subi plus d'une centaine de passages, nous avons également travaillé sur une primo-culture de glioblastome établie au sein de notre laboratoire, GHD, et les résultats obtenus alors avec cette lignée sont similaires à ceux obtenus avec les lignées, ce qui conforte la pertinence de ces dernières. Nous avons par la suite ajouté à notre panel de cellules d'autres lignées commerciales : LN229, U138 et CCF, afin de tester la robustesse de nos résultats, et de s'affranchir des données spécifiques d'une lignée cellulaire, d'autant plus que la fonction de réparation peut être altérée par des passages successifs. Les résultats sont en effet dépendants de la lignée cellulaire et par conséquent des caractéristiques de la tumeur dont la lignée est issue. Ainsi, utiliser différentes lignées cellulaires permet d'appréhender l'hétérogénéité qui existe entre les tumeurs des différents patients.

Bien sûr, des lignées primaires ou mieux, des cellules souches tumorales, si celles-ci sont bien à l'origine des tumeurs⁽²⁶⁴⁾, constitueraient un modèle cellulaire plus proche de la réalité biologique des phénomènes étudiés. Les gliomes et notamment les glioblastomes sont en effet composés d'une population de cellules hétérogènes, d'un point de vue de leur pouvoir prolifératif et de leur tumorigénicité. Cette hétérogénéité pourrait s'expliquer par la découverte récente de l'existence, au sein de la masse tumorale, d'une petite population de cellules souches cancéreuses⁽²⁶⁵⁻²⁶⁸⁾. Ces cellules sont les seules cellules tumorigènes, ce qui implique l'existence de deux populations cellulaires cancéreuses dans la masse tumorale : une minoritaire constituée de cellules souches cancéreuses responsables de la tumorigénicité, et une majoritaire qui dériverait de la première, capable de se diviser activement avec un potentiel prolifératif limité. Cette dernière population est assimilable à des cellules tumorales différenciées. Une culture de cellules primaires contenant une proportion fidèle de cellules souches feraient alors un bon modèle d'étude. Pourtant, réaliser un criblage sur ces cellules serait difficile, car de telles expérimentations nécessitent un grand nombre

de cellules, donc plusieurs cultures. L'hétérogénéité des tumeurs pourrait ainsi l'emporter sur le résultat biologique. De plus, contrairement aux lignées commerciales, comme U373, que l'on peut retrouver dans tous les laboratoires, les cultures primaires sont propres à chacun d'entre eux, ce qui limite la coordination des travaux. En définitive, il est plus confortable de travailler sur les lignées commerciales, mais il est judicieux de vérifier les résultats ainsi obtenus sur des lignées primaires.

D'autre part, travailler sur les cellules souches seules, ne serait pas pertinent car un traitement basé sur l'élimination de ces cellules n'améliorerait pas forcément le pronostic vital des patients. Les gliomes ont une taille considérable au moment du diagnostic, suffisante pour entraîner des symptômes neurologiques. Ainsi, la seule prolifération des cellules non souches conduirait à l'augmentation de la morbidité, voir au décès du patient.

Il semble par conséquent nécessaire de mieux connaître la biologie des tumeurs gliales, et en particulier la contribution respective des cellules souches et non souches.

Par ailleurs, l'effet des siRNA d'intérêt sera bientôt évalué sur les cellules souches tumorales dont nous disposons au laboratoire.

Pour les phases d'étude préclinique, il nous a fallu développer des modèles de gliomes chez la souris. Nous voulions garder les mêmes cellules que celles utilisées dans les étapes précédentes, mais les tumeurs se développaient en plus de 3 mois après l'injection des cellules, le taux d'échec était important et le développement était très variable d'une tumeur à l'autre. Ces caractéristiques faisaient de ces tumeurs un mauvais modèle d'étude, difficilement compatible avec le déroulement du programme. Pour pallier ce problème nous avons sélectionné, par passages successifs chez l'animal, les cellules les plus tumorigènes et ainsi, établi des lignées dont les tumeurs se développent en 2 semaines.

Bien sûr, la relevance des modèles de xénogreffes est limitée, puisque, d'une part, ce sont des tumeurs humaines dans un environnement murin, et que d'autre part, elles sont le résultat de l'implantation de lignées cellulaires et non de la formation naturelle au sein du cerveau où elles siègent. Leur biologie, leur organisation et les interactions avec l'environnement sont ainsi différentes de celles observées dans les gliomes des patients.

Un modèle syngénique s'affranchirait des biais dus à l'incohérence inter-espèce de la tumeur vis-à-vis de son environnement, mais la tumeur serait toujours le résultat de l'implantation de lignées cellulaires, avec tout ce que cela entraîne de distance avec un développement spontané. La mise en culture provoque en effet des altérations et des sélections qui éloignent de la cellule d'origine.

Ces travaux pourraient alors bénéficier de l'emploi de modèles de développements spontanés de tumeurs cérébrales, comme cela existe pour les rats chez lequel v-erb, la forme virale de EGFR, est exprimé sous le contrôle du promoteur S100 β ⁽²⁶⁹⁾. Ce modèle permet une évaluation satisfaisante des interactions métaboliques et physiologiques avec le traitement qui pourraient influencer sur l'effet de ce dernier.

Par contre, ce modèle comme celui des tumeurs syngéniques, a l'inconvénient majeur d'être un modèle murin. Leur développement n'est pas comparable, pas plus que leur histologie. Il est ainsi impossible d'étudier l'effet direct du traitement sur la cible, humaine, tel que cela se passerait chez le patient, parce que, par exemple, la séquence des siRNA est spécifique du rongeur. En effet, les gènes ne sont pas conservés à l'identique au cours de l'évolution et cela induit des différences non négligeables sur les fonctions associées. La fonction de réparation n'échappe pas à cette règle, ce qui entraîne des différences inter-espèces au niveau des modes de correction des lésions de l'ADN. Il existe en effet des différences qualitatives (mammifères/autres) et quantitatives (homme/souris) au niveau de la fonction de réparation. Le système de réparation accessoire des lésions photo-induites est ainsi présent chez toutes les espèces hormis les mammifères ⁽¹³⁰⁾ et surtout la capacité de réparation par excision est réduite chez les souris par rapport à l'Homme ⁽²⁷⁰⁾.

Une autre preuve des biais inhérents au modèle de xénogreffes est qu'avec un traitement équivalent à celui utilisé en clinique chez l'Homme, certaines des tumeurs implantées guérissent, contrairement à ce qui est observé chez les patients.

Test de chimio-sensibilité

Afin de déterminer quels gènes étaient effectivement des acteurs importants de la résistance à la chimiothérapie, nous avons eu besoin d'un outil de criblage.

La première partie de nos travaux a par conséquent été la mise au point d'un test de chimio-sensibilité à moyen débit qui nous a permis de cribler l'ensemble des gènes de réparation. Ce test, outre le nombre important de conditions différentes qu'il est possible d'évaluer en parallèle, présente une flexibilité importante puisque l'on peut faire varier, séparément ou simultanément, la lignée cellulaire sur laquelle on veut observer le paramètre, le gène ciblé et la drogue de chimiothérapie. La robustesse de ce test a été validée par son utilisation sur plusieurs lignées cellulaires, ainsi que par sa transposition aux étapes précliniques.

Criblage

Les moyens techniques dont nous disposions au laboratoire ne nous ont pas permis d'effectuer un criblage à grande échelle, par exemple à celle du génome. Cela nous a conduit à préciser la question en posant un certain nombre d'hypothèses : la localisation des gènes, leur fonction, et, par conséquent, d'écarter des candidats.

Toutefois dans le cadre de nos travaux, un criblage pan-génomique aurait été superflu car il ne nous aurait pas forcément été possible de mener chacun des nombreux candidats retenus jusqu'au terme de l'étude, c'est-à-dire l'étude clinique. Il est en effet inutile de conduire jusqu'à l'essai clinique une centaine de gènes si une dizaine est déjà disponible.

Ercc1 étant notre meilleur candidat, nous avons présupposé de son implication. Il a par conséquent été utilisé pour mettre au point le test de chimio-sensibilité. Dans un second temps, une fois que nous avons démontré l'effet chimio-sensibilisant du siRNA associé, nous nous en sommes servi comme contrôle positif fonctionnel de la transfection. Les expériences *in vitro* n'étaient validées que lorsque le siRNA *ercc1* avait entraîné une augmentation de la sensibilité.

Prenant en compte la faible fiabilité des premiers algorithmes prédisant l'effet des siRNA, nous avons réalisé les premières expériences avec de 3 à 5 séquences de siRNA par gène. Dans notre approche à moyen débit, il était impossible de mesurer l'impact des siRNA à la fois sur l'ARN et la protéine, surtout qu'il n'existait pas forcément d'anticorps disponibles pour chaque cible. Néanmoins, la diminution d'expression a été confirmée par qRT-PCR dans les expériences de validation qui ont suivi.

Afin d'assurer nos conclusions, nous avons choisi d'éliminer les siRNA induisant des effets toxiques, en absence de drogue. Cette toxicité pourrait être due au ciblage d'un gène essentiel. Même si ces gènes pouvaient être intéressants, la toxicité des siRNA aurait masqué une éventuelle chimio-sensibilisation. D'autre part, les siRNA qui n'ont eu aucun impact sur le nombre de cellules ont été écartés. Au final, sur les séquences testées, seulement 9 ont eu un effet significativement chimio-sensibilisant, démontrant l'importance d'un test validé pour trouver des siRNA efficaces.

Le test de chimio-sensibilité à moyen débit nous a ainsi permis de cribler la dizaine de gènes concernés et d'en retenir 4. Les autres ont été écartés car aucun effet fonctionnel n'a été constaté sur la chimio-résistance des cellules d'astrocytomes. Ce manque d'effet peut avoir plusieurs causes : soit aucun des siRNA n'était efficace, soit le gène n'était pas exprimé dans la cellule, soit le gène n'était pas impliqué dans le mécanisme étudié.

Parmi les cibles validées, se trouve un gène déjà largement impliqué dans la chimio-résistance de différents cancers, *ercc1*. A l'inverse, les 3 autres sont de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles : *ercc2*, *mutyh* et *pnkp*.

Ercc1

Le premier des gènes retenus est *ercc1*. La protéine correspondante appartient au système de réparation Nucleotide Excision Repair (NER) qui corrige un large spectre d'altérations de l'ADN. Nous avons mesuré une quantité doublée d'ARN *ercc1* dans les glioblastomes par rapport aux oligodendrogliomes. Cette surexpression dans les tumeurs résistantes est confirmée par le fait que la protéine, est jusqu'à dix fois plus exprimée dans les glioblastomes que dans le tissu cérébral sain (SAGE NCBI). Un certain nombre d'études *in vitro* ont montré l'implication de ERCC1 dans la réparation des adduits de l'ADN engendrés par l'agent de chimiothérapie cisplatine ⁽¹⁴⁵⁾. Des niveaux élevés d'expression de *ercc1* sont de plus associés à une augmentation de l'élimination des modifications de l'ADN et à une relative résistance au CDDP ⁽¹⁶³⁾. La transfection du gène *ercc1* dans des cellules CHO déficientes pour ce gène restitue la capacité à réparer les adduits de l'ADN et la résistance au CDDP ⁽²⁷¹⁾. D'autre part, des cellules de souris chez lesquelles ce gène a été invalidé sont particulièrement sensibles aux agents alkylants ⁽²⁷²⁾. Enfin, l'inhibition de son expression augmente la sensibilité à cet agent ⁽¹⁶⁴⁾. Une seule étude *in vitro* concerne les tumeurs gliales : il a été démontré une corrélation entre l'expression de *ercc1*, mesurée par qRT-PCR dans des extraits tumoraux et la réponse des cellules au cisplatine ⁽²⁷³⁾.

Par ailleurs, des études cliniques ont également établi une relation entre l'expression intra-tumorale de *ercc1* et le devenir des patients porteurs de tumeurs pulmonaires traités avec du CDDP ⁽¹⁷¹⁾. Une corrélation significative a été trouvée entre une survie longue de patients porteurs de cancers gastrique, pulmonaire ou ovarien après traitement avec des agents alkylants et de faibles niveaux d'expression de *ercc1* ^(169-171, 274). Toutefois, la corrélation entre la réponse au traitement avec le CDDP et les taux d'ARNm de *ercc1* n'est retrouvée que dans les deux premiers cas. Ceci signifie que les patients répondeurs et non répondeurs ne sont pas strictement séparés dans deux groupes de faible ou de forte expression de *ercc1*. Le gène *ercc1* pourrait ainsi être considéré comme un marqueur de chimio-sensibilité sans en être directement responsable ou seulement de façon partielle.

En conclusion, même s'il a été montré *in vitro* que *ercc1* est impliqué dans les mécanismes de réparation des altérations chimio-induites de l'ADN, et que sa faible expression *in situ* est associée à un meilleur pronostic, la quantification de l'expression de ce seul gène n'est pas un critère de prédiction de la réponse au traitement. Ainsi, d'autres modifications que des variations d'expression

modifient la fonction de ERCC1 ; ou bien, ERCC1 et le système NER sont mis en œuvre de concert avec d'autres acteurs de la réparation de l'ADN.

En ce qui concerne la première hypothèse, un polymorphisme du gène *ercc1* pourrait être responsable, au même titre que la diminution de la transcription, d'une baisse de la quantité de protéine ou d'une altération de sa fonction. Il existe en effet un allèle de *ercc1* statistiquement plus retrouvé chez les patients porteurs d'un oligodendrogliome chimio-sensible ⁽¹⁶⁸⁾. Les ARNm des allèles présents dans les oligodendrogliomes seraient moins stables, ce qui se traduirait par une quantité plus faible de protéines.

Par ailleurs, les différents systèmes de réparation de l'ADN ont des spectres d'action largement chevauchants ^(127, 138, 275). Ainsi, nous devons considérer les principaux systèmes responsables de la réparation des dommages occasionnés à l'ADN par une drogue. L'expression du gène *ercc1* ne peut donc pas être la cible unique d'un traitement destiné à accroître la chimio-sensibilité. Nous nous intéressons donc également aux autres gènes de réparation appartenant à ce système ou aux autres.

Ercc2

Le deuxième gène de réparation qui s'est révélé un bon candidat appartient également au système NER : *ercc2*. Son expression a été corrélée à la résistance de nombreuses lignées cellulaires vis-à-vis des agents alkylants ^(172, 173, 273), incluant les lignées de gliomes ⁽¹⁷⁴⁾, mais aucun lien n'a pu être établi entre son expression et l'activité de NER ⁽¹⁷³⁾. Ce qui suggère que *Ercc2* n'est pas une enzyme limitante de ce système, contrairement à ce que l'on observe dans les lymphocytes primaires ⁽²⁷⁶⁾. Il peut également agir par le biais du système de réparation homologue tel que dans les cellules de gliomes SKMG-4 ⁽²⁷⁷⁾. Un autre niveau de complexité est le nombre de polymorphisme de ce gène, sans phénotypes clairs associés ⁽²⁷⁸⁾. Ces polymorphismes contribuent à l'évidence à gouverner la fonction cellulaire de *ercc2*. Alors qu'une précédente étude a montré que sa sur-expression augmente la fonction de réparation dans une lignée cellulaire de gliome ⁽¹⁷⁵⁾, nos résultats sont les premiers à démontrer son implication fonctionnelle dans la résistance aux drogues. De plus, nos travaux ont montré que ERCC2 est une protéine sur-exprimée dans les glioblastomes par rapport aux oligodendrogliomes.

Nous avons également identifié 2 gènes du système BER : *mtyh* et *pnkp*. Aucune publication ne les ayant au préalable impliqués dans la chimio-résistance, seule l'analyse bioinformatique systématique sans *a priori* nous a permis de trouver ces 2 candidats.

Mutyh

Mutyh est connu pour enlever les adénines incorporées en face des 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) causées par l'oxydation. Des mutations et des variants du gène sont associés au développement de divers adénomes et cancers⁽¹⁴⁰⁾. De façon similaire à *ercc1* et *ercc2*, l'expression de *mutyh* est accrue dans les glioblastomes par rapport aux oligodendrogliomes.

C'est néanmoins la première fois que *mutyh* est impliqué dans la chimio-sensibilité, demandant des études supplémentaires pour investiguer ses mécanismes d'action.

Pnkp

Pnkp est l'un des acteurs de la réparation des cassures de l'ADN causées par les espèces réactives de l'oxygène, les radiations ionisantes et les agents alkylants^(141, 142). Il a ainsi été relié à la susceptibilité aux agents génotoxiques mais pas à la chimio-sensibilité⁽¹⁴³⁾. Néanmoins, l'interaction de PNKP avec une autre protéine de réparation, telle que *xrcc1* liée aux processus tumoraux, pourrait expliquer nos résultats⁽¹⁴⁴⁾.

Contrairement aux 3 précédents gènes, son expression n'est pas augmentée dans les glioblastomes, ceci nous inciterait à le disqualifier de notre étude, car même s'il participe à la réparation des adduits causés par les drogues de chimiothérapie, il ne participe pas à la différence de sensibilité observée entre les oligodendrogliomes et GBM.

Mgmt

Mgmt est le principal gène de réparation impliqué jusqu'à présent dans la résistance au témozolomide, le traitement de référence des gliomes. Le rôle de la protéine correspondante est de transférer sur une de ses propres cystéines le groupement méthyle que la drogue a greffé sur l'ADN. L'état méthylé ou non de son promoteur, qui influence son expression, a pu être corrélé à la réponse aux traitements des patients porteurs de gliomes, et donc à leur survie⁽¹¹⁶⁾. Pourtant ce lien n'est pas absolu et il existe des gliomes pour lesquels la résistance s'explique par d'autres mécanismes. Aucune thérapie n'a encore vu le jour, mais 3 études cliniques basées sur son principal inhibiteur, le O₆-benzylguanine, sont actuellement en cours (phase I : NCT00006474, phase II : NCT00389090 et phase III : NCT00017147).

Nos expériences ont montré que l'inhibition de l'expression de *mgmt* augmente la sensibilité des cellules de gliomes au témozolomide. Ce résultat est cohérent avec le fait que *mgmt* est majoritairement responsable de la réparation des adduits causés par cette drogue. D'autre part,

l'effet observé est comparable à ceux observés avec les siRNA des présents travaux, ce qui, d'une part, renforce la pertinence de notre test de chimio-sensibilité, et d'autre part, valide l'implication de nos gènes candidats dans les mécanismes de résistance à la chimiothérapie.

Cyp2a6 et cyp4b1

Les gènes *cyp2a6* et *cyp4b1* encodent des membres de la superfamille des cytochromes P450, des monooxygénases impliquées dans la synthèse du cholestérol, des stéroïdes et autres lipides ainsi que dans le métabolisme des drogues : le tegafur dans le cancer du colon ⁽²⁷⁹⁾, la selegiline dans le traitement de la maladie de Parkinson ⁽²⁸⁰⁾ ainsi qu'un anti-épileptique, le MTMCD ⁽²⁸¹⁾. Même si dans ces cas là, le rôle des cytochromes soit d'activer les drogues par leur métabolisation, nous pouvons supposer qu'ils peuvent également jouer un rôle dans l'inactivation d'autres drogues, ce qui pourrait expliquer les résultats que nous avons observés.

ATM (projet TRANSAT)

L'implication d'ATM est cohérente avec ce que l'on connaît du rôle central d'ATM dans les mécanismes cellulaires (cf.fig.70). Lorsque l'ADN est lésé, la cellule active une voie de signalisation qui arrête le cycle cellulaire et induit la transcription de gènes qui facilitent la réparation. En cas d'échec, il se produit une instabilité génomique qui prédispose au cancer. Pour prévenir cela la cellule dispose d'un point de contrôle qui met en jeu diverses phosphatidylinositol-3 kinases (PI-3 K) telles que ATM (Ataxia-telangiectasia mutated). Cette protéine a un rôle central dans la régulation du cycle cellulaire et dans la fonction de réparation ⁽²⁸²⁾. Par l'activation de p53 ⁽²⁸³⁾ qui induit la transcription de p21, elle arrête le cycle cellulaire en G1 et empêche la synthèse d'ADN ⁽²⁸⁴⁾. ATM active également la kinase Chk1 qui phosphoryle la tyrosine phosphatase Cdc25, diminuant sa capacité à induire l'entrée en mitose. L'absence d'ATM entraîne un risque accru de lymphomes chez les patients ⁽²⁸⁵⁾. Les cellules déficientes pour le gène (AT) ont de plus une radiosensibilité accrue et présente une grande instabilité chromosomique ⁽²⁸⁶⁾.

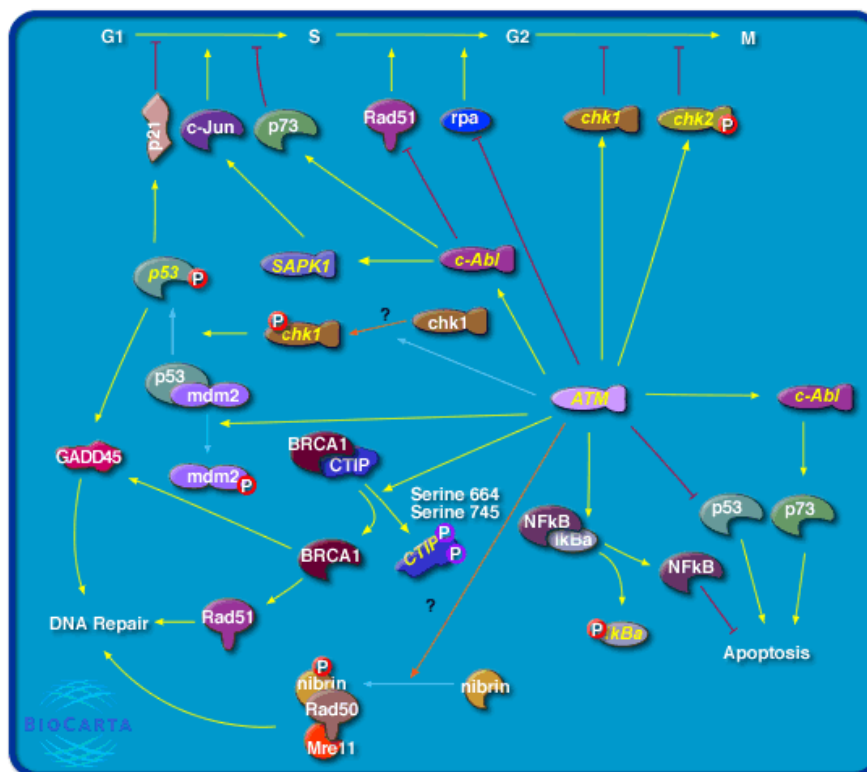


Figure 74 Implication de la kinase ATM dans les mécanismes cellulaires
(d'après NCI CGAP BioCarta Pathway)

Systèmes impliqués dans la réparation des adduits causés par le cddp et le tmz

Les résultats que nous avons obtenus *in vitro* ne sont pas toujours en accord avec ce que nous aurions pu attendre. En effet, le cisplatine et le témozolomide ont des mécanismes d'action différents, alors que nos résultats *in vitro* sont comparables pour ces 2 drogues (cf. tableau 7). Ainsi, si le fait de sensibiliser les cellules au cisplatine en inhibant des gènes de NER est un résultat cohérent avec ce que l'on connaît des mécanismes d'action de ce système de réparation, cette observation ne l'est *a priori* pas lorsque l'on s'intéresse au témozolomide. Ces drogues induisent en effet des dommages de l'ADN très différents. Le cisplatine, considéré abusivement comme un alkylant, mais dont l'action réelle est une platination de l'ADN, crée des liaisons interbrins, et des cassures double-brin, qui sont corrigées par NER ainsi que par recombinaison homologue ou par liaison d'extrémités. Le rôle de mutyh et pnkp n'est par contre pas évident. Pourtant, il peut s'expliquer par les autres conséquences du cisplatine : la génération de ROS. Les dégâts oxydatifs causés par celles-ci sont effectivement réparés par BER ^(287, 288), et les auteurs d'une étude récente ont réussi à sensibiliser des cellules d'hépatome au cisplatine en perturbant BER ⁽²⁸⁹⁾.

Quant au témozolomide, véritable agent alkylant, il crée des méthylations sur les adénines et les guanines, il introduit des uraciles, des sites abasiques, des 8-oxoguanines, ainsi que des cassures

simple-brin. Ces altérations sont principalement réparées par BER, ce qui peut expliquer l'implication dans les mécanismes de résistance au témozolomide de *mutyh* et de *pnkp*. L'implication de *ercc1* et *ercc2* est ici inattendue. Néanmoins, NER est le système de réparation le plus flexible et il intervient, certes avec une efficacité moindre que BER, dans la réparation des méthylations de l'ADN occasionnées par les agents alkylants ^(290, 291).

Si nous n'avions pas effectué un criblage systématique des gènes de réparation situés au niveau des zones chromosomiques d'intérêt, nous aurions écarté des gènes que nous avons par la suite identifiés comme intéressants.

Relevance des cibles

Les cibles thérapeutiques mises en évidence par ces travaux ont été validées sur plusieurs lignées d'astrocytomes. De plus, pour 3 d'entre elles, leur expression est augmentée dans les tumeurs de patients qui ne répondant pas à la chimiothérapie en comparaison de celles des patients répondeurs. *Ercc1* semble le candidat le plus prometteur, d'une part en raison de son implication générale dans la résistance des différents cancers aux traitements, et d'autre part, parce que son inhibition sensibilise le plus grand nombre de lignées. Pourtant, il est illusoire d'espérer soigner l'ensemble des patients en ne visant qu'une seule cible. Il faudrait ainsi pouvoir déterminer les patients susceptibles de bénéficier de ce traitement. Il serait judicieux de mettre en place un test prédictif de la réponse, basé non sur la simple mesure de l'expression du gène, mais sur une évaluation de la fonction de réparation. Ceci est actuellement à l'étude dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Maurizio Gasparotto du CEA de Grenoble.

Démarche translationnelle

Le but de notre étude étant de développer un traitement applicable en clinique, nos travaux ont, dès le début, suivi une logique basée sur cet objectif. Chacun des choix concernant les modes opératoires *in vitro* a été effectué en pensant à l'application *in vivo*, et plus loin encore à la clinique : l'outil d'interférence de la fonction, la drogue de chimiothérapie ainsi que la technique d'imagerie des siRNA.

Notre démarche translationnelle a également été de protéger nos cibles et les séquences de siRNA, car le passage à l'étude clinique chez l'Homme nécessite d'avoir déposé des brevets, d'autant plus que le marché est actuellement important, puisque le témozolomide est efficace sur 20% des patients et qu'il tombera dans le domaine commun en 2009.

Nous avons tout d'abord choisi de travailler avec des siRNA plutôt qu'avec des shRNA, car chez le patient, nous n'aurions besoin que de l'inhibition transitoire de l'expression des gènes cibles, pendant le temps du traitement de chimiothérapie. De plus, la réduction de la fonction de réparation étant probablement dommageable à long terme, les shRNA de par leur effet pérenne entraîneraient à l'évidence des effets secondaires, comme c'est le cas dans l'étiologie cancéreuse liée aux mutations des gènes de réparation : TP53, Mgmt, Pold1 (cancers pléiotropes), XPA, XPC, XPD, XPE, Csa, Csb, Polh (cancers de la peau), BRCA1 et 2 (cancer du sein) ⁽¹³⁹⁾. Par ailleurs, les thérapies basées sur les shRNA ne sont pas applicables actuellement car elles s'apparentent à la thérapie génique et nécessitent l'utilisation de plasmides ou de vecteurs (rétro-) viraux. Elles pourraient donc avoir des effets secondaires indésirables.

En 2001, lorsque l'étude a commencé, nous avons opté pour le cisplatine dans le test de chimio-sensibilité, car cette drogue avait une fonction très proche de la fotémustine, alors utilisée en clinique, et elle avait l'avantage d'être beaucoup plus stable, donc utilisable *in vitro*. Puis, pour le témozolomide, lorsque celui-ci est devenu le traitement de référence des gliomes. Par ailleurs, le phénotype que nous avons analysé dans ce test pour déterminer l'effet chimio-sensibilisant d'un siRNA est la quantité totale de cellules. Ceci est la meilleure transposition de l'évaluation du volume des tumeurs cérébrales en imagerie médicale, devant les autres analyses morphologiques, biochimiques ou moléculaires et en absence de marqueurs biologiques. La diminution ou la stabilisation de la taille de la tumeur, est en effet le paramètre majeur pour évaluer la réponse thérapeutique dans les essais cliniques.

Pour l'étude préclinique, une des mises au point a consisté à se placer en situation d'échec thérapeutique, comme c'est le cas chez l'homme, afin de pouvoir constater une éventuelle amélioration du pronostic grâce au traitement chimio-sensibilisant des siRNA. Pour cela nous avons recherché des doses de chimiothérapie pour lesquelles la croissance tumorale était seulement ralentie avant une reprise, car avec les paramètres définis dans la littérature (traitement de 5 jours à 42mg/kg chez l'Homme) ⁽²⁶²⁾, nous observions la guérison des souris.

Utilisation des siRNA

La totalité de nos études est basée sur l'emploi de siRNA. Ils sont un outil central du modèle ayant permis d'identifier les gènes candidats, et ils ont permis d'évaluer l'intérêt thérapeutique au niveau préclinique. Ils auraient pu cependant être remplacés par toute autre molécule interférente,

découverte par le biais du criblage d'une chimiothèque, puisque le modèle d'étude, et surtout les paramètres d'étude, sont indépendants de la voie de la manipulation des gènes/protéines candidats. De plus, une fois que quelques gènes candidats ont été identifiés, nous aurions pu rechercher des molécules capables d'inhiber leur fonction.

Nous avons néanmoins fait le choix de continuer avec les siRNA car leur emploi est envisageable *in vivo* et que cela permet alors de passer directement de l'*in vitro* à l'*in vivo*, en s'affranchissant de la transposition à une autre molécule.

Les siRNA sont un outil d'étude fondamental et un outil thérapeutique. Ils permettent *a priori* de cibler tout ARNm de façon spécifique. Une librairie de siRNA permet d'effectuer une analyse fonctionnelle comparable à celles que l'on peut faire de l'expression par puce à ADN (Affymétrie) sur le plan purement descriptif. Toutefois, les bibliothèques ne sont pas toutes validées et les cellules n'expriment pas toutes les cibles. Il était ainsi nécessaire de définir des contrôles pour valider à la fois le criblage, et les siRNA. Mais, au début du programme, aucun de nos siRNA n'était validé car malgré les algorithmes utilisés, la société Eurogentec ne pouvait effectivement nous garantir leur efficacité, ce qui est actuellement faisable (travaux non publiés de Yves Vandembrouck, CEA, Grenoble). En réalité, les siRNA et le test de chimio-sensibilité se sont validés réciproquement. Certains siRNA ont conduit aux effets biologiques attendus et leur efficacité de répression a pu être vérifiée par biologie moléculaire (qRT-PCR). L'idéal serait d'utiliser la technologie des puces à cellules (Affymétrie) associée à un criblage avec des siRNA. Ainsi, avant d'envisager l'inhibition d'expression d'un gène, il serait possible de s'assurer que ce gène est effectivement exprimé dans la cellule cible.

Combinaisons de siRNA

Si chacun des siRNA d'intérêt induisait une diminution de la chimio-résistance, il semblait logique que les associer augmenterait le phénomène. Or, ce ne fut pas le cas (cf.fig.54 et 55). Ce problème peut provenir de la saturation de la machinerie des siRNA ou tout simplement être la conséquence de notre incompréhension des mécanismes d'inhibition croisée, et donc de notre incapacité technique à la mettre en œuvre.

Même si nos résultats démontrent de façon non ambiguë l'implication de ces gènes dans la chimio-résistance, ils sont assez différents d'une lignée à l'autre et nous avons émis l'hypothèse que ce fait provient de différences d'expression au sein de chaque lignée. Pour vérifier ce fait, nous avons quantifié, par PCR quantitative, l'expression de ces différents gènes dans chacune des lignées, en présence et en absence de cisplatine. Contrairement à ce que nous avons supposé, les valeurs

obtenues n'étaient pas corrélées à l'effet observé sur la chimio-sensibilité, en tout cas, au niveau de l'ARN (cf. tableau 10). Il n'existe pas de lien direct et simple entre l'expression des gènes de réparation, au niveau de l'ARNm, et la chimio-résistance sans siRNA. L'évaluation de l'expression des gènes au niveau de l'ARN ne permet donc pas d'expliquer ou de pronostiquer, la sensibilité d'une cellule à un siRNA. Peut-être ce lien existe-t-il au niveau protéique, mais faute d'anticorps commerciaux disponibles, nous n'avons pas pu vérifier cette nouvelle hypothèse.

Une autre possibilité est que l'effet des siRNA est différent dans chacune des lignées, ce que nous observons effectivement : d'une lignée à l'autre le taux d'inhibition varie. Mais, le sens de ces variations n'est pas corrélé aux effets observés (cf. tableau 9).

Il est probable que les différences de chimio-sensibilisation résultent d'une subtile combinaison de ces différents phénomènes.

Imagerie des siRNA

Nos travaux sur l'imagerie ont démontré que les siRNA étaient intègres au moins 2h après leur injection, qu'ils n'allaient pas dans le cerveau, mais qu'ils atteignaient par contre les tumeurs en position intra-crânienne.

L'imagerie des siRNA illustre, à nouveau, notre volonté de mettre au point, dès la phase préclinique des outils de recherche, les plus rapidement et simplement applicables à la médecine. Le radio-marquage avec l'iode radioactif, les temps d'analyse (<2h) ainsi que la voie d'administration (intraveineuse) sont en effet compatibles avec l'utilisation chez l'Homme. Ainsi, l'imagerie pourra permettre d'évaluer les protocoles d'administration (vecteurs, ciblage).

Au contraire de ce qui se passe actuellement dans les premiers essais de phase I utilisant les siRNA, il nous paraissait crucial de pouvoir imager l'accessibilité tumorale, éventuellement les caractéristiques de la cinétique du siRNA liés à la cible, avant de décider de son utilisation chez un patient donné. De même l'analyse de l'expression de la cible sera indispensable.

Expérimentations *in vivo*

L'étude préclinique de l'utilisation de siRNA comme traitement additif de la chimiothérapie chez l'animal est encourageante. Néanmoins, leur effet est-il suffisant pour envisager d'en tirer un profit très significatif dans un cadre thérapeutique ? Probablement que oui, même s'il peut être amélioré. Il faudrait par exemple optimiser le ciblage des siRNA vers la tumeur, car comme l'a montré l'imagerie, les siRNA sont rapidement dirigés vers les voies de sécrétions (foie, rein, bile) et ils

diffusent très largement dans tous les organes analysés. Cela est certes important car nous pouvons envisager de les étudier pour toute pathologie cancéreuse (avec précaution en ce qui concerne le cerveau), mais c'est également une dilution qui diminue d'autant l'effet attendu dans le tissu dans lequel siège la tumeur, et qui donne également l'occasion au siRNA d'exercer un effet quasi-systémique duquel on peut redouter la survenue d'effets secondaires néfastes. Nous pouvons envisager que l'inhibition de *ercc1* pourrait avoir un effet oncogène. Mais dans le cadre d'un traitement transitoire, ces effets semblent peu probables.

Nous avons constaté que, contrairement au siRNA *ercc1-3*, le siRNA *ercc1-1* était inefficace *in vivo*, alors qu'il était le plus chimio-sensibilisant *in vitro*. Cela s'explique peut-être par une différence d'accessibilité dépendante de la séquence du siRNA.

La dilution des siRNA semble conduire à des quantités faibles de siRNA par organe. Avec l'imagerie des siRNA il doit être possible de les quantifier au sein de chaque organe et ainsi définir la quantité efficace. Il faudrait également quantifier les siRNA effectivement entrés dans les cellules du parenchyme. Nous pourrions par exemple visualiser les radiotraceurs dans les tissus, à l'aide d'une imagerie par rayons X.

Nous avons par ailleurs tenté de quantifier par qRT-PCR l'effet inhibiteur des siRNA au niveau de la tumeur, sans succès, alors que cela fonctionnait parfaitement *in vitro*. Toutes les équipes du Consortium ont rencontré ce problème, indiquant qu'il ne résultait pas d'un obstacle technique propre à notre laboratoire. Cette impossibilité reproductible à doser l'expression du gène cible et par conséquent son inhibition par les siRNA pourrait s'expliquer par le fait que nous dosons l'expression d'un gène humain dans une tumeur humaine au sein d'un organisme animal. En fait, la tumeur étant partiellement envahie de stroma murin, les ARN totaux que l'on quantifie avant la PCR, pour la normaliser, sont la somme des ARN humains et murins, alors que l'effet des siRNA ne se produit que sur la partie humaine. Comme la proportion de tissu murin est très variable d'une tumeur à l'autre, cela fausse la quantification. Par ailleurs, la transfection peut s'effectuer de façon très hétérogène dans le tissu. L'immunohistochimie est une alternative incontournable à la qRT-PCR (ou au western blot pour lequel le problème est le même) qui s'affranchirait de ce biais. Cette technique est au point dans le laboratoire du professeur Brambilla⁽²⁷⁴⁾ qui nous fait profiter de son expertise. Nous avons d'ailleurs commencé l'analyse de tumeurs issues des expérimentations *in vivo* et les résultats préliminaires sont positifs.

L'important pour nous était de garder les mêmes cellules du début à la fin de l'étude, afin d'avoir des modèles cohérents des étapes *in vitro* aux études précliniques. Si, contrairement aux résultats obtenus *in vitro*, nous n'avions pu sensibiliser à la chimiothérapie les cellules injectées chez l'animal, les causes auraient pu être les modifications contextuelles apportées par l'animal.

L'accès des siRNA aux cellules est par exemple particulièrement différent *in vitro* et *in vivo*. Il est direct *in vitro*, alors qu'*in vivo*, un certain nombre de paramètres entrent en jeu pour éventuellement réduire cet accès. La voie d'administration, le véhicule (PEI chez la souris / oligofectamine *in vitro*), la distribution dans l'organisme (dilution et élimination rapide), l'accès aux cellules de la masse tumorale dont la vascularisation n'est pas forcément la plus dense, la BHE au niveau du cerveau.

Nos résultats positifs *in vivo* démontrent que l'administration des siRNA est efficace. En d'autres termes, même si l'on peut optimiser ce traitement en améliorant la vectorisation, le ciblage, la stabilité des siRNA, ils peuvent déjà atteindre une cible cellulaire. L'administration de siRNA peut donc être réalisée efficacement à destination thérapeutique.

La dimension pragmatique de notre travail, dont la finalité clinique transparaît en de nombreux points est retrouvée dans le Consortium siRNA *in vivo* soutenu par la LNCC. Ce projet est le fruit de la réflexion d'utilisateurs de siRNA dont l'objectif est de les porter en clinique. Cela a conduit à fixer des critères garantissant la spécificité des siRNA, leur efficacité, avec toutes les difficultés que nous avons à la prédire sur des modèles précliniques, et leur innocuité. L'ensemble de nos travaux, des premiers, *in vitro*, aux derniers, *in vivo*, ont permis de définir un cadre expérimental tout à fait transférable à d'autres questions. Si les modèles *in vitro* et *in vivo* que nous avons établis ne peuvent répondre qu'à des questions identiques ou connexes à la nôtre, avec d'autres gènes candidats, comme c'est le cas pour nos travaux avec la société TRANSAT, la démarche expérimentale suivie pour la validation des siRNA *in vivo*, peut être utilisée comme une base robuste pour établir toute démonstration concernant la validation de siRNA thérapeutiques. La société TRANSAT, basée à Lyon, et avec laquelle nous collaborons, a transposé les paramètres de notre test à un format automatisé et à débit supérieur afin de valider leur banque de siRNA dirigés contre le kinome. Cette collaboration scientifiquement enrichissante valorise au niveau industriel les performances de notre test de chimio-sensibilité. Cette transposition n'a nécessité que des modifications mineures, et permet de délivrer un flux plus important de résultats. Après l'échec de la plate-forme puce-à-cellules du projet iCancéroDrops, TRANSAT nous offre l'opportunité d'un travail au format haut-débit. Les premiers résultats indiquent que des cibles ont un potentiel comparable voir supérieur aux gènes de réparation.

Lors de ces travaux, nous avons dans un premier temps identifié des gènes impliqués dans la chimio-résistance des gliomes. Ces gènes sont des cibles thérapeutiques innovantes que nous sommes en train de valider au niveau préclinique. L'application de notre modèle d'étude aux kinases et phosphatases a permis de mettre à jour de nouveaux gènes cibles pour une stratégie chimio-sensibilisatrice. Ces gènes n'iront pas grossir les rangs des innombrables cibles thérapeutiques potentielles jamais validées. En effet, cette recherche a d'autant plus d'intérêt que nous proposons tous les outils pour les valider *in vivo*.

PERSPECTIVES

Le projet se poursuivra dans un premier temps par la transposition des études *in vitro* aux cellules souches cancéreuses puisque des données nouvelles soulignent l'importance de ces cellules dans la biologie des tumeurs.

Parallèlement à cela, les expérimentations en sous-cutanée seront étendues à d'autres lignées d'astrocytomes (LN229 IV1 et U87 IV1), puis dans des modèles orthotopiques de gliomes.

Une fois ces différentes étapes validées, les aspects *in vivo* concluants seront une base scientifique raisonnable pour lancer un essai clinique. Il restera alors à ajouter quelques paramètres réglementaires tels que l'évaluation de la toxicité du traitement et la production des outils en qualité GMP (Good Manufacturing Practice). Concernant l'étude de la toxicité, un contrat de prestation de service est en cours avec la société Oncodesign basée sur Dijon. Quant au caractère GMP des outils, les sociétés produisant les siRNA (Eurogentec) et le PEI (Polyplus) nous ont d'ores et déjà assuré une telle production.

Nos travaux sont en accord avec l'hypothèse que nous avons posée concernant la diminution d'expression consécutive à la perte d'hétérozygotie des bras 1p et 19q. Il serait par conséquent intéressant d'effectuer une analyse transcriptomique des tumeurs de patients répondeurs et non répondeurs aux traitements, afin de déterminer les gènes les plus sous-exprimés dans les entités sensibles et ainsi réaliser un nouveau criblage à la fois plus ciblé mais concernant un plus grand nombre de familles de gènes.

Dans le cadre de l'essai clinique, il pourrait être utile de mesurer l'expression et la fonction des gènes de réparation chez les patients éligibles pour une chimio-sensibilisation anti-ercc1. Nous avons vu que l'expression au niveau de l'ARN ne pouvait répondre à cette question, même si ces gènes sont surexprimés dans les GBM par rapport aux oligodendrogliomes, ce qui peut sembler paradoxal. Il faudrait alors évaluer l'intérêt pronostique d'un dosage immunohistochimique de ERCC1 sur des prélèvements biopsiques, ou mieux, mesurer la fonction de réparation de ERCC1 en mettant en place un dosage enzymatique et ainsi sélectionner les patients qui pourraient répondre à notre traitement chimio-sensibilisant.

L'imagerie permettra d'autre part de déterminer pour la première fois comment se distribuent les siRNA chez l'Homme. Cette information sera bien sûr utile pour nous, mais aussi pour le reste de

la communauté scientifique, et permettra l'amélioration de l'administration, et donc probablement de l'efficacité du traitement.

D'autres siRNA seront testés sur ces différents modèles de tumorigenèse. Ces siRNA seront d'une part issus de ces travaux : gènes d'intérêt déjà validés *in vitro*, autres gènes de la zone 1p/19q qui pourront l'être par la suite. D'autre part, notre collaboration avec la société TRANSAT a souligné l'implication de certaines phosphatases et kinases dans les mécanismes de prolifération et de chimio-résistance. Ces cibles seront évaluées de la même manière.

Par ailleurs, la radiothérapie, tout comme la chimiothérapie, cause des dégâts à l'ADN qui sont corrigés par les gènes de réparation. Il est alors probable que des siRNA sensibilisant les tumeurs à la chimiothérapie feraient de même pour la radiothérapie. Ce traitement serait alors particulièrement pertinent dans le contexte du protocole actuel de radio- et chimiothérapie concomitantes.

La perspective finale que nous avons ouverte concerne la mise en place de stratégies chimio-sensibilisantes, à travers la modulation d'expression des kinases. Plusieurs cibles ont été validées et elles bénéficieront pour leur développement ultérieur des bases méthodologiques que nous avons mises en place.

BIBLIOGRAPHIE

1. Maher, E. A., Furnari, F. B., Bachoo, R. M., Rowitch, D. H., Louis, D. N., Cavenee, W. K., and DePinho, R. A. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev*, *15*: 1311-1333, 2001.
2. Sanai, N., Alvarez-Buylla, A., and Berger, M. S. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med*, *353*: 811-822, 2005.
3. Hunter, K. E. and Hatten, M. E. Radial glial cell transformation to astrocytes is bidirectional: regulation by a diffusible factor in embryonic forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*: 2061-2065, 1995.
4. Soriano, E., Alvarado-Mallart, R. M., Dumesnil, N., Del Rio, J. A., and Sotelo, C. Cajal-Retzius cells regulate the radial glia phenotype in the adult and developing cerebellum and alter granule cell migration. *Neuron*, *18*: 563-577, 1997.
5. Leavitt, B. R., Hernit-Grant, C. S., and Macklis, J. D. Mature astrocytes transform into transitional radial glia within adult mouse neocortex that supports directed migration of transplanted immature neurons. *Exp Neurol*, *157*: 43-57, 1999.
6. Magavi, S. S., Leavitt, B. R., and Macklis, J. D. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature*, *405*: 951-955, 2000.
7. Kraus, J. A., Koopmann, J., Kaskel, P., Maintz, D., Brandner, S., Schramm, J., Louis, D. N., Wiestler, O. D., and von Deimling, A. Shared allelic losses on chromosomes 1p and 19q suggest a common origin of oligodendroglioma and oligoastrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol*, *54*: 91-95, 1995.
8. Reynolds, B. A. and Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, *255*: 1707-1710, 1992.
9. Palmer, T. D., Takahashi, J., and Gage, F. H. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci*, *8*: 389-404, 1997.
10. Roy, N. S., Wang, S., Harrison-Restelli, C., Benraiss, A., Fraser, R. A., Gravel, M., Braun, P. E., and Goldman, S. A. Identification, isolation, and promoter-defined separation of mitotic oligodendrocyte progenitor cells from the adult human subcortical white matter. *J Neurosci*, *19*: 9986-9995, 1999.
11. Johansson, C. B., Svensson, M., Wallstedt, L., Janson, A. M., and Frisen, J. Neural stem cells in the adult human brain. *Exp Cell Res*, *253*: 733-736, 1999.
12. Craig, C. G., Tropepe, V., Morshead, C. M., Reynolds, B. A., Weiss, S., and van der Kooy, D. In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci*, *16*: 2649-2658, 1996.
13. Fricker-Gates, R. A., Winkler, C., Kirik, D., Rosenblad, C., Carpenter, M. K., and Bjorklund, A. EGF infusion stimulates the proliferation and migration of embryonic progenitor cells transplanted in the adult rat striatum. *Exp Neurol*, *165*: 237-247, 2000.
14. Berger, F., Gay, E., Pelletier, L., Tropel, P., and Wion, D. Development of gliomas: potential role of asymmetrical cell division of neural stem cells. *Lancet Oncol*, *5*: 511-514, 2004.
15. Williams, R. W. and Herrup, K. The control of neuron number. *Annu Rev Neurosci*, *11*: 423-453, 1988.
16. Bruni, J. E., Del Bigio, M. R., and Clattenburg, R. E. Ependyma: normal and pathological. A review of the literature. *Brain Res*, *356*: 1-19, 1985.
17. Kleihues, P. and Sobin, L. H. World Health Organization classification of tumors. *Cancer*, *88*: 2887, 2000.
18. Kleihues, P., Burger, P. C., and Scheithauer, B. W. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol*, *3*: 255-268, 1993.
19. Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A. F., and Delattre, J. Y. Primary brain tumours in adults. *Lancet*, *361*: 323-331, 2003.
20. Dumas-Duport, C., Tucker, M. L., Kolles, H., Cervera, P., Beuvon, F., Varlet, P., Udo, N., Koziak, M., and Chodkiewicz, J. P. Oligodendrogliomas. Part II: A new grading system based on morphological and imaging criteria. *J Neurooncol*, *34*: 61-78, 1997.
21. Dumas-Duport, C., Beuvon, F., Varlet, P., and Fallet-Bianco, C. [Gliomas: WHO and Sainte-Anne Hospital classifications]. *Ann Pathol*, *20*: 413-428, 2000.
22. Ohgaki, H. and Kleihues, P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)*, *109*: 93-108, 2005.

23. Rasheed, B. K., Wiltshire, R. N., Bigner, S. H., and Bigner, D. D. Molecular pathogenesis of malignant gliomas. *Curr Opin Oncol*, 11: 162-167, 1999.
24. Fujimoto, M., Fults, D. W., Thomas, G. A., Nakamura, Y., Heilbrun, M. P., White, R., Story, J. L., Naylor, S. L., Kagan-Hallet, K. S., and Sheridan, P. J. Loss of heterozygosity on chromosome 10 in human glioblastoma multiforme. *Genomics*, 4: 210-214, 1989.
25. Bigner, S. H., Mark, J., Burger, P. C., Mahaley, M. S., Jr., Bullard, D. E., Muhlbaier, L. H., and Bigner, D. D. Specific chromosomal abnormalities in malignant human gliomas. *Cancer Res*, 48: 405-411, 1988.
26. Jenkins, R. B., Kimmel, D. W., Moertel, C. A., Schultz, C. G., Scheithauer, B. W., Kelly, P. J., and Dewald, G. W. A cytogenetic study of 53 human gliomas. *Cancer Genet Cytogenet*, 39: 253-279, 1989.
27. Pershouse, M. A., Stubblefield, E., Hadi, A., Killary, A. M., Yung, W. K., and Steck, P. A. Analysis of the functional role of chromosome 10 loss in human glioblastomas. *Cancer Res*, 53: 5043-5050, 1993.
28. Yamada, K., Kasama, M., Kondo, T., Shinoura, N., and Yoshioka, M. Chromosome studies in 70 brain tumors with special attention to sex chromosome loss and single autosomal trisomy. *Cancer Genet Cytogenet*, 73: 46-52, 1994.
29. Maintz, D., Fiedler, K., Koopmann, J., Rollbrocker, B., Nechev, S., Lenartz, D., Stangl, A. P., Louis, D. N., Schramm, J., Wiestler, O. D., and von Deimling, A. Molecular genetic evidence for subtypes of oligoastrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 56: 1098-1104, 1997.
30. Chamberlain, M. C. and Kormanik, P. A. Practical guidelines for the treatment of malignant gliomas. *West J Med*, 168: 114-120, 1998.
31. Libermann, T. A., Nusbaum, H. R., Razon, N., Kris, R., Lax, I., Soreq, H., Whittle, N., Waterfield, M. D., Ullrich, A., and Schlessinger, J. Amplification and overexpression of the EGF receptor gene in primary human glioblastomas. *J Cell Sci Suppl*, 3: 161-172, 1985.
32. Ohgaki, H. Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology*, 25: 1-7, 2005.
33. Reifenberger, J., Reifenberger, G., Liu, L., James, C. D., Wechsler, W., and Collins, V. P. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol*, 145: 1175-1190, 1994.
34. Cairncross, J. G., Ueki, K., Zlatescu, M. C., Lisle, D. K., Finkelstein, D. M., Hammond, R. R., Silver, J. S., Stark, P. C., Macdonald, D. R., Ino, Y., Ramsay, D. A., and Louis, D. N. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst*, 90: 1473-1479, 1998.
35. Jenkins, R. B., Blair, H., Ballman, K. V., Giannini, C., Arusell, R. M., Law, M., Flynn, H., Passe, S., Felten, S., Brown, P. D., Shaw, E. G., and Buckner, J. C. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res*, 66: 9852-9861, 2006.
36. Zhu, J. J., Santarius, T., Wu, X., Tsong, J., Guha, A., Wu, J. K., Hudson, T. J., and Black, P. M. Screening for loss of heterozygosity and microsatellite instability in oligodendrogliomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 21: 207-216, 1998.
37. Hoang-Xuan, K., He, J., Huguet, S., Mokhtari, K., Marie, Y., Kujas, M., Leuraud, P., Capelle, L., Delattre, J. Y., Poirier, J., Broet, P., and Sanson, M. Molecular heterogeneity of oligodendrogliomas suggests alternative pathways in tumor progression. *Neurology*, 57: 1278-1281, 2001.
38. Hardell, L., Carlberg, M., Soderqvist, F., Mild, K. H., and Morgan, L. L. Long-term use of cellular phones and brain tumours: increased risk associated with use for > or =10 years. *Occup Environ Med*, 64: 626-632, 2007.
39. Brandes, A. A. and Fiorentino, M. V. The role of chemotherapy in recurrent malignant gliomas: an overview. *Cancer Invest*, 14: 551-559, 1996.
40. Smith, J. S. and Jenkins, R. B. Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications. *Front Biosci*, 5: D213-231, 2000.
41. Chinot, O. [New place of the chemotherapy in gliomas]. *Bull Cancer*, 92: 343-354, 2005.
42. Graham, C. A. and Cloughesy, T. F. Brain tumor treatment: chemotherapy and other new developments. *Semin Oncol Nurs*, 20: 260-272, 2004.
43. Chinot, O. Chemotherapy for the treatment of oligodendroglial tumors. *Semin Oncol*, 28: 13-18, 2001.
44. Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G.,

- Eisenhauer, E., and Mirimanoff, R. O. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352: 987-996, 2005.
45. Whittle, I. R. Surgery for gliomas. *Curr Opin Neurol*, 15: 663-669, 2002.
 46. Hoffman, W. F., Levin, V. A., and Wilson, C. B. Evaluation of malignant glioma patients during the postirradiation period. *J Neurosurg*, 50: 624-628, 1979.
 47. Delattre, J. Y., Fuks, Z., Krol, G., Rottenberg, D. A., and Posner, J. B. Cerebral necrosis following neutron radiation of an extracranial tumor. *J Neurooncol*, 6: 113-117, 1988.
 48. Leibel, S. A., Sheline, G. E., Wara, W. M., Boldrey, E. B., and Nielsen, S. L. The role of radiation therapy in the treatment of astrocytomas. *Cancer*, 35: 1551-1557, 1975.
 49. Shaw, E. G., Dumas-Duport, C., Scheithauer, B. W., Gilbertson, D. T., O'Fallon, J. R., Earle, J. D., Laws, E. R., Jr., and Okazaki, H. Radiation therapy in the management of low-grade supratentorial astrocytomas. *J Neurosurg*, 70: 853-861, 1989.
 50. Wallner, K. E., Gonzales, M. F., Edwards, M. S., Wara, W. M., and Sheline, G. E. Treatment results of juvenile pilocytic astrocytoma. *J Neurosurg*, 69: 171-176, 1988.
 51. Sheline, G. E. Radiation therapy of primary tumors. *Semin Oncol*, 2: 29-42, 1975.
 52. Marsa, G. W., Goffinet, D. R., Rubinstein, L. J., and Bagshaw, M. A. Megavoltage irradiation in the treatment of gliomas of the brain and spinal cord. *Cancer*, 36: 1681-1689, 1975.
 53. Walker, M. D., Alexander, E., Jr., Hunt, W. E., MacCarty, C. S., Mahaley, M. S., Jr., Mealey, J., Jr., Norrell, H. A., Owens, G., Ransohoff, J., Wilson, C. B., Gehan, E. A., and Strike, T. A. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg*, 49: 333-343, 1978.
 54. Salzman, M. Malignant glioma management. *Neurosurg Clin N Am*, 1: 49-63, 1990.
 55. Salmon, I., Dewitte, O., Pasteels, J. L., Flament-Durand, J., Brotchi, J., Vereerstraeten, P., and Kiss, R. Prognostic scoring in adult astrocytic tumors using patient age, histopathological grade, and DNA histogram type. *J Neurosurg*, 80: 877-883, 1994.
 56. Stupp, R., Pica, A., Mirimanoff, R. O., and Michelin, O. [A practical guide for the management of gliomas]. *Bull Cancer*, 94: 817-822, 2007.
 57. Newlands, E. S., Stevens, M. F., Wedge, S. R., Wheelhouse, R. T., and Brock, C. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat Rev*, 23: 35-61, 1997.
 58. Prados, M. D., Scott, C., Curran, W. J., Jr., Nelson, D. F., Leibel, S., and Kramer, S. Procarbazine, lomustine, and vincristine (PCV) chemotherapy for anaplastic astrocytoma: A retrospective review of radiation therapy oncology group protocols comparing survival with carmustine or PCV adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*, 17: 3389-3395, 1999.
 59. Biston, M. C., Joubert, A., Adam, J. F., Elleaume, H., Bohic, S., Charvet, A. M., Esteve, F., Foray, N., and Balosso, J. Cure of Fisher rats bearing radioresistant F98 glioma treated with cis-platinum and irradiated with monochromatic synchrotron X-rays. *Cancer Res*, 64: 2317-2323, 2004.
 60. Vredenburgh, J. J., Desjardins, A., Herndon, J. E., 2nd, Marcello, J., Reardon, D. A., Quinn, J. A., Rich, J. N., Sathornsumetee, S., Gururangan, S., Sampson, J., Wagner, M., Bailey, L., Bigner, D. D., Friedman, A. H., and Friedman, H. S. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol*, 25: 4722-4729, 2007.
 61. Batchelor, T. T., Sorensen, A. G., di Tomaso, E., Zhang, W. T., Duda, D. G., Cohen, K. S., Kozak, K. R., Cahill, D. P., Chen, P. J., Zhu, M., Ancukiewicz, M., Mrugala, M. M., Plotkin, S., Drappatz, J., Louis, D. N., Ivy, P., Scadden, D. T., Benner, T., Loeffler, J. S., Wen, P. Y., and Jain, R. K. AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell*, 11: 83-95, 2007.
 62. Franceschi, E., Cavallo, G., Lonardi, S., Magrini, E., Tosoni, A., Grosso, D., Scopece, L., Blatt, V., Urbini, B., Pession, A., Tallini, G., Crino, L., and Brandes, A. A. Gefitinib in patients with progressive high-grade gliomas: a multicentre phase II study by Gruppo Italiano Cooperativo di Neuro-Oncologia (GICNO). *Br J Cancer*, 96: 1047-1051, 2007.
 63. Chakravarti, A. An update of phase II results from RTOG 0211: A phase I/II study of gefitinib with radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol*, 24: 1527, 2006.
 64. Heimberger, A. B. Tumor-specific peptide vaccination in newly-diagnosed patients with GBM. *J Clin Oncol*, 24: 2529, 2006.
 65. Fine, H. A. Results from phase II trial of enzastaurin (LY317615) in patients with recurrent high grade gliomas. *J Clin Oncol*, 23: 1504, 2005.

66. Cairncross, J. G. and Macdonald, D. R. Successful chemotherapy for recurrent malignant oligodendroglioma. *Ann Neurol*, 23: 360-364, 1988.
67. Macdonald, D. R., Gaspar, L. E., and Cairncross, J. G. Successful chemotherapy for newly diagnosed aggressive oligodendroglioma. *Ann Neurol*, 27: 573-574, 1990.
68. Cairncross, G., Macdonald, D., Ludwin, S., Lee, D., Cascino, T., Buckner, J., Fulton, D., Dropcho, E., Stewart, D., Schold, C., Jr., and et al. Chemotherapy for anaplastic oligodendroglioma. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol*, 12: 2013-2021, 1994.
69. Abrey, L. E., Louis, D. N., Paleologos, N., Lassman, A. B., Raizer, J. J., Mason, W., Finlay, J., MacDonald, D. R., DeAngelis, L. M., and Cairncross, J. G. Survey of treatment recommendations for anaplastic oligodendroglioma. *Neuro Oncol*, 9: 314-318, 2007.
70. Kros, J. M., Gorlia, T., Kouwenhoven, M. C., Zheng, P. P., Collins, V. P., Figarella-Branger, D., Giangaspero, F., Giannini, C., Mokhtari, K., Mork, S. J., Paetau, A., Reifenberger, G., and van den Bent, M. J. Panel review of anaplastic oligodendroglioma from European Organization For Research and Treatment of Cancer Trial 26951: assessment of consensus in diagnosis, influence of 1p/19q loss, and correlations with outcome. *J Neuropathol Exp Neurol*, 66: 545-551, 2007.
71. Katsetos, C. D., Del, V. L., Geddes, J. F., Aldape, K., Boyd, J. C., Legido, A., Khalili, K., Perentes, E., and Mork, S. J. Localization of the neuronal class III beta-tubulin in oligodendrogliomas: comparison with Ki-67 proliferative index and 1p/19q status. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61: 307-320, 2002.
72. Barbashina, V., Salazar, P., Holland, E. C., Rosenblum, M. K., and Ladanyi, M. Allelic losses at 1p36 and 19q13 in gliomas: correlation with histologic classification, definition of a 150-kb minimal deleted region on 1p36, and evaluation of CAMTA1 as a candidate tumor suppressor gene. *Clin Cancer Res*, 11: 1119-1128, 2005.
73. Smith, J. S., Alderete, B., Minn, Y., Borell, T. J., Perry, A., Mohapatra, G., Hosek, S. M., Kimmel, D., O'Fallon, J., Yates, A., Feuerstein, B. G., Burger, P. C., Scheithauer, B. W., and Jenkins, R. B. Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. *Oncogene*, 18: 4144-4152, 1999.
74. Law, M. E., Templeton, K. L., Kitange, G., Smith, J., Misra, A., Feuerstein, B. G., and Jenkins, R. B. Molecular cytogenetic analysis of chromosomes 1 and 19 in glioma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet*, 160: 1-14, 2005.
75. Nakamura, M., Yang, F., Fujisawa, H., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59: 539-543, 2000.
76. Pors, K. and Patterson, L. H. DNA mismatch repair deficiency, resistance to cancer chemotherapy and the development of hypersensitive agents. *Curr Top Med Chem*, 5: 1133-1149, 2005.
77. Villedieu, M., Louis, M. H., Dutoit, S., Brotin, E., Lincet, H., Duigou, F., Staedel, C., Gauduchon, P., and Poulain, L. Absence of Bcl-xL down-regulation in response to cisplatin is associated with chemoresistance in ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol*, 105: 31-44, 2007.
78. Luqmani, Y. A. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med Princ Pract*, 14 Suppl 1: 35-48, 2005.
79. Debenham, P. G., Kartner, N., Siminovich, L., Riordan, J. R., and Ling, V. DNA-mediated transfer of multiple drug resistance and plasma membrane glycoprotein expression. *Mol Cell Biol*, 2: 881-889, 1982.
80. Kartner, N., Riordan, J. R., and Ling, V. Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science*, 221: 1285-1288, 1983.
81. Chan, H. S., Thorner, P. S., Haddad, G., and Ling, V. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J Clin Oncol*, 8: 689-704, 1990.
82. Chan, H. S., Haddad, G., Thorner, P. S., DeBoer, G., Lin, Y. P., Ondrusek, N., Yeger, H., and Ling, V. P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma. *N Engl J Med*, 325: 1608-1614, 1991.
83. Chan, H. S., Thorner, P. S., Haddad, G., and Gallie, B. L. Multidrug-resistant phenotype in retinoblastoma correlates with P-glycoprotein expression. *Ophthalmology*, 98: 1425-1431, 1991.
84. Goldstein, L. J., Galski, H., Fojo, A., Willingham, M., Lai, S. L., Gazdar, A., Pirker, R., Green, A., Crist, W., Brodeur, G. M., and et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst*, 81: 116-124, 1989.
85. Noonan, K. E., Beck, C., Holzmayer, T. A., Chin, J. E., Wunder, J. S., Andrusis, I. L., Gazdar, A. F., Willman, C. L., Griffith, B., Von Hoff, D. D., and et al. Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 7160-7164, 1990.

86. Gandhi, L., Harding, M. W., Neubauer, M., Langer, C. J., Moore, M., Ross, H. J., Johnson, B. E., and Lynch, T. J. A phase II study of the safety and efficacy of the multidrug resistance inhibitor VX-710 combined with doxorubicin and vincristine in patients with recurrent small cell lung cancer. *Cancer*, 109: 924-932, 2007.
87. Tulpule, A., Espina, B. M., Berman, N., Buchanan, L. H., Smith, D. L., Sherrod, A., Dharmapala, D., Gee, C., Boswell, W. D., Nathwani, B. N., Welles, L., and Levine, A. M. Phase I/II trial of nonpegylated liposomal doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, and prednisone in the treatment of newly diagnosed aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma*, 7: 59-64, 2006.
88. Wells, A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol*, 31: 637-643, 1999.
89. Chakravarti, A., Dicker, A., and Mehta, M. The contribution of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway to radioresistance in human gliomas: a review of preclinical and correlative clinical data. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 58: 927-931, 2004.
90. Stommel, J. M., Kimmelman, A. C., Ying, H., Nabioullin, R., Ponugoti, A. H., Wiedemeyer, R., Stegh, A. H., Bradner, J. E., Ligon, K. L., Brennan, C., Chin, L., and DePinho, R. A. Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science*, 318: 287-290, 2007.
91. Wong, A. J., Bigner, S. H., Bigner, D. D., Kinzler, K. W., Hamilton, S. R., and Vogelstein, B. Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84: 6899-6903, 1987.
92. Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., Puc, J., Miliareisis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S. H., Giovanella, B. C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M. H., and Parsons, R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 275: 1943-1947, 1997.
93. El-Obeid, A., Bongcam-Rudloff, E., Sorby, M., Ostman, A., Nister, M., and Westermark, B. Cell scattering and migration induced by autocrine transforming growth factor alpha in human glioma cells in vitro. *Cancer Res*, 57: 5598-5604, 1997.
94. Nagane, M., Coufal, F., Lin, H., Bogler, O., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res*, 56: 5079-5086, 1996.
95. Ekstrand, A. J., Sugawa, N., James, C. D., and Collins, V. P. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 4309-4313, 1992.
96. Nishikawa, K., Rotbein, J., Vijjeswarapu, D., Owen-Schaub, L., Rosenblum, M. G., and Donato, N. J. Positive and negative selection for tumor necrosis factor responsiveness reveals an inhibitory role for EGF receptor in TNF-induced antiproliferation. *Lymphokine Cytokine Res*, 13: 37-45, 1994.
97. Huang, H. S., Nagane, M., Klingbeil, C. K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X. D., Huang, C. M., Gill, G. N., Wiley, H. S., and Cavenee, W. K. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem*, 272: 2927-2935, 1997.
98. Nagane, M., Levitzki, A., Gazit, A., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 5724-5729, 1998.
99. Watanabe, T., Nakamura, M., Kros, J. M., Burkhard, C., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. Phenotype versus genotype correlation in oligodendrogliomas and low-grade diffuse astrocytomas. *Acta Neuropathol (Berl)*, 103: 267-275, 2002.
100. Souliotis, V. L., Boussiotis, V. A., Pangalis, G. A., and Kyrtopoulos, S. A. In vivo formation and repair of O6-methylguanine in human leukocyte DNA after intravenous exposure to dacarbazine. *Carcinogenesis*, 12: 285-288, 1991.
101. Gerson, S. L. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*, 4: 296-307, 2004.
102. Esteller, M., Risques, R. A., Toyota, M., Capella, G., Moreno, V., Peinado, M. A., Baylin, S. B., and Herman, J. G. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*, 61: 4689-4692, 2001.
103. Nakamura, M., Watanabe, T., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis*, 22: 1715-1719, 2001.
104. Jones, P. A. and Laird, P. W. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*, 21: 163-167, 1999.

105. Jones, P. A. and Baylin, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, 3: 415-428, 2002.
106. Herman, J. G. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Semin Cancer Biol*, 9: 359-367, 1999.
107. Qian, X. C. and Brent, T. P. Methylation hot spots in the 5' flanking region denote silencing of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Res*, 57: 3672-3677, 1997.
108. Watts, G. S., Pieper, R. O., Costello, J. F., Peng, Y. M., Dalton, W. S., and Futscher, B. W. Methylation of discrete regions of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) CpG island is associated with heterochromatinization of the MGMT transcription start site and silencing of the gene. *Mol Cell Biol*, 17: 5612-5619, 1997.
109. Esteller, M., Hamilton, S. R., Burger, P. C., Baylin, S. B., and Herman, J. G. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res*, 59: 793-797, 1999.
110. Herman, J. G. and Baylin, S. B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*, 349: 2042-2054, 2003.
111. Stupp, R., Hegi, M. E., Gilbert, M. R., and Chakravarti, A. Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *J Clin Oncol*, 25: 4127-4136, 2007.
112. Stupp, R. and Hegi, M. E. Methylguanine methyltransferase testing in glioblastoma: when and how? *J Clin Oncol*, 25: 1459-1460, 2007.
113. Hau, P., Stupp, R., and Hegi, M. E. MGMT methylation status: the advent of stratified therapy in glioblastoma? *Dis Markers*, 23: 97-104, 2007.
114. Jaeckle, K. A., Eyre, H. J., Townsend, J. J., Schulman, S., Knudson, H. M., Belanich, M., Yarosh, D. B., Bearman, S. I., Giroux, D. J., and Schold, S. C. Correlation of tumor O6 methylguanine-DNA methyltransferase levels with survival of malignant astrocytoma patients treated with bis-chloroethylnitrosourea: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol*, 16: 3310-3315, 1998.
115. Friedman, H. S., McLendon, R. E., Kerby, T., Dugan, M., Bigner, S. H., Henry, A. J., Ashley, D. M., Krischer, J., Lovell, S., Rasheed, K., Marchev, F., Seman, A. J., Cokgor, I., Rich, J., Stewart, E., Colvin, O. M., Provenzale, J. M., Bigner, D. D., Haglund, M. M., Friedman, A. H., and Modrich, P. L. DNA mismatch repair and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. *J Clin Oncol*, 16: 3851-3857, 1998.
116. Stupp, R., Dietrich, P. Y., Ostermann Kraljevic, S., Pica, A., Maillard, I., Maeder, P., Meuli, R., Janzer, R., Pizzolato, G., Miralbell, R., Porchet, F., Regli, L., de Tribolet, N., Mirimanoff, R. O., and Leyvraz, S. Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *J Clin Oncol*, 20: 1375-1382, 2002.
117. Grombacher, T., Mitra, S., and Kaina, B. Induction of the alkyltransferase (MGMT) gene by DNA damaging agents and the glucocorticoid dexamethasone and comparison with the response of base excision repair genes. *Carcinogenesis*, 17: 2329-2336, 1996.
118. Blough, M. D., Zlatescu, M. C., and Cairncross, J. G. O6-methylguanine-DNA methyltransferase regulation by p53 in astrocytic cells. *Cancer Res*, 67: 580-584, 2007.
119. Friedman, H. S. Can O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase depletion enhance alkylator activity in the clinic? *Clin Cancer Res*, 6: 2967-2968, 2000.
120. Olivi, A., Grossman, S. A., Tatter, S., Barker, F., Judy, K., Olsen, J., Bruce, J., Hilt, D., Fisher, J., and Piantadosi, S. Dose escalation of carmustine in surgically implanted polymers in patients with recurrent malignant glioma: a New Approaches to Brain Tumor Therapy CNS Consortium trial. *J Clin Oncol*, 21: 1845-1849, 2003.
121. Ranson, M., Middleton, M. R., Bridgewater, J., Lee, S. M., Dawson, M., Jowle, D., Halbert, G., Waller, S., McGrath, H., Gumbrell, L., McElhinney, R. S., Donnelly, D., McMurry, T. B., and Margison, G. P. Lomeguatrib, a potent inhibitor of O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase: phase I safety, pharmacodynamic, and pharmacokinetic trial and evaluation in combination with temozolomide in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*, 12: 1577-1584, 2006.
122. Feun, L. G., Savaraj, N., and Landy, H. J. Drug resistance in brain tumors. *J Neurooncol*, 20: 165-176, 1994.
123. Erickson, L. C., Laurent, G., Sharkey, N. A., and Kohn, K. W. DNA cross-linking and monoadduct repair in nitrosourea-treated human tumour cells. *Nature*, 288: 727-729, 1980.
124. Bodell, W. J., Rupniak, H. T., Rasmussen, J., Morgan, W. F., and Rosenblum, M. L. Reduced level of DNA cross-links and sister chromatid exchanges in 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea-resistant rat brain tumor cells. *Cancer Res*, 44: 3763-3767, 1984.

125. Hoeijmakers, J. H. DNA repair mechanisms. *Maturitas*, *38*: 17-22; discussion 22-13, 2001.
126. Ichimura, K., Bolin, M. B., Goike, H. M., Schmidt, E. E., Moshref, A., and Collins, V. P. Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. *Cancer Res*, *60*: 417-424, 2000.
127. Wood, R. D., Mitchell, M., and Lindahl, T. Human DNA repair genes, 2005. *Mutat Res*, *577*: 275-283, 2005.
128. Lindahl, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, *362*: 709-715, 1993.
129. Wood, R. D. DNA repair in eukaryotes. *Annu Rev Biochem*, *65*: 135-167, 1996.
130. Lindahl, T. and Wood, R. D. Quality control by DNA repair. *Science*, *286*: 1897-1905, 1999.
131. Paus, C., Murat, A., Stupp, R., Regli, L., and Hegi, M. [Role of MGMT and clinical applications in brain tumours]. *Bull Cancer*, *94*: 769-773, 2007.
132. Wilson, D. M., 3rd and Bohr, V. A. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair (Amst)*, *6*: 544-559, 2007.
133. Almeida, K. H. and Sobol, R. W. A unified view of base excision repair: Lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair (Amst)*, *6*: 695-711, 2007.
134. Wilson, D. M., 3rd and McNeill, D. R. Base excision repair and the central nervous system. *Neuroscience*, *145*: 1187-1200, 2007.
135. Hoeijmakers, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, *411*: 366-374, 2001.
136. Wilson, D. M., 3rd and Thompson, L. H. Life without DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*: 12754-12757, 1997.
137. McGoldrick, J. P., Yeh, Y. C., Solomon, M., Essigmann, J. M., and Lu, A. L. Characterization of a mammalian homolog of the Escherichia coli MutY mismatch repair protein. *Mol Cell Biol*, *15*: 989-996, 1995.
138. Wood, R. D., Mitchell, M., Sgouros, J., and Lindahl, T. Human DNA repair genes. *Science*, *291*: 1284-1289, 2001.
139. Friedberg, E. C. and Meira, L. B. Database of mouse strains carrying targeted mutations in genes affecting biological responses to DNA damage Version 7. *DNA Repair (Amst)*, *5*: 189-209, 2006.
140. Chow, E., Thirlwell, C., Macrae, F., and Lipton, L. Colorectal cancer and inherited mutations in base-excision repair. *Lancet Oncol*, *5*: 600-606, 2004.
141. Chappell, C., Hanakahi, L. A., Karimi-Busheri, F., Weinfeld, M., and West, S. C. Involvement of human polynucleotide kinase in double-strand break repair by non-homologous end joining. *Embo J*, *21*: 2827-2832, 2002.
142. Whitehouse, C. J., Taylor, R. M., Thistlethwaite, A., Zhang, H., Karimi-Busheri, F., Lasko, D. D., Weinfeld, M., and Caldecott, K. W. XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. *Cell*, *104*: 107-117, 2001.
143. Rasouli-Nia, A., Karimi-Busheri, F., and Weinfeld, M. Stable down-regulation of human polynucleotide kinase enhances spontaneous mutation frequency and sensitizes cells to genotoxic agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*: 6905-6910, 2004.
144. Plo, I., Liao, Z. Y., Barcelo, J. M., Kohlhagen, G., Caldecott, K. W., Weinfeld, M., and Pommier, Y. Association of XRCC1 and tyrosyl DNA phosphodiesterase (Tdp1) for the repair of topoisomerase I-mediated DNA lesions. *DNA Repair (Amst)*, *2*: 1087-1100, 2003.
145. Chaney, S. G. and Sancar, A. DNA repair: enzymatic mechanisms and relevance to drug response. *J Natl Cancer Inst*, *88*: 1346-1360, 1996.
146. de Boer, J. and Hoeijmakers, J. H. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, *21*: 453-460, 2000.
147. Cooper, P. K., Nospikel, T., Clarkson, S. G., and Leadon, S. A. Defective transcription-coupled repair of oxidative base damage in Cockayne syndrome patients from XP group G. *Science*, *275*: 990-993, 1997.
148. Bohr, V. A., Smith, C. A., Okumoto, D. S., and Hanawalt, P. C. DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell*, *40*: 359-369, 1985.
149. Ford, J. M. and Hanawalt, P. C. Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *J Biol Chem*, *272*: 28073-28080, 1997.

150. Ford, J. M. and Hanawalt, P. C. Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 8876-8880, 1995.
151. Hanawalt, P. C. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene*, 21: 8949-8956, 2002.
152. Arrand, J. E. and Murray, A. M. Benzpyrene groups bind preferentially to the DNA of active chromatin in human lung cells. *Nucleic Acids Res*, 10: 1547-1555, 1982.
153. Mayne, L. V. Inhibitors of DNA synthesis (aphidicolin and araC/HU) prevent the recovery of RNA synthesis after UV-irradiation. *Mutat Res*, 131: 187-191, 1984.
154. Tang, J. and Chu, G. Xeroderma pigmentosum complementation group E and UV-damaged DNA-binding protein. *DNA Repair (Amst)*, 1: 601-616, 2002.
155. Spivak, G., Itoh, T., Matsunaga, T., Nikaido, O., Hanawalt, P., and Yamaizumi, M. Ultraviolet-sensitive syndrome cells are defective in transcription-coupled repair of cyclobutane pyrimidine dimers. *DNA Repair (Amst)*, 1: 629-643, 2002.
156. Leadon, S. A. and Cooper, P. K. Preferential repair of ionizing radiation-induced damage in the transcribed strand of an active human gene is defective in Cockayne syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 10499-10503, 1993.
157. Price, V. H., Odom, R. B., Ward, W. H., and Jones, F. T. Trichothiodystrophy: sulfur-deficient brittle hair as a marker for a neuroectodermal symptom complex. *Arch Dermatol*, 116: 1375-1384, 1980.
158. Itin, P. H. and Pittelkow, M. R. Trichothiodystrophy: review of sulfur-deficient brittle hair syndromes and association with the ectodermal dysplasias. *J Am Acad Dermatol*, 22: 705-717, 1990.
159. Vermeulen, W., Rademakers, S., Jaspers, N. G., Appeldoorn, E., Raams, A., Klein, B., Kleijer, W. J., Hansen, L. K., and Hoeijmakers, J. H. A temperature-sensitive disorder in basal transcription and DNA repair in humans. *Nat Genet*, 27: 299-303, 2001.
160. Drapkin, R., Reardon, J. T., Ansari, A., Huang, J. C., Zawel, L., Ahn, K., Sancar, A., and Reinberg, D. Dual role of TFIIH in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase II. *Nature*, 368: 769-772, 1994.
161. McWhir, J., Selfridge, J., Harrison, D. J., Squires, S., and Melton, D. W. Mice with DNA repair gene (ERCC-1) deficiency have elevated levels of p53, liver nuclear abnormalities and die before weaning. *Nat Genet*, 5: 217-224, 1993.
162. Weeda, G., Donker, I., de Wit, J., Morreau, H., Janssens, R., Vissers, C. J., Nigg, A., van Steeg, H., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J. H. Disruption of mouse ERCC1 results in a novel repair syndrome with growth failure, nuclear abnormalities and senescence. *Curr Biol*, 7: 427-439, 1997.
163. Li, Q., Yu, J. J., Mu, C., Yunmbam, M. K., Slavsky, D., Cross, C. L., Bostick-Bruton, F., and Reed, E. Association between the level of ERCC-1 expression and the repair of cisplatin-induced DNA damage in human ovarian cancer cells. *Anticancer Res*, 20: 645-652, 2000.
164. Selvakumaran, M., Pisarcik, D. A., Bao, R., Yeung, A. T., and Hamilton, T. C. Enhanced cisplatin cytotoxicity by disturbing the nucleotide excision repair pathway in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res*, 63: 1311-1316, 2003.
165. Chang, I. Y., Kim, M. H., Kim, H. B., Lee do, Y., Kim, S. H., Kim, H. Y., and You, H. J. Small interfering RNA-induced suppression of ERCC1 enhances sensitivity of human cancer cells to cisplatin. *Biochem Biophys Res Commun*, 327: 225-233, 2005.
166. Altaha, R., Liang, X., Yu, J. J., and Reed, E. Excision repair cross complementing-group 1: gene expression and platinum resistance. *Int J Mol Med*, 14: 959-970, 2004.
167. Goode, E. L., Ulrich, C. M., and Potter, J. D. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11: 1513-1530, 2002.
168. Chen, P., Wiencke, J., Aldape, K., Kesler-Diaz, A., Miike, R., Kelsey, K., Lee, M., Liu, J., and Wrensch, M. Association of an ERCC1 polymorphism with adult-onset glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9: 843-847, 2000.
169. Metzger, R., Leichman, C. G., Danenberg, K. D., Danenberg, P. V., Lenz, H. J., Hayashi, K., Groshen, S., Salonga, D., Cohen, H., Laine, L., Crookes, P., Silberman, H., Baranda, J., Konda, B., and Leichman, L. ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol*, 16: 309-316, 1998.
170. Dabholkar, M., Bradshaw, L., Parker, R. J., Gill, I., Bostick-Bruton, F., Muggia, F. M., and Reed, E. Cisplatin-DNA damage and repair in peripheral blood leukocytes in vivo and in vitro. *Environ Health Perspect*, 98: 53-59, 1992.

171. Lord, R. V., Brabender, J., Gandara, D., Alberola, V., Camps, C., Domine, M., Cardenal, F., Sanchez, J. M., Gumerlock, P. H., Taron, M., Sanchez, J. J., Danenberg, K. D., Danenberg, P. V., and Rosell, R. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, *8*: 2286-2291, 2002.
172. Chen, Z. P., Malapetsa, A., Monks, A., Myers, T. G., Mohr, G., Sausville, E. A., Scudiero, D. A., and Panasci, L. C. Nucleotide excision repair protein levels vis-a-vis anticancer drug resistance in 60 human tumor cell lines. *Ai Zheng*, *21*: 233-239, 2002.
173. Xu, Z., Chen, Z. P., Malapetsa, A., Alaoui-Jamali, M., Bergeron, J., Monks, A., Myers, T. G., Mohr, G., Sausville, E. A., Scudiero, D. A., Aloyz, R., and Panasci, L. C. DNA repair protein levels vis-a-vis anticancer drug resistance in the human tumor cell lines of the National Cancer Institute drug screening program. *Anticancer Drugs*, *13*: 511-519, 2002.
174. Chen, Z. P., McQuillan, A., Mohr, G., and Panasci, L. C. Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency gene 2 expression and chloroethylnitrosourea resistance in human glioma cell lines. *Neurosurgery*, *42*: 1112-1119, 1998.
175. Chen, Z., Zhang, J., and Mohr, G. Enhancing alkylating agent resistance through ERCC2 gene transfection in human glioma cell line. *Chin Med J (Engl)*, *116*: 1171-1174, 2003.
176. Bartram, C. R., de Klein, A., Hagemeijer, A., van Agthoven, T., Geurts van Kessel, A., Bootsma, D., Grosveld, G., Ferguson-Smith, M. A., Davies, T., Stone, M., and et al. Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*, *306*: 277-280, 1983.
177. Heisterkamp, N., Stephenson, J. R., Groffen, J., Hansen, P. F., de Klein, A., Bartram, C. R., and Grosveld, G. Localization of the c-ab1 oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*, *306*: 239-242, 1983.
178. Liang, F., Han, M., Romanienko, P. J., and Jasin, M. Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*: 5172-5177, 1998.
179. Wilson, T. E. and Lieber, M. R. Efficient processing of DNA ends during yeast nonhomologous end joining. Evidence for a DNA polymerase beta (Pol4)-dependent pathway. *J Biol Chem*, *274*: 23599-23609, 1999.
180. Budman, J. and Chu, G. Processing of DNA for nonhomologous end-joining by cell-free extract. *Embo J*, *24*: 849-860, 2005.
181. Jung, D. and Alt, F. W. Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell*, *116*: 299-311, 2004.
182. Waterhouse, P. M., Wang, M. B., and Lough, T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, *411*: 834-842, 2001.
183. Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, *2*: 279-289, 1990.
184. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *391*: 806-811, 1998.
185. Kennerdell, J. R. and Carthew, R. W. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell*, *95*: 1017-1026, 1998.
186. Li, Y. X., Farrell, M. J., Liu, R., Mohanty, N., and Kirby, M. L. Double-stranded RNA injection produces null phenotypes in zebrafish. *Dev Biol*, *217*: 394-405, 2000.
187. Zhou, Y., Ching, Y. P., Kok, K. H., Kung, H. F., and Jin, D. Y. Post-transcriptional suppression of gene expression in *Xenopus* embryos by small interfering RNA. *Nucleic Acids Res*, *30*: 1664-1669, 2002.
188. Svoboda, P., Stein, P., and Schultz, R. M. RNAi in mouse oocytes and preimplantation embryos: effectiveness of hairpin dsRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, *287*: 1099-1104, 2001.
189. Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, *411*: 494-498, 2001.
190. Manche, L., Green, S. R., Schmedt, C., and Mathews, M. B. Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Mol Cell Biol*, *12*: 5238-5248, 1992.
191. Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H., and Schreiber, R. D. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, *67*: 227-264, 1998.
192. Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, *101*: 25-33, 2000.

193. Donze, O. and Picard, D. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res*, 30: e46, 2002.
194. Sui, G., Soohoo, C., Affar el, B., Gay, F., Shi, Y., and Forrester, W. C. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 5515-5520, 2002.
195. Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 296: 550-553, 2002.
196. Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J., and Conklin, D. S. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*, 16: 948-958, 2002.
197. Meister, G. and Tuschl, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431: 343-349, 2004.
198. Chalk, A. M., Warfinge, R. E., Georgii-Hemming, P., and Sonnhhammer, E. L. siRNAdb: a database of siRNA sequences. *Nucleic Acids Res*, 33: D131-134, 2005.
199. Ren, Y., Gong, W., Xu, Q., Zheng, X., Lin, D., Wang, Y., and Li, T. siRecords: an extensive database of mammalian siRNAs with efficacy ratings. *Bioinformatics*, 22: 1027-1028, 2006.
200. Truss, M., Swat, M., Kielbasa, S. M., Schafer, R., Herzel, H., and Hagemeyer, C. HuSiDa--the human siRNA database: an open-access database for published functional siRNA sequences and technical details of efficient transfer into recipient cells. *Nucleic Acids Res*, 33: D108-111, 2005.
201. Pei, Y. and Tuschl, T. On the art of identifying effective and specific siRNAs. *Nat Methods*, 3: 670-676, 2006.
202. Ding, Y., Chan, C. Y., and Lawrence, C. E. Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids. *Nucleic Acids Res*, 32: W135-141, 2004.
203. Luo, K. Q. and Chang, D. C. The gene-silencing efficiency of siRNA is strongly dependent on the local structure of mRNA at the targeted region. *Biochem Biophys Res Commun*, 318: 303-310, 2004.
204. Yiu, S. M., Wong, P. W., Lam, T. W., Mui, Y. C., Kung, H. F., Lin, M., and Cheung, Y. T. Filtering of ineffective siRNAs and improved siRNA design tool. *Bioinformatics*, 21: 144-151, 2005.
205. Holen, T., Amarzguioui, M., Wiiger, M. T., Babaie, E., and Prydz, H. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res*, 30: 1757-1766, 2002.
206. Grimm, D., Streetz, K. L., Jopling, C. L., Storm, T. A., Pandey, K., Davis, C. R., Marion, P., Salazar, F., and Kay, M. A. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*, 441: 537-541, 2006.
207. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431: 350-355, 2004.
208. Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., and Kim, V. N. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425: 415-419, 2003.
209. Basyuk, E., Suavet, F., Doglio, A., Bordonne, R., and Bertrand, E. Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res*, 31: 6593-6597, 2003.
210. Lee, N. S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M. J., Ehsani, A., Salvaterra, P., and Rossi, J. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol*, 20: 500-505, 2002.
211. Novina, C. D., Murray, M. F., Dykxhoorn, D. M., Beresford, P. J., Riess, J., Lee, S. K., Collman, R. G., Lieberman, J., Shankar, P., and Sharp, P. A. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med*, 8: 681-686, 2002.
212. Ueda, R. Rnai: a new technology in the post-genomic sequencing era. *J Neurogenet*, 15: 193-204, 2001.
213. Wu, W., Hodges, E., and Hoog, C. Thorough validation of siRNA-induced cell death phenotypes defines new anti-apoptotic protein. *Nucleic Acids Res*, 34: e13, 2006.
214. Hanazawa, M., Mochii, M., Ueno, N., Kohara, Y., and Iino, Y. Use of cDNA subtraction and RNA interference screens in combination reveals genes required for germ-line development in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 8686-8691, 2001.
215. Bartz, S. and Jackson, A. L. How will RNAi facilitate drug development? *Sci STKE*, 2005: pe39, 2005.
216. Sachse, C., Krausz, E., Kronke, A., Hannus, M., Walsh, A., Grabner, A., Ovcharenko, D., Dorris, D., Trudel, C., Sonnichsen, B., and Echeverri, C. J. High-throughput RNA interference strategies for target discovery and validation by using synthetic short interfering RNAs: functional genomics investigations of biological pathways. *Methods Enzymol*, 392: 242-277, 2005.

217. Aza-Blanc, P., Cooper, C. L., Wagner, K., Batalov, S., Deveraux, Q. L., and Cooke, M. P. Identification of modulators of TRAIL-induced apoptosis via RNAi-based phenotypic screening. *Mol Cell*, 12: 627-637, 2003.
218. Kittler, R., Putz, G., Pelletier, L., Poser, I., Heninger, A. K., Drechsel, D., Fischer, S., Konstantinova, I., Habermann, B., Grabner, H., Yaspo, M. L., Himmelbauer, H., Korn, B., Neugebauer, K., Pisabarro, M. T., and Buchholz, F. An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature*, 432: 1036-1040, 2004.
219. MacKeigan, J. P., Murphy, L. O., and Blenis, J. Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat Cell Biol*, 7: 591-600, 2005.
220. Zhao, H. F., L'Abbe, D., Jolicoeur, N., Wu, M., Li, Z., Yu, Z., and Shen, S. H. High-throughput screening of effective siRNAs from RNAi libraries delivered via bacterial invasion. *Nat Methods*, 2: 967-973, 2005.
221. Luo, Q., Kang, Q., Song, W. X., Luu, H. H., Luo, X., An, N., Luo, J., Deng, Z. L., Jiang, W., Yin, H., Chen, J., Sharff, K. A., Tang, N., Bennett, E., Haydon, R. C., and He, T. C. Selection and validation of optimal siRNA target sites for RNAi-mediated gene silencing. *Gene*, 395: 160-169, 2007.
222. Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell*, 2: 243-247, 2002.
223. Yin, J. Q., Gao, J., Shao, R., Tian, W. N., Wang, J., and Wan, Y. siRNA agents inhibit oncogene expression and attenuate human tumor cell growth. *J Exp Ther Oncol*, 3: 194-204, 2003.
224. Fleming, J. B., Shen, G. L., Holloway, S. E., Davis, M., and Brekken, R. A. Molecular consequences of silencing mutant K-ras in pancreatic cancer cells: justification for K-ras-directed therapy. *Mol Cancer Res*, 3: 413-423, 2005.
225. Grzmil, M., Thelen, P., Hemmerlein, B., Schweyer, S., Voigt, S., Mury, D., and Burfeind, P. Bax inhibitor-1 is overexpressed in prostate cancer and its specific down-regulation by RNA interference leads to cell death in human prostate carcinoma cells. *Am J Pathol*, 163: 543-552, 2003.
226. Butz, K., Ristriani, T., Hengstermann, A., Denk, C., Scheffner, M., and Hoppe-Seyler, F. siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. *Oncogene*, 22: 5938-5945, 2003.
227. Putral, L. N., Bywater, M. J., Gu, W., Saunders, N. A., Gabrielli, B. G., Leggatt, G. R., and McMillan, N. A. RNA interference against human papillomavirus oncogenes in cervical cancer cells results in increased sensitivity to cisplatin. *Mol Pharmacol*, 68: 1311-1319, 2005.
228. McCaffrey, A. P., Meuse, L., Pham, T. T., Conklin, D. S., Hannon, G. J., and Kay, M. A. RNA interference in adult mice. *Nature*, 418: 38-39, 2002.
229. Michel, U., Malik, I., Ebert, S., Bahr, M., and Kugler, S. Long-term in vivo and in vitro AAV-2-mediated RNA interference in rat retinal ganglion cells and cultured primary neurons. *Biochem Biophys Res Commun*, 326: 307-312, 2005.
230. Zimmermann, T. S., Lee, A. C., Akinc, A., Bramlage, B., Bumcrot, D., Fedoruk, M. N., Harborth, J., Heyes, J. A., Jeffs, L. B., John, M., Judge, A. D., Lam, K., McClintock, K., Nechev, L. V., Palmer, L. R., Racie, T., Rohl, I., Seiffert, S., Shanmugam, S., Sood, V., Soutschek, J., Toudjarska, I., Wheat, A. J., Yaworski, E., Zedalis, W., Koteliansky, V., Manoharan, M., Vornlocher, H. P., and MacLachlan, I. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*, 441: 111-114, 2006.
231. Landen, C. N., Jr., Chavez-Reyes, A., Bucana, C., Schmandt, R., Deavers, M. T., Lopez-Berestein, G., and Sood, A. K. Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery. *Cancer Res*, 65: 6910-6918, 2005.
232. McFarland, T. J., Zhang, Y., Appukuttan, B., and Stout, J. T. Gene therapy for proliferative ocular diseases. *Expert Opin Biol Ther*, 4: 1053-1058, 2004.
233. Check, E. A crucial test. *Nat Med*, 11: 243-244, 2005.
234. Kim, D. H. and Rossi, J. J. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet*, 8: 173-184, 2007.
235. Sledz, C. A., Holko, M., de Veer, M. J., Silverman, R. H., and Williams, B. R. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol*, 5: 834-839, 2003.
236. Bridge, A. J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A. L., and Iggo, R. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet*, 34: 263-264, 2003.
237. Mathupala, S. P., Guthikonda, M., and Sloan, A. E. RNAi based approaches to the treatment of malignant glioma. *Technol Cancer Res Treat*, 5: 261-269, 2006.

238. Pardridge, W. M. Intravenous, non-viral RNAi gene therapy of brain cancer. *Expert Opin Biol Ther*, 4: 1103-1113, 2004.
239. Schiffelers, R. M., Ansari, A., Xu, J., Zhou, Q., Tang, Q., Storm, G., Molema, G., Lu, P. Y., Scaria, P. V., and Woodle, M. C. Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic Acids Res*, 32: e149, 2004.
240. Urban-Klein, B., Werth, S., Abuharbeid, S., Czubayko, F., and Aigner, A. RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. *Gene Ther*, 12: 461-466, 2005.
241. Honma, K., Takeshita, F., and Ochiya, T. [Application of atelocollagen-mediated siRNA delivery for RNAi therapies]. *Yakugaku Zasshi*, 127: 807-812, 2007.
242. Takei, Y., Kadomatsu, K., Yuzawa, Y., Matsuo, S., and Muramatsu, T. A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics. *Cancer Res*, 64: 3365-3370, 2004.
243. Medarova, Z., Pham, W., Farrar, C., Petkova, V., and Moore, A. In vivo imaging of siRNA delivery and silencing in tumors. *Nat Med*, 13: 372-377, 2007.
244. Aigner, A. Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: strategies based on the direct application of siRNAs. *J Biotechnol*, 124: 12-25, 2006.
245. Lakka, S. S., Gondi, C. S., Yanamandra, N., Olivero, W. C., Dinh, D. H., Gujrati, M., and Rao, J. S. Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis. *Oncogene*, 23: 4681-4689, 2004.
246. Gondi, C. S., Lakka, S. S., Dinh, D. H., Olivero, W. C., Gujrati, M., and Rao, J. S. RNAi-mediated inhibition of cathepsin B and uPAR leads to decreased cell invasion, angiogenesis and tumor growth in gliomas. *Oncogene*, 23: 8486-8496, 2004.
247. Ren, W., Duan, Y., Yang, Y., Ji, Y., and Chen, F. Down-regulation of Stat3 induces apoptosis of human glioma cell: a potential method to treat brain cancer. *Neurol Res*, 2007.
248. Li, L., Lin, X., Shoemaker, A. R., Albert, D. H., Fesik, S. W., and Shen, Y. Hypoxia-inducible factor-1 inhibition in combination with temozolomide treatment exhibits robust antitumor efficacy in vivo. *Clin Cancer Res*, 12: 4747-4754, 2006.
249. Zhang, Y., Zhang, Y. F., Bryant, J., Charles, A., Boado, R. J., and Pardridge, W. M. Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin Cancer Res*, 10: 3667-3677, 2004.
250. Kang, C. S., Zhang, Z. Y., Jia, Z. F., Wang, G. X., Qiu, M. Z., Zhou, H. X., Yu, S. Z., Chang, J., Jiang, H., and Pu, P. Y. Suppression of EGFR expression by antisense or small interference RNA inhibits U251 glioma cell growth in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther*, 13: 530-538, 2006.
251. Lesniak, M. S. Novel advances in drug delivery to brain cancer. *Technol Cancer Res Treat*, 4: 417-428, 2005.
252. Giussani, C., Carrabba, G., Pluderer, M., Lucini, V., Pannacci, M., Caronzolo, D., Costa, F., Minotti, M., Tomei, G., Villani, R., Carroll, R. S., Bikfalvi, A., and Bello, L. Local intracerebral delivery of endogenous inhibitors by osmotic minipumps effectively suppresses glioma growth in vivo. *Cancer Res*, 63: 2499-2505, 2003.
253. Tan, P. H., Yang, L. C., Shih, H. C., Lan, K. C., and Cheng, J. T. Gene knockdown with intrathecal siRNA of NMDA receptor NR2B subunit reduces formalin-induced nociception in the rat. *Gene Ther*, 12: 59-66, 2005.
254. Luo, M. C., Zhang, D. Q., Ma, S. W., Huang, Y. Y., Shuster, S. J., Porreca, F., and Lai, J. An efficient intrathecal delivery of small interfering RNA to the spinal cord and peripheral neurons. *Mol Pain*, 1: 29, 2005.
255. Brooks, D. J., Beaney, R. P., Lammertsma, A. A., Leenders, K. L., Horlock, P. L., Kensett, M. J., Marshall, J., Thomas, D. G., and Jones, T. Quantitative measurement of blood-brain barrier permeability using rubidium-82 and positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab*, 4: 535-545, 1984.
256. Champelovier, P., Pautre, V., Elatifi, M., Dupre, I., Rostaing, B., Michoud, A., Berger, F., and Seigneurin, D. Resistance to phorbol ester-induced differentiation in human myeloid leukemia cells: a hypothetical role for the mRNA stabilization process. *Leuk Res*, 30: 1407-1416, 2006.
257. Zhou, X. D., Liu, L. Z., Qian, G. S., Huang, G. J., and Chen, J. [Cloning and sequence analysis of a new, full-length cDNA fragment of drug resistance-related gene in human lung adenocarcinoma]. *Ai Zheng*, 21: 341-345, 2002.
258. O'Connor, M. J., Martin, N. M., and Smith, G. C. Targeted cancer therapies based on the inhibition of DNA strand break repair. *Oncogene*, 26: 7816-7824, 2007.

259. Landesman-Bollag, E., Song, D. H., Romieu-Mourez, R., Sussman, D. J., Cardiff, R. D., Sonenshein, G. E., and Seldin, D. C. Protein kinase CK2: signaling and tumorigenesis in the mammary gland. *Mol Cell Biochem*, 227: 153-165, 2001.
260. Ahmed, K., Gerber, D. A., and Cochet, C. Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. *Trends Cell Biol*, Vol. 12, pp. 226-230, 2002.
261. Seldin, D. C. and Leder, P. Casein kinase II alpha transgene-induced murine lymphoma: relation to theileriosis in cattle. *Science*, 267: 894-897, 1995.
262. Leuraud, P., Taillandier, L., Medioni, J., Aguirre-Cruz, L., Criniere, E., Marie, Y., Kujas, M., Golmard, J. L., Duprez, A., Delattre, J. Y., Sanson, M., and Poupon, M. F. Distinct responses of xenografted gliomas to different alkylating agents are related to histology and genetic alterations. *Cancer Res*, 64: 4648-4653, 2004.
263. Braasch, D. A., Paroo, Z., Constantinescu, A., Ren, G., Oz, O. K., Mason, R. P., and Corey, D. R. Biodistribution of phosphodiester and phosphorothioate siRNA. *Bioorg Med Chem Lett*, 14: 1139-1143, 2004.
264. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., and Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414: 105-111, 2001.
265. Hemmati, H. D., Nakano, I., Lazareff, J. A., Masterman-Smith, M., Geschwind, D. H., Bronner-Fraser, M., and Kornblum, H. I. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 15178-15183, 2003.
266. Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P. B. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 63: 5821-5828, 2003.
267. Singh, S. K., Clarke, I. D., Hide, T., and Dirks, P. B. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene*, 23: 7267-7273, 2004.
268. Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F., and Vescovi, A. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*, 64: 7011-7021, 2004.
269. Ohgaki, H., Kita, D., Favereaux, A., Huang, H., Homma, T., Dessen, P., Weiss, W. A., Kleihues, P., and Heppner, F. L. Brain tumors in S100beta-v-erbB transgenic rats. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65: 1111-1117, 2006.
270. Yagi, T. DNA repair ability of cultured cells derived from mouse embryos in comparison with human cells. *Mutat Res*, 96: 89-98, 1982.
271. Lee, K. B., Parker, R. J., Bohr, V., Cornelison, T., and Reed, E. Cisplatin sensitivity/resistance in UV repair-deficient Chinese hamster ovary cells of complementation groups 1 and 3. *Carcinogenesis*, 14: 2177-2180, 1993.
272. Melton, D. W., Ketchen, A. M., Nunez, F., Bonatti-Abbondandolo, S., Abbondandolo, A., Squires, S., and Johnson, R. T. Cells from ERCC1-deficient mice show increased genome instability and a reduced frequency of S-phase-dependent illegitimate chromosome exchange but a normal frequency of homologous recombination. *J Cell Sci*, 111 (Pt 3): 395-404, 1998.
273. Chen, H., Shao, C., Shi, H., Mu, Y., Sai, K., and Chen, Z. Single nucleotide polymorphisms and expression of ERCC1 and ERCC2 vis-a-vis chemotherapy drug cytotoxicity in human glioma. *J Neurooncol*, 82: 257-262, 2007.
274. Olausson, K. A., Dunant, A., Fouret, P., Brambilla, E., Andre, F., Haddad, V., Taranchon, E., Filipits, M., Pirker, R., Popper, H. H., Stahel, R., Sabatier, L., Pignon, J. P., Tursz, T., Le Chevalier, T., and Soria, J. C. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med*, 355: 983-991, 2006.
275. McHugh, P. J., Spanswick, V. J., and Hartley, J. A. Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance. *Lancet Oncol*, 2: 483-490, 2001.
276. Vogel, U., Dybdahl, M., Frentz, G., and Nexø, B. A. DNA repair capacity: inconsistency between effect of over-expression of five NER genes and the correlation to mRNA levels in primary lymphocytes. *Mutat Res*, 461: 197-210, 2000.
277. Aloyz, R., Xu, Z. Y., Bello, V., Bergeron, J., Han, F. Y., Yan, Y., Malapetsa, A., Alaoui-Jamali, M. A., Duncan, A. M., and Panasci, L. Regulation of cisplatin resistance and homologous recombinational repair by the TFIIH subunit XPD. *Cancer Res*, 62: 5457-5462, 2002.
278. Benhamou, S. and Sarasin, A. ERCC2 /XPD gene polymorphisms and lung cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol*, 161: 1-14, 2005.
279. Murayama, N., Sai, K., Nakajima, Y., Kaniwa, N., Ozawa, S., Ohno, Y., and Sawada, J. Expression of CYP2A6 in tumor cells augments cellular sensitivity to tegafur. *Jpn J Cancer Res*, 92: 524-528, 2001.

280. Hidestrand, M., Oscarson, M., Salonen, J. S., Nyman, L., Pelkonen, O., Turpeinen, M., and Ingelman-Sundberg, M. CYP2B6 and CYP2C19 as the major enzymes responsible for the metabolism of selegiline, a drug used in the treatment of Parkinson's disease, as revealed from experiments with recombinant enzymes. *Drug Metab Dispos*, 29: 1480-1484, 2001.
281. Isoherranen, N., Levy, R. H., Yagen, B., Woodhead, J. H., White, H. S., and Bialer, M. Metabolism of a new antiepileptic drug, N-methyl-tetramethylcyclopropanecarboxamide, and anticonvulsant activity of its metabolites. *Epilepsy Res*, 58: 1-12, 2004.
282. Matsuoka, S., Huang, M., and Elledge, S. J. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science*, 282: 1893-1897, 1998.
283. Kastan, M. B., Zhan, Q., el-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B., and Fornace, A. J., Jr. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, 71: 587-597, 1992.
284. Elledge, S. J. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science*, 274: 1664-1672, 1996.
285. Xu, Y., Ashley, T., Brainerd, E. E., Bronson, R. T., Meyn, M. S., and Baltimore, D. Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes Dev*, 10: 2411-2422, 1996.
286. Morgan, S. E. and Kastan, M. B. p53 and ATM: cell cycle, cell death, and cancer. *Adv Cancer Res*, 71: 1-25, 1997.
287. Masuda, H., Tanaka, T., and Takahama, U. Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. *Biochem Biophys Res Commun*, 203: 1175-1180, 1994.
288. Tonetti, M., Giovine, M., Gasparini, A., Benatti, U., and De Flora, A. Enhanced formation of reactive species from cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)-platinum(II) (carboplatin) in the presence of oxygen free radicals. *Biochem Pharmacol*, 46: 1377-1383, 1993.
289. Zhang, H., Mizumachi, T., Carcel-Trullols, J., Li, L., Naito, A., Spencer, H. J., Spring, P. M., Smoller, B. R., Watson, A. J., Margison, G. P., Higuchi, M., and Fan, C. Y. Targeting human 8-oxoguanine DNA glycosylase (hOGG1) to mitochondria enhances cisplatin cytotoxicity in hepatoma cells. *Carcinogenesis*, 28: 1629-1637, 2007.
290. Plosky, B., Samson, L., Engelward, B. P., Gold, B., Schlaen, B., Millas, T., Magnotti, M., Schor, J., and Scicchitano, D. A. Base excision repair and nucleotide excision repair contribute to the removal of N-methylpurines from active genes. *DNA Repair (Amst)*, 1: 683-696, 2002.
291. Drablos, F., Feyzi, E., Aas, P. A., Vaagbo, C. B., Kavli, B., Bratlie, M. S., Pena-Diaz, J., Otterlei, M., Slupphaug, G., and Krokan, H. E. Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)*, 3: 1389-1407, 2004.
292. Bosken, C. H., Wei, Q., Amos, C. I., and Spitz, M. R. An analysis of DNA repair as a determinant of survival in patients with non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 94: 1091-1099, 2002.
293. Bellmunt, J., Paz-Ares, L., Cuello, M., Cecere, F., Albiol, S., Guillem, V., Gallardo, E., Carles, J., Mendez, P., de la Cruz, J., Taron, M., Rosell, R., and Baselga, J. Gene expression of ERCC1 as a novel prognostic marker in advanced bladder cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Ann Oncol*, 18: 522-528, 2007.
294. McNeill, D. R. and Wilson, D. M., 3rd A dominant-negative form of the major human abasic endonuclease enhances cellular sensitivity to laboratory and clinical DNA-damaging agents. *Mol Cancer Res*, 5: 61-70, 2007.
295. Garcia-Campelo, R., Alonso-Curbera, G., Anton Aparicio, L. M., and Rosell, R. Pharmacogenomics in lung cancer: an analysis of DNA repair gene expression in patients treated with platinum-based chemotherapy. *Expert Opin Pharmacother*, 6: 2015-2026, 2005.
296. Wu, X., Fan, W., Xu, S., and Zhou, Y. Sensitization to the cytotoxicity of cisplatin by transfection with nucleotide excision repair gene xeroderma pigmentosum group A antisense RNA in human lung adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res*, 9: 5874-5879, 2003.
297. Hegi, M. E., Diserens, A. C., Gorlia, T., Hamou, M. F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E., Hau, P., Mirimanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C., and Stupp, R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*, 352: 997-1003, 2005.
298. Perry, J. R., Louis, D. N., and Cairncross, J. G. Current treatment of oligodendrogliomas. *Arch Neurol*, 56: 434-436, 1999.
299. Harris, A. L. DNA repair: relationship to drug and radiation resistance, metastasis and growth factors. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 48: 675-690, 1985.

300. Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P., and Kaina, B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, 193: 3-34, 2003.
301. Parker, R. J., Poirier, M. C., Bostick-Bruton, F., Vionnet, J., Bohr, V. A., and Reed, E. Peripheral blood leukocytes as a surrogate marker for cisplatin drug resistance: studies of adduct levels and the repair gene ERCC1. *Basic Life Sci*, 53: 251-261, 1990.
302. Ashmore, S. M., Thomas, D. G., and Darling, J. L. Does P-glycoprotein play a role in clinical resistance of malignant astrocytoma? *Anticancer Drugs*, 10: 861-872, 1999.
303. Demeule, M., Shedid, D., Beaulieu, E., Del Maestro, R. F., Moghrabi, A., Ghosn, P. B., Moumdjian, R., Berthelet, F., and Beliveau, R. Expression of multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) in human brain tumors. *Int J Cancer*, 93: 62-66, 2001.
304. Bahr, O., Rieger, J., Duffner, F., Meyermann, R., Weller, M., and Wick, W. P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein mediate specific patterns of multidrug resistance in malignant glioma cell lines, but not in primary glioma cells. *Brain Pathol*, 13: 482-494, 2003.
305. Saino, M., Maruyama, T., Sekiya, T., Kayama, T., and Murakami, Y. Inhibition of angiogenesis in human glioma cell lines by antisense RNA from the soluble guanylate cyclase genes, GUCY1A3 and GUCY1B3. *Oncol Rep*, 12: 47-52, 2004.
306. Chen, H., Shao, C., Shi, H., Mu, Y., Sai, K., and Chen, Z. Single nucleotide polymorphisms and expression of ERCC1 and ERCC2 vis-a-vis chemotherapy drug cytotoxicity in human glioma. *J Neurooncol*, 2006.
307. Cummings, M., Higginbottom, K., McGurk, C. J., Wong, O. G., Koberle, B., Oliver, R. T., and Masters, J. R. XPA versus ERCC1 as chemosensitising agents to cisplatin and mitomycin C in prostate cancer cells: role of ERCC1 in homologous recombination repair. *Biochem Pharmacol*, 72: 166-175, 2006.

ABBREVIATIONS

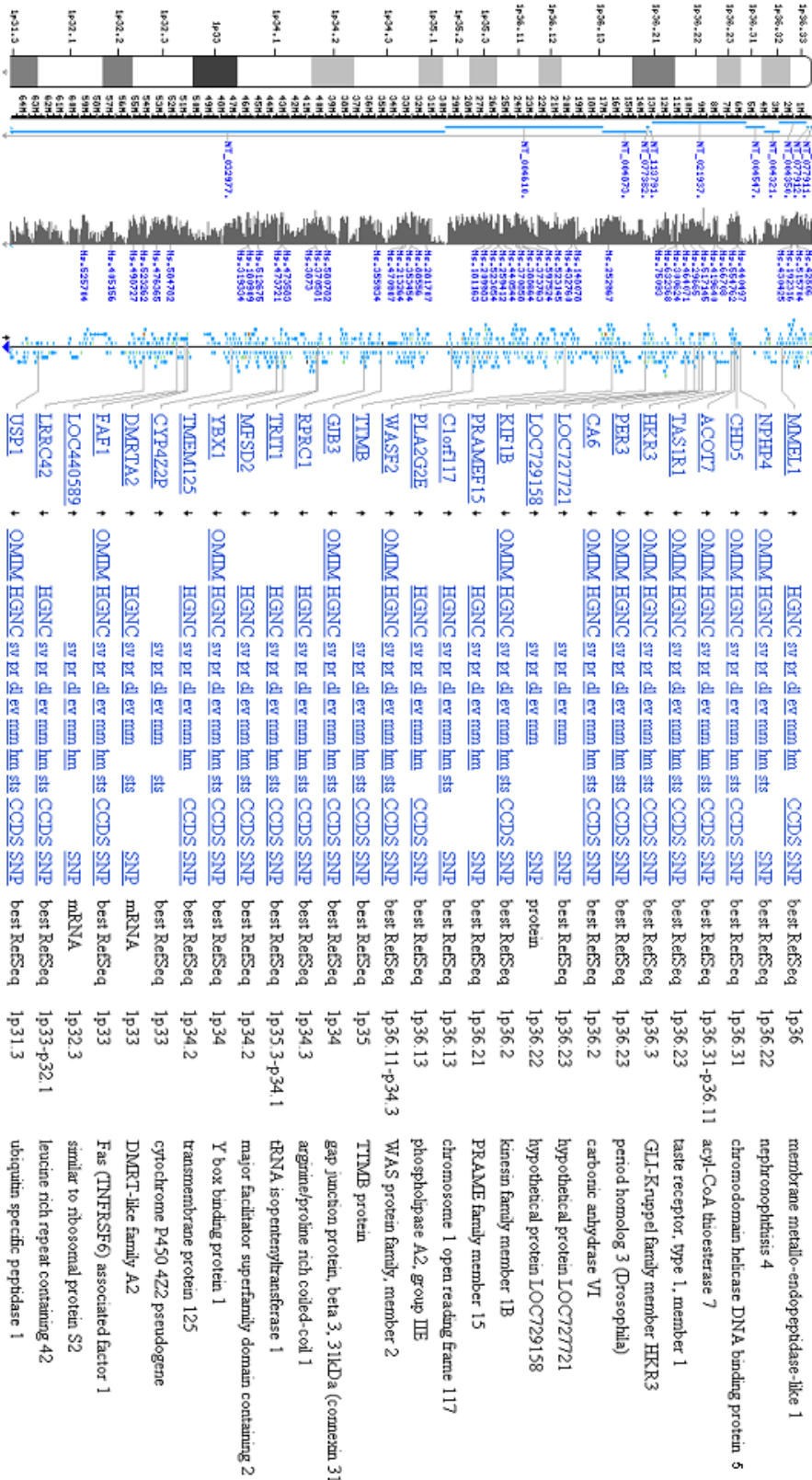
5-FU	Fluorouracil
AAG	alkyladenine DNA glycosylase
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AMD	Age-related Macula Degeneration
APE	Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenosine 5'-Triphosphate
BER	Base Excision Repair
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BiCNU	Carmustine
CCNU	Lomustine
CDB	Cassures Double Brin
CDDP	cis-diamminedichloroplatinum
CDK4	cyclin-dependent kinase 4
CDKN2	Cyclin-Dependant Kinase Inhibitor 2
CGH	Comparative Genomic Hybridation
CI	Indice de chimio-sensibilité
CIT	Carte d'Identité des Tumeurs
CK2 β	Casein Kinase 2 beta
CO2	DiOxyde de Carbone
CP	Crossing points
CS	Cockaine Syndrome
CYP	Cytochrome P
DHFR	DiHydroFolate Reductase
Dil	1,1'-dioctadécyl-3,3,3',3'-tétraméthylindocarbocyanine perchlorate
DL50	Dose Létale 50
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	DiMethyl SulfOxide
DNA-PKcs	DNA dependent protein kinase catalytic subunit
dNTP	désoxyriboNucléotide TriPhosphate
DO	Densité Optique
DS	Sensibilisation à la Drogue
dsRNA	Double-stranded RiboNucleic Acid
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Récepteur à l'Epidermal Growth Factor
EORTC	Organisation européenne de recherche et traitement du cancer
ERCC1	Excision Repair Cross Complementing 1 (protéine)
Ercc1	Excision Repair Cross Complementing 1 (gène)
ERCC2	Excision Repair Cross Complementing 2 (protéine)
Ercc2	Excision Repair Cross Complementing 2 (gène)
GFP	Green Fluorescent Protein
GGR	Global Genome Repair
GLI	Glioma-associated oncogene homolog
Gy	Gray
hAAT	human Alpha-1 antitrypsin
HIV	Human immunodeficiency virus
HR	Recombinaison Homologue
IC ₅₀	Inhibition Concentration 50%
IGF-R	Insulinlike Growth Factor Receptor
INSERM	Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
kDa	Kilo Dalton
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien

LDL	Low Density Lipoprotein
LIG1	Ligase 1
LIG3	Ligase 3
LNCC	Ligue Nationale Contre le Cancer
LOH	Loss of heterozygosity
MBD4	MED1 ou methyl-CpG binding endonuclease 1
MDM2	Mouse Double Minute 2 homolog
MGC13170	Multidrug resistance-related protein
MgCl ₂	Chlorure de Magnesium
MGMT	O ⁶ -méthylguanine-DNA méthyltransferase
miRNA	micro RiboNucleic Acid
miRNP	miRNA protein complex
MLH	Micronuclear Linker Histone
MMR	Mismatch Repair
MPG	Methylpurine-DNA glycosylase
mRNA	messenger Ribo Nucleic Acid
MSH	MutS Homolog
MTIC	5-(3-méthyltriazène-1-yl)-imidazole-4-carboxamide
MTT	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
MutYh	MutY Homologue
NaCl	Chlorure de Sodium
NCIC	Institut national du cancer au Canada
NER	Nucleotide Excision Repair
NHEJ	Non Homologous End Joining
NTH1	endonuclease III homologue
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
pb	Paires de bases
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCV	Procarbazine, CCNU (lomustine) et Vincristine
PDGFRA	Platelet-Derived Growth Factor Receptor, Alpha polypeptide
PEI	PolyEthyenimine
PKR	Double-stranded RNA-dependent protein kinase
PMS2L	PostMeiotic Segregation increased 2-Like
PNKP	PolyNucleotide Kinase 3'-Phosphatase
POLD1	Polymerase (DNA directed), delta 1
Pri-miRNA	miRNA primaires
Pré-miRNA	Précurseur de miRNA
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
qRT-PCR	Quantitative Real Time PCR
qsp	Quantité suffisante pour
R2 D2	2 dsRNA-binding domains (R2) associated with DCR-2 (D2)
RAD54L	RAD54-like
REV7	Subunit of DNA polymerase zeta
RFC	Replication factor C
RISC	RNA-induced Silencing Complex
RNA	RiboNucleic Acid
ROS	Reactive oxygen species
RPA	Replication Protein A
RSV	Rous Sarcoma Virus
RT	Reverse Transcription
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
RUVBL2	RuvB-like 2
shRNA	Short hairpin RiboNucleic Acid
siRNA	small interfering RiboNucleic Acid
SMUG1	Single-strand selective Monofunctional Uracil DNA Glycosylase 1

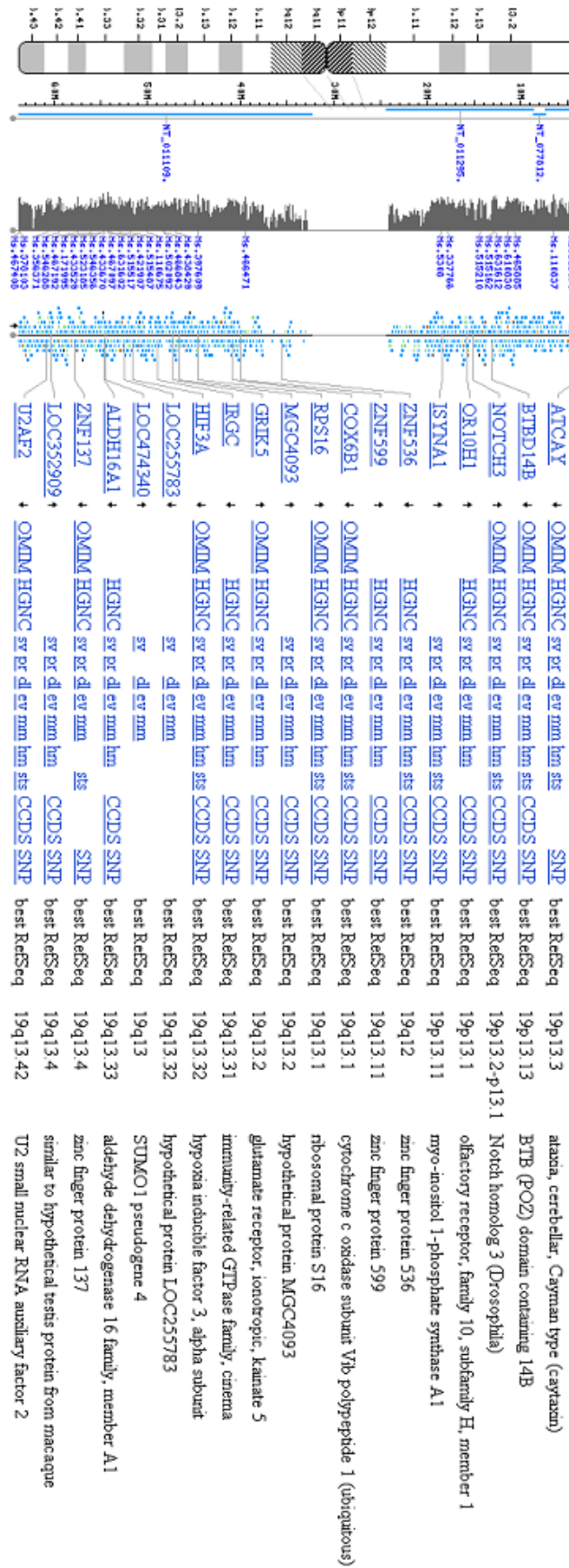
SNC	Système Nerveux Central
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
SSBR	Single Strand Break Repair
TCR	Transcription-Coupled Repair
TDG	Thymine DNA Glycosylase
TEMP	Tomographie par Émission Mono-Photonique
TEP	Tomographie par Émission de Positons
TFIIH	Transcription Factor II Humain
TMZ	Témozolomide
TP53	Tumor Protein 53
TTD	Trichothiodystrophie
UNG	Uracil-DNA N-glycosylase
USA	United States of America
UV	Ultra-Violet
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
WHO	World Health Organization
XP	Xeroderma Pigmentosum
XRCC1	X-ray Repair Cross Complementing 1

ANNEXES

I. ANNEXE I : CYTOGENETIQUE DE LA ZONE 1P36- 1P32



II. ANNEXE II CYTOGENETIQUE DE LA ZONE 19Q13.2-Q13.4



III. ANNEXE III : GENES IMPLIQUES DANS LA REPARATION DE L'ADN

d'après Wood, Human DNA repair 2001 (138) (dernières modifications avril 2007)

Gene Name (synonyms)	Activity	Chromosome location	Accession number
Base excision repair (BER)			
UNG	U	12q24.11	NM_080911
SMUG1	U	12q13.13	NM_014311
MBD4	U or T opposite G at CpG sequences	3q21.3	NM_003925
TDG	U, T or ethenoC opposite G	12q23.3	NM_003211
OGG1	8-oxoG opposite C	3p25.3	NM_016821
MUTYH (MYH)	A opposite 8-oxoG	1p34.1	NM_012222
NTHL1 (NTH1)	Ring-saturated or fragmented pyrimidines	16p13.3	NM_002528
MPG	3-meA, ethenoA, hypoxanthine	16p13.3	NM_002434
NEIL1	Removes thymine glycol	15q24.2	NM_024608
NEIL2	Removes oxidative products of pyrimidines	8p23.1	NM_145043
Other BER factors			
APEX1	AP endonuclease	14q11.2	NM_001641
APEX2	AP endonuclease	Xp11.21	NM_014481
LIG3	DNA Ligase	17q12	NM_013975
XRCC1	Ligase accessory factor	19q13.31	NM_006297
PNKP	Converts some DNA breaks to ligatable ends	19q13.33	NM_007254
Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) enzymes			
PARP1 (ADPRT)	Protects strand interruptions	1q42.12	NM_001618
PARP2 (ADPRTL2)	PARP-like enzyme	14q11.2	NM_005484
Direct reversal of damage			
MGMT	O ⁶ -meG alkyltransferase	10q26.3	NM_002412
MGC90512 (ABH2)	1-meA dioxygenase	12q24.11	NM_001001655
DEPC-1 (ABH3)	1-meA dioxygenase	11p11.2	NM_139178
Repair of DNA-protein crosslinks			
TDP1	Removes covalently bound TOP1-DNA complexes	14q32.11	NM_018319
Mismatch excision repair (MMR)			
MSH2	Mismatch and loop recognition	2p21	NM_000251
MSH3		5q14.1	NM_002439
MSH6	MSH2, MSH3, MSH6	2p16.3	NM_000179
MSH4	MutS homologs specialized for meiosis	1p31.1	NM_002440
MSH5	MSH4, MSH5	6p21.33	NM_002441
PMS1	MutL homolog	2q32.2	NM_000534
MLH1	MutL homologs, forming heterodimer	3p22.3	NM_000249
PMS2	MLH1, PMS2	7p22.1	NM_000535
MLH3	MutL homologs of unknown function	14q24.3	NM_014381
PMS2L3		7q11.23	D38437
PMS2L4 (PMS6)	MLH3, PMS2L3, PMS2L4	7q11.21	D38500
Nucleotide excision repair (NER)			
XPC	Binds damaged DNA as complex	3p25.1	NM_004628
RAD23B (HR23B)		9q31.2	NM_002874
CETN2	XPC, RAD23B, CETN2	Xq28	NM_004344
RAD23A (HR23A)	Substitutes for HR23B	19p13.13	NM_005053
XPA	Binds damaged DNA in preincision complex	9q22.33	NM_000380
RPA1	Binds DNA in preincision complex	17p13.3	NM_002945
RPA2		1p35.3	NM_002946
RPA3	RPA1, RPA2, RPA3	7p21.3	NM_002947
		TFIIH	Catalyzes unwinding in preincision complex
ERCC3 (XPB)	3' to 5' DNA helicase	2q14.3	NM_000122
ERCC2 (XPD)	5' to 3' DNA helicase	19q13.32	NM_000400
GTF2H1	Core TFIIH subunit p62	11p15.1	NM_005316
GTF2H2	Core TFIIH subunit p44	5q13.2	NM_001515
GTF2H3	Core TFIIH subunit p34	12q24.31	NM_001516
GTF2H4	Core TFIIH subunit p52	6p21.33	NM_001517
GTF2H5 (TTDA)	Core TFIIH subunit p8	6p25.3	NM_207118
CDK7	Kinase subunits of TFIIH	5q13.2	NM_001799
CCNH		5q14.3	NM_001239
MNAT1	CDK7, CCNH, MNAT1	14q23.1	NM_002431
ERCC5 (XPG)	3' incision	13q33.1	NM_000123
ERCC1	5' incision subunit	19q13.32	NM_001983
ERCC4 (XPF)	5' incision subunit	16p13.12	NM_005236
LIG1	DNA joining	19q13.32	NM_000234
NER-related			

CKN1 (CSA)	Cockayne syndrome; Needed for transcription-coupled NER	5q12.1	NM_000082
ERCC6 (CSB)		10q11.23	NM_000124
XAB2 (HCNP)	CKN1, ERCC6, XAB2	19p13.2	NM_020196
DDB1	Complex defective in XP group E	11q12.2	NM_001923
DDB2	DDB1, DDB2	11p11.2	NM_000107
MMS19L (MMS19)	Transcription and NER	10q24.1	NM_022362
Homologous recombination			
RAD51	Homologous pairing	15q15.1	NM_002875
RAD51L1 (RAD51B)	Rad51 homolog	14q24.1	NM_002877
RAD51C	Rad51 homolog	17q23.2	NM_002876
RAD51L3 (RAD51D)	Rad51 homolog	17q12	NM_002878
DMC1	Rad51 homolog, meiosis	22q13.1	NM_007068
XRCC2	DNA break and crosslink repair	7q36.1	NM_005431
XRCC3	XRCC2, XRCC3	14q32.33	NM_005432
RAD52	Accessory factors for recombination	12p13.33	NM_002879
RAD54L		1p34.1	NM_003579
RAD54B	RAD52, RAD54L, RAD54B	8q22.1	NM_012415
BRCA1	Accessory factor for transcription and recombination, E3 Ubiquitin ligase	17q21.31	NM_007295
BRCA2 (FANCD1)	Cooperation with RAD51, essential function	13q13.1	NM_000059
SHFM1 (DSS1)	BRCA2 associated	7q21.3	NM_006304
RAD50	ATPase in complex with MRE11A, NBS1	5q23.3	NM_005732
MRE11A	3' exonuclease	11q21	NM_005590
NBS1	Mutated in Nijmegen breakage syndrome	8q21.3	NM_002485
MUS81	A structure-specific DNA nuclease	11q13.1	NM_025128
EME1 (MMS4L)	MUS81, MMS4	17q21.33	NM_152463
EME2	Essential meiotic endonuclease 1 homolog 2	16p13.3	NM_001010865
Non-homologous end-joining			
G22P1 (Ku70)	DNA end binding	22q13.2	NM_001469
XRCC5 (Ku80)	Ku70, Ku80	2q35	NM_021141
PRKDC	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	8q11.21	NM_006904
LIG4	Ligase	13q33.3	NM_002312
XRCC4	Ligase accessory factor	5q14.2	NM_003401
DCLRE1C (Artemis)	Nuclease	10p13	NM_022487
XLF (NHEJ1)	XRCC4-LIG4 interacting factor	2q35	NM_024782
Modulation of nucleotide pools			
NUDT1 (MTH1)	8-oxoGTPase	7p22.3	NM_002452
DUT	dUTPase	15q21.1	NM_001948
RRM2B (p53R2)	p53-inducible ribonucleotide reductase small subunit 2 homolog	8q22.3	NM_015713
DNA polymerases (catalytic subunits)			
POLB	BER in nuclear DNA	8p11.21	NM_002690
POLG	BER in mitochondrial DNA	15q26.1	NM_002693
POLD1	NER and MMR	19q13.33	NM_002691
POLE	POLD1, POLE1	12q24.33	NM_006231
PCNA	Sliding clamp for pol delta and pol epsilon	20p12.3	NM_002592
REV3L (POLZ)	DNA pol zeta catalytic subunit, essential function	6q21	NM_002912
MAD2L2 (REV7)	DNA pol zeta subunit	1p36.22	NM_006341
REV1L (REV1)	dCMP transferase	2q11.2	NM_016316
POLH	XP variant	6p21.1	NM_006502
POLI (RAD30B)	Lesion bypass	18q21.2	NM_007195
POLQ	DNA crosslink repair	3q13.33	NM_006596
POLK (DINB1)	Lesion bypass	5q13.3	NM_016218
POLL	Gap-filling during non-homologous end-joining	10q24.32	NM_013274
POLM	Gap filling during non-homologous end-joining	7p13	NM_013284
POLN (POL4P)	DNA crosslink repair?	4p16.3	NM_181808
Editing and processing nucleases			
FEN1 (DNase IV)	5' nuclease	11q12.2	NM_004111
TREX1 (DNase III)	3' exonuclease	3p21.31	NM_033629
TREX2	3' exonuclease	Xq28	NM_007205
EXO1 (HEX1)	5' exonuclease	1q43	NM_003686
SPO11	endonuclease	20q13.32	NM_012444
FLJ35220 (ENDOV)	incision 3' of hypoxanthine and uracil	17q25.3	NM_173627
Rad6 pathway			
UBE2A (RAD6A)	Ubiquitin-conjugating enzyme	Xq24-q25	NM_003336
UBE2B (RAD6B)	Ubiquitin-conjugating enzyme	5q31.1	NM_003337
RAD18	E3 ubiquitin ligase	3p25.3	NM_020165
UBE2V2 (MMS2)	Ubiquitin-conjugating complex	8q11.21	NM_003350
UBE2N (UBC13)	UBE2V2, UBE2N	12q22	NM_003348
Chromatin Structure			
H2AFX (H2AX)	Histone, phosphorylated after DNA damage	11q23.3	NM_002105

CHAF1A (CAF1)	Chromatin assembly factor	19p13.3	NM_005483
Genes defective in diseases associated with sensitivity to DNA damaging agents			
BLM	Bloom syndrome helicase	15q26.1	NM_000057
WRN	Werner syndrome helicase / 3' - exonuclease	8p12	NM_000553
RECQL4	Rothmund-Thompson syndrome	8q24.3	NM_004260
ATM	ataxia telangiectasia	11q22.3	NM_000051
Fanconi anemia			
FANCA	Involved in tolerance or repair of DNA crosslinks	16q24.3	NM_000135
FANCB		Xp22.31	NM_152633
FANCC	FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL	9q22.32	NM_000136
FANCD2		3p25.3	NM_033084
FANCE		6p21.31	NM_021922
FANCF		11p14.3	NM_022725
FANCG (XRCC9)		9p13.3	NM_004629
FANCL		2p16.1	NM_018062
FANCI (BRIP1)	BRCA1-associated DNA helicase	17q23.2	NM_032043
FANCM	DNA helicase and possible nuclease in the XPF-Hef-Mus81 family	14q21.3	XM_048128
FANCN (PALB2)	PALB2 partner and localizer of BRCA2	16p12.1	NM_024675
FAAP24 (C19orf40)	Fanconi anemia-associated protein, 24 kDa	19q13.11	NM_152266
Other identified genes with a suspected DNA repair function			
DCLRE1A (SNM1)	DNA crosslink repair	10q25.3	NM_014881
DCLRE1B (SNM1B)	Related to SNM1	1p13.2	NM_022836
RPA4	Similar to RPA2	Xp21.33	NM_013347
APTX (aprataxin)	Processing of DNA single-strand interruptions	9p21.1	NM_175073
NEIL3	Resembles NEIL1 and NEIL2	4q34.3	NM_018248
RECQL (RECQ1)	DNA helicase	12p12.1	NM_002907
RECQL5	DNA helicase	17q25.1	NM_001003715
HEL308	DNA helicase	4q21.23	NM_133636
RAD52B (RDM1)	Similar to RAD52	17q12	NM_145654
Other conserved DNA damage response genes			
ATR	ATM- and PI-3K-like essential kinase	3q23	NM_001184
RAD1	PCNA-like DNA damage sensors	5p13.2	NM_002853
RAD9A		11q13.2	NM_004584
HUS1	RAD1, RAD9, HUS1	7p12.3	NM_004507
RAD17 (RAD24)	RFC-like DNA damage sensor	5q13.2	NM_002873
CHEK1	Effector kinases	11q24.2	NM_001274
CHEK2	CHEK1, CHEK2	22q12.1	NM_007194
TP53	Regulation of the cell cycle	17p13.1	NM_000546
ATRIP (TREX1)	ATR-interacting protein	3p21.31	NM_130384
TELO2 (hCLK2, KIAA0683)	TEL2, telomere maintenance 2, homolog	16p13.3	NM_016111

IV. ANNEXE IV : LISTE DES 50 GENES CANDIDATS

AD2	Alzheimer disease 2 (APOE*E4-associated, late onset)	Metabolism	19q13.2
AKT2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2	Cell signaling	19q13.1-q13.2
ASNA1	arsA arsenite transporter, ATP-binding, homolog 1	Metabolism	19q13.3
BAX	BCL2-associated X protein	Cell division	19q13.3-q13.4
CDC34	cell division cycle 34	Cell cycle	19p13.3
CDC37	CDC37 cell division cycle 37 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	Cell cycle	19p13.2
CDKN2C	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	Cell cycle	1p32
CYP2A6	cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide 6	Metabolism	19q13.2
CYP2B6	cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6	Metabolism	19q13.2
CYP2F1	cytochrome P450, family 2, subfamily F, polypeptide 1	Metabolism	19q13.2
CYP4B1	cytochrome P450, family 4, subfamily B, polypeptide 1	Metabolism	1p34-p12
ELA2	elastase 2, neutrophil	Gene expression	19p13.3
ERCC1	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1	5' incision subunit	19q13.2-q13.3
ERCC2 (XPD)	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2 (xeroderma pigmentosum D)	5' to 3' DNA helicase	19q13.3
FOSB	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	Gene expression	19q13.32
GADD45B	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	Homeostasis	19p13.3
GPX4	glutathione peroxidase 4 (phospholipid hydroperoxidase)	Metabolism	19p13.3
JUN	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	Gene expression	1p32-p31
JUNB	jun B proto-oncogene	Gene expression	19p13.2
JUND	jun D proto-oncogene	Gene expression	19p13.2
LIG1	ligase I, DNA, ATP-dependent	DNA repair : DNA joining	19q13.2-q13.3
MLP	MARCKS-like protein	Metabolism	1p34.3
MUTYH	mutY homolog (<i>E. coli</i>)	DNA repair	1p34.3-p32.1
MYH	mutY homolog (<i>E. coli</i>)	Base Excision Repair (BER)	1p34.3-p32.1
OAZ1	ornithine decarboxylase antizyme 1	Cell division	19p13.3
ORC1L	origin recognition complex, subunit 1-like (yeast)	Cell cycle	1p32
PLA2G2A	phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	Cell signaling	1p35
PLA2G4C	phospholipase A2, group IVC (cytosolic, calcium-independent)	Cell signaling	19q13.3
PNKP	polynucleotide kinase 3'-phosphatase	DNA repair : Converts some DNA breaks to ligatable ends	19q13.3-q13.4
POLD1	patched homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	DNA repair : NER and MMR	1p33-p34
PTCH2	patched homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	Cell signaling	1p33-p34
RAD23A	RAD23 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	DNA repair	19p13.2
RAD54L	RAD54-like (<i>S. cerevisiae</i>)	DNA repair : Accessory factors for recombination	1p32
REV7 (MAD2L2)	MAD2 mitotic arrest deficient-like 2 (yeast)	DNA pol zeta subunit	1p36
RPA2		DNA repair	1p35
SEI1	CDK4-binding protein p34SEI1	Cell cycle	19q13.1-q13.2
TAF12	TAF12 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 20kDa	Cell cycle	1p35.2
TGFBR3	transforming growth factor, beta receptor III (betaglycan, 300kDa)	Cell cycle	1p33-p32
TNFRSF4	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4	Cell signaling	1p36
TNFRSF8	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8	Cell signaling	1p36
TNFRSF9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	Cell signaling	1p36
UBA52	ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	Gene expression	19p13.1-p12
UHRF1	ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1	Gene expression	19p13.3
XAB2 (HCNP)	HCNP protein; XPA-binding protein 2	Needed for transcription-coupled NER	19p13.3
XRCC1	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1	Ligase accessory factor (BER)	19q13.2
AD2	Alzheimer disease 2 (APOE*E4-associated, late onset)	Metabolism	19q13.2

V. ANNEXE V : ARTICLE ICANCÉRODROPS

NanoBiotechnology
Copyright © 2005 Humana Press Inc.
All rights of any nature whatsoever are reserved.
ISSN 1551-1286/05/01:183-190/\$30.00
DOI: 10.1385/Nano:1:2:183

Original Article

A “DropChip” Cell Array for DNA and siRNA Transfection Combined with Drug Screening

Béatrice Schaack,¹ Julien Reboud,¹ Stéphanie Combe,¹ Brigitte Fouqué,¹ François Berger,³ Sandra Boccard,³ Odile Filhol-Cochet,² and François Chatelain¹

¹Laboratoire Biopuces, bat 4020, CEA, 17 rue des martyrs, F-38054 Grenoble Cedex 9, France; ²INSERM EMI 104, bat 4020, CEA, 17 rue des martyrs, F-38054 Grenoble Cedex 9, France; ³INSERM U318, University Hospital of Grenoble, F-38043 Grenoble, France

Abstract

We have developed a “DropChip” microarray for multiplexed cell-based assays to perform information-rich high-throughput screening. This microarray features cell culture nanoliter droplets on a glass slide; the culture’s size, shape, and location are accurately controlled by surface tension. We report parallel gene expression and gene silencing analyses on the same array, combining nucleic acid transfection, anti-cancer drug screening, and cell cultures. In particular, we analyzed the synergic effects of siRNA and cisplatin on cancerous cells. With up to 100 cells per drop, we could carry out the detection and analysis of cell behavior at the individual cell level, using high-resolution fluorescence microscopy and automated image analysis. Nucleic and chemical compounds require early multiplexed testing using nanomolar quantities. The NanoDrop technology is a unique solution to perform cell-based assay in nanoliter drops, providing a major decrease of cost and time, as well as a precise description of the behavior of several cell types in a single test at the single cell level. This novel cell array format could enable highly informative functional genomic studies and large scale *in vitro* toxicity testing.

(*Nanobiotechnology* DOI: 10.1385/Nano:1:2:183)

Key Words: RNAi; cell culture nanotechnology; expression array; high content analysis; multitransfection.

Introduction

High-content-screening (HCS) assays are cell-based assays that yield multiparametric functional information about the interaction of compounds with one or several cell components. These assays can be used at nearly all stages of drug development, from target discovery to lead-compound selection and optimization. Contrary to traditional biochemical assays, HCS provides additional information such as absorption, permeability, selectivity, specificity, metabolism, and toxicity. Temporal and spatial information about the cell and its components are usually acquired by automated cell-analysis systems. The major challenges when carrying out HCS lie in the acquisition, storage, and analysis of

huge amounts of data generated when recording the behavior of individual cells within large populations. In fact, with the emergence of single-cell analysis techniques, it has become increasingly clear that cells within a given isogenic population are heterogeneous. The resulting phenotypic variability can be attributed to the simultaneous action of different factors, such as the physiological state of the cells or their intracellular content. Many cellular components exist in nanomolar concentrations and, hence, their functions are inherently noisy or stochastic, which might lead to varying cellular states. Thus, it is possible to record different phenotypes, at any point of time, among cells with the exact same genetic profile. This makes the use of

Correspondence and reprint requests to:
Béatrice Schaack,
Laboratoire Biopuces,
bat 4020, CEA, 17 rue des
martyrs, F-38054 Grenoble
Cedex 9, France.
E-mail: beatrice.schaack@cea.fr



cell preparation techniques based on averaged populations arguable for functional genomic and proteomic analyses. To overcome this difficulty, HCS is the method designed to record the behavior of individual cells upon chemical stimulation, to provide a view of the biological impact using a statistical monitoring of the cells' response in the entire population.

Traditionally, cultures are performed in Petri dishes or microtiter plates with over 10,000 cells per well. This amount of cells is inadequate when all the cells must be fully phenotyped. To streamline the manipulation of microtiter plates and to reduce the number of cells per assay, we have developed an alternative method, the "DropChip," which the cells are cultured in nanoliter droplets on a glass substrate. This technology provides the first insight in "nano-cell biology," which less than 100 cells are investigated per assay, nano-amount of drugs can be tested, and single-cell phenotype can be analyzed after the contact with nucleic and chemical drugs. Once we have characterized the DropChip functional parameters, we have applied this novel format to reverse as well as direct multiple transfections. To show the potency of this method, we have applied it to overexpress fluorescent proteins and test the effect of a siRNA-based therapy combined with an anticancer chemical treatment in glioblastoma cell cultures. We showed that it provides a versatile alternative to the reverse-transfection method previously reported (1,2), and has three major advantages: (1) the shape and volume of the drops are controlled by the characteristics of the glass slide, (2) the liquid convection within each drop provides excellent conditions for cell-based screening, mixing cells and molecules in a homogeneous and continuous manner, and (3) the number of cells per drop can be adjusted for each experiment, which is more suitable for high-content automatic cell screening.

Methods

Amplification of Minimal DNA Sequences

The minimal DNA sequence containing the CMV promoter, the sequence of the various ⁵RGFPs fused with the signaling peptides, and the polyA of SV40 were amplified using standard PCR. Primers were identical for the different reactions. The PCR products were then collected by ethanol precipitation and quantified on the Agilent Bioanalyzer.

Direct and Reverse Transfection for Recombinant Expression

The 5- μ L "manual" reverse transfection was performed on each of the 2000- μ m spots of the 40 spots "Prolabo" slide (ref 74 890.01) using a micropipette. One half microliter of PCR cDNAs (5 ng) or plasmid DNA (15 ng) mixed with the transfection reagent (Lipofectamine, Invitrogen, 1:17 dilution in PBS) was dried on the slide and stored. Prior to transfection, 1 μ L of pure water was added to the DNA spot. Then 5 μ L of a suspension of HEK or HeLa U373 cells (0.2×10^6 cells/mL) in DMEM containing 10% SVF (Invitrogen) were added.

The 5- μ L "manual" direct transfection was performed for each of the 2000- μ m spots of the 40 spots "Prolabo" slide (ref 74 890.01) using a micropipette. Solutions were added successively: 5 μ L of a suspension of HeLa or HEK or U373 cells (0.2×10^6 cells/mL) in DMEM containing 10% SVF (Invitrogen) and 0.5 μ L of PCR cDNAs (5 ng) or plasmid (15 ng) in the transfection reagent (lipofectamine, Invitrogen, 1:17 dilution in PBS).

Direct Transfection for Gene Silencing Using the DropChip

siRNA were directly transfected in U373 cells cultivated and treated by CDDP on the 500- μ m spot of the 400 positions "DropChip" slide (custom made by Memscap SA.) using the Sciflexarrayer piezo-dispenser (Sciencion GmbH, droplets approx 500 pL each) (head of the nozzle visible in Fig. 1B). During the spotting, dehydration on the slides was prevented using a custom-made cooling module that maintained the atmosphere surrounding the DropChip just over the dew point. Solutions were added as followed: d 1: 100 nL of a suspension of U373 cells (0.2×10^6 cells/mL) in DMEM containing 10% SVF (Invitrogen); d 2: CDDP (5 μ M final) or PBS in 1 nL drop; d 3: 5 nL of siRNA (0 to 100 nM final concentration) precipitated in Oligofectamine solution (Invitrogen, 1:18 dilution in PBS).

The selected antiERCC1 siRNA sequence is GGAGCUG GCUAAGAUGUGUdTdT. The 5' end of the sense strand of the siRNA is located at position 547 in the coding sequence of the human ERCC1 gene, AB069681 Genbank Access number.

Cell Fixation and Analysis

The transfected cells were maintained hydrated in the chamber (a 10-cm Petri dish filled with 10 mL of PBS, the slide being kept above liquid on top of the lid of a 3-cm Petri dish) and kept in an incubator to allow the expression of the recombinant proteins (2 d) or the gene silencing (5 d in total). For gene silencing/pharmacology tests, the DropChip was dipped in a 3-mL solution of Live/Dead Kit (ref L7013, Molecular Probe). The chip was then fixated in a 4% paraformaldehyde PBS solution and rinsed twice in PBS.

For the microscopic observation, the DropChip was mounted with Dako fluorescent mounting medium (Dako) under a coverslip. In order to characterize the changes in cell phenotypes using Live/Dead/Hoechst fluorescence detection on the DropChip, we used an Olympus BX51 microscope, complemented by Pathfinder-OSA Imstar automated image capture (0.6- μ m precision) and analysis software. A fluorescence confocal Leica LCS microscope was used for GFP fluorescence analysis.

Results

The DropChip System

The DropChip is a parallel array of cell culture droplets on a microscope glass slide. It has been established that the shape

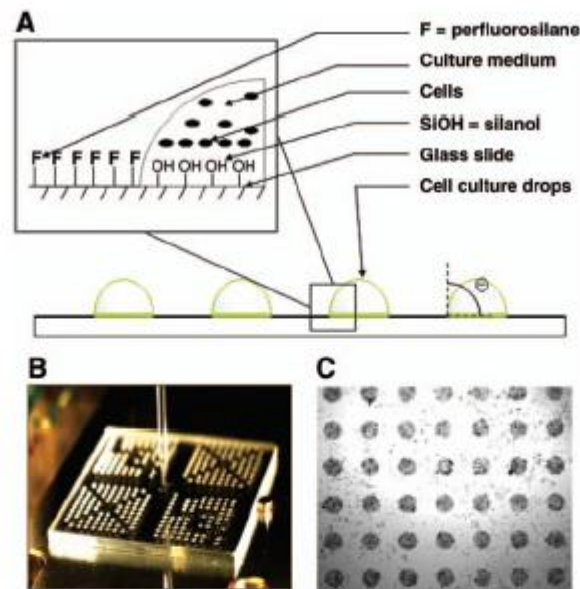


Fig. 1. The DropChip device. **(A)** schematic representation of the DropChip features. The contact angle is represented by θ . **(B)** formation of 100 nL drops on 400 500 μm spots with the piezoelectric nozzle. **(C)** HeLa cells concentrated on the bare glass spot surface avoiding the perfluoro-octyl-silane hydrophobic areas of the chip after two successive rinses in PBS.

and location of droplets smaller than 1 μL in volume are determined mainly by surface forces. Hence, patterns of differential surface tension on the substrate have been described as an efficient way of allowing densities of over 1000 droplets per cm^2 while avoiding cross contaminations (3). Adopting a similar approach, we have designed a $2.5 \times 2.5 \text{ cm}^2$ chemically modified glass chip in order to create a highly hydrophobic barrier surrounding the hydrophilic sites (Fig. 1A). With small size drops, the spot surface over volume ratio decreases when the contact angle θ of the liquid at the edge of the drop increases, to form a bigger droplet and increase the nutrient transfer from the culture medium to the cells. With a perfluoro-octyl-silane hydrophobic layer grafted onto the surface of the chip, we obtained a consistent contact angle $\theta = 105^\circ \pm 15^\circ$ for water droplets, comparable to the maximum 115° attainable with a self-assembled monolayer (4). The pattern comprises four blocks of 10×10 bare glass spots with a diameter of 500 μm each, spread evenly with a 1 mm center-to-center distance, and containing up to 100 nL of aqueous buffer (Fig. 1B). The compatibility of the surface chemistry with the cell physiology was assayed by dipping the chip in a cell culture during 2 d. As shown in Fig. 1C, cells gathered spontaneously on the bare glass spot surface while avoiding the hydrophobic areas of the chip. In addition, we found that successive rinsing washed away preferentially the cells outside

the spots, suggesting that cell adhesion is stronger on bare glass than on the perfluoro-octyl-silane treated surfaces.

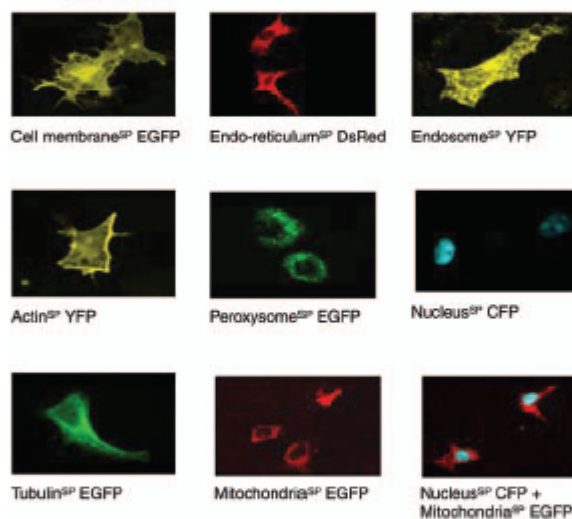
Then, in order to precisely mix the cell, drug, and nucleic acid drops onto the DropChip, we used a spotter (custom-made by Scienion GmbH with a 70- μm piezoelectric-controlled nozzle) to generate the drops. After spotting and to prevent evaporation of the cell culture droplets during the incubation, we maintained the DropChip in a Petri dish containing a bed of isotonic PBS buffer. In these conditions, we were able to preserve the drops for more than 1 wk at 37°C in the presence of 5% CO_2 and to observe the same daily division as standard cell lines in classical Petri dishes (data not shown).

As previously suggested by Garyantes (5), one major advantage of the DropChip over the microtiter plate is the ease with which one can perform the parallel treatments. After incubation, dipping the glass slide successively in different solutions is sufficient for cell fixation, fluorescent staining, and subsequent washes. Another advantage of the DropChip concept is the possible combination of automated image capture of cell spots with HCS computerized tools (Pathfinder OSATM, IMSTAR SA). It is possible to obtain highly magnified high-resolution images covering all the cells in a 500- μm spot. Thus, we can quantify the fluorescence intensities in each cell and automatically record cell aspects (roundness, shape, and size) reflecting the changes in cell phenotypes.

Table 1
Multiple Reverse and Direct Transfections Using a DropChip

A transfection efficiency			
DNA Types	reverse U373 cells	direct U373 cells	direct HEK cells
Oligonucleotides	100%	100%	100%
PCR fragments	4.3%	10.1%	50%
Plasmids	11.3%	33.7%	ND

B gene expression by reverse transfection in HeLa cells



(A) efficiency of the transfection in HEK and U373 cells in cell drops experiments. Each percentage is calculated from the number of GFP fluorescent cells versus the number of Hoescht-stained cells ratio after automatic detection by Pathfinder OSA. (B) Reverse transfections of cDNAs in HeLa cell for the expression of various ⁵⁹P fluorescent proteins (green, yellow, blue, and red) targeted to cell compartments: confocal microscopy, $\times 40$.

Reverse and Direct Transfection Using the DropChip

A large variety of cell-based experiments can be formed in patterned droplets. Focusing on cell transfection, we have compared the incorporation rates of three types of DNA (oligonucleotide, PCR fragment, and plasmid) in two different cell lines with direct and reverse transfections. Direct transfection consists in first dispensing cells on the substrate, then adding the transfection mix, while in reverse transfection, the DNA and transfection reagents are pre-spotted to the

chip before addition of the cell culture. The oligonucleotides were Cy3 labeled. The PCR fragments (6) and plasmids are coding for various fluorescent proteins (GFP, YFP, CFP, and DsRed) fused to subcellular signaling peptides (Clontech). The transfection efficiency was measured as the percentage of fluorescent cells after 48 h incubation in the cell culture with 100% of the cells incorporating the Cy3 oligonucleotide. However, the transfection efficiency decreased sharply to 30% and 10% for the direct and reverse incorporations,

respectively, of the plasmids (Table 1A) in U373 human glioblastoma cells.

We used confocal microscopy to ensure that the fluorescent proteins were correctly expressed in their assigned compartments—membrane, endoplasmic reticulum, endosome, actin, peroxisome, nucleus, tubulin, and mitochondria—and that double reverse transfection was possible (Table 1B). The high transfection efficiency (up to 50% for cDNA transfection in HEK cells) and the presence of anchoring pods in adherent cells (Table 1B, membrane ^{SP}EGFP figure) is an indicator of the good health of the cells within drops. The difficulty in making long pieces of DNA cross the cell membrane, and factors such as the cell line, the adsorption of DNA on cell surface, and the physiology of stressed cells can negatively impact the transfection. Nevertheless, with 100 cells per spot, obtaining at least 30% transfection efficiency is sufficient to reach a statistically significant number of cells over-expressing genes in each spot (2).

The reverse transfection chip concept is interesting, as it can be mass produced and dry-stored for months after dispensing the nucleic acids, waiting to be used with cells for gene silencing or recombinant protein expression, whilst direct transfection is easier to perform and more efficient.

siRNA and Anticancer Drug Treatments Using the DropChip

The combination of nucleic acid- and chemical-based assays was tested in a pharmacological study using a dose-response siRNA direct transfection in cancer cells. We have evaluated how ERCC1, Nucleotide Excision Repair protein 1, gene silencing enhanced the cytotoxic effect of an anticancer drug, cisplatin (CDDP), in U373 human glioblastoma cells, which are derived from an astrocytoma human resistant to cisplatin. Previous studies have shown the implication of the ERCC1 protein in the DNA degradation caused by the cisplatin (7). Moreover, Rosell et al. (8) proposed the DNA repair gene *ERCC1* as a biomarker for predicting the resistance of cells to cisplatin, thus helping tailor cisplatin-based diagnostics and chemotherapy.

We designed a siRNA sequence against the coding sequence of the *ERCC1* human gene. Four concentrations of siRNA were tested in duplicate; using 100 nL U373 cell culture drops (around 100 cells per assay) in the presence or absence of cisplatin onto the DropChip. The cisplatin final concentration was set at 5 μ M, the IC_{50} value as defined in preliminary experiments (data not shown). Standard direct transfections were performed by dispensing the siRNA with the transfection reagent into the cell culture droplets.

The toxic effect of cisplatin on the cells can be distinguished since the U373 cell size increased from 881 ± 198 to $1340 \pm 311 \mu m^2$ (no statistical variation of cell size was noted after the addition of the siRNA), and the number of cells decrease (50% per spot) after addition of the drug. Moreover,

the effect of the ERCC1-siRNA in the presence or absence of cisplatin was also monitored 3 d after the transfection (5 d after cell spotting) by staining the cells with ethidium homodimer-2, followed by fixation and red fluorescence image capture (Fig. 2A). In the absence of cisplatin, ethidium homodimer-2 did not stain the U373 cells, confirming that the siRNA does not exhibit any toxic effect at concentrations ranging from 5 to 100 nM. In contrast, in the presence of 5 μ M cisplatin, the red signal in cells increased in correlation with the siRNA concentration. We noted that the cytotoxic synergic effect of 5 μ M cisplatin and 100 nM ERCC1-siRNA is visible, as the cells are strongly stained with red and some cells are washed away from the substrate.

Figure 2B illustrates a precise analysis of cytotoxicity by automated cell-analysis systems coupled to the DropChip, reported as the distribution of the red signal within spots. The noncytotoxic effect of the siRNA in absence of cisplatin is illustrated by the fact that all signals were found below 500 grey level units. Interestingly, the distribution of these signals is not modified by the use of 5, 10, 25, or 100 nM ERCC1-siRNA (blue dashed lines). Nevertheless, in the presence of cisplatin, these red signals are much higher, up to 2000 grey level units. A dose-dependent cytotoxic effect of the siRNA combined with the cisplatin is highlighted in Fig. 2B (red colored lines for the 5, 10, 25, and 100 nM siRNA concentrations). The synergic effect of the downregulation of the ERCC1 expression and the cisplatin efficacy is in accordance with antisense-based assays in CP2.0 human colon tumor cells described by Yang et al. (9).

Discussion

We have demonstrated that cell-based assays can be performed easily in nanoliter drops, supported on a glass slide, for the purpose of multiple gene expression as well as dose-response gene-silencing experiments. Because the confinement of the cell-based assay within the drop provides an adequate format for multiplexed analyses, various cell types as well as different nucleic acids or drugs can be tested at different concentrations in a single experiment and in nanomolar quantities. Protocols for cell cultures in drops can easily be established adapting conventional methods of cell culture in microtiter plates. In particular, we have been able to combine gene silencing and drug screening to assess the hypothesis of the implication of the *ERCC1* gene in cisplatin cytotoxic pathway. Therefore, we concluded that each cell culture nanodrop represents an individual bioreactor in which different pharmacological interventions can be associated with the transfection, which is not possible when using the methodologies described in refs. 2 and 3, in which the uniform cell layer makes the addition a secondary compound to the site of the initial transfection impossible.

Another striking feature of the DropChip is the low and accurately controlled number of cells dispensed in each

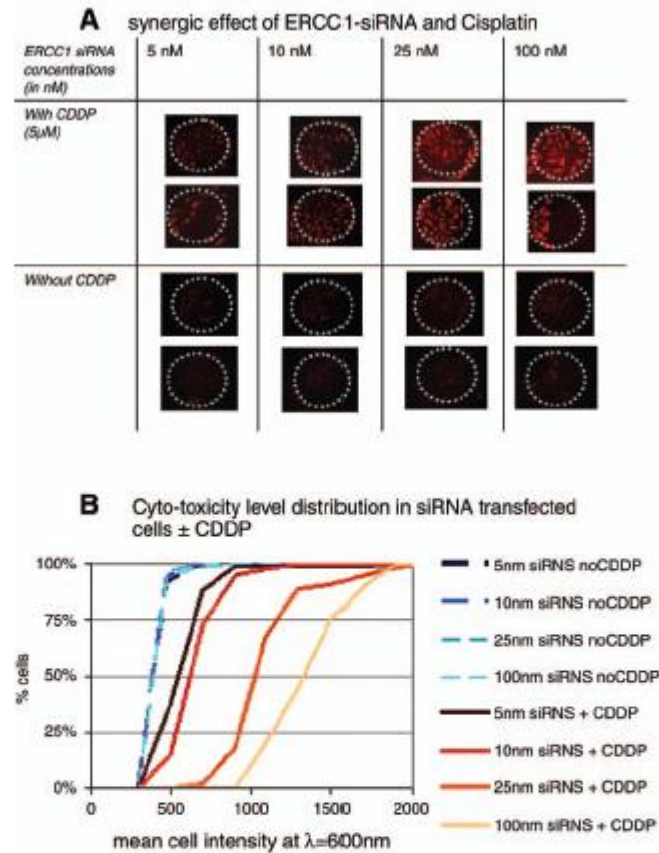


Fig. 2. *ERCC1* gene silencing combined with cisplatin treatment on the DropChip. **(A)** Ethidium homodimer-2 signal capture in U373 cell, treated or untreated with 5 μ M CDDP and transfected with various concentrations of the anti-*ERCC1* siRNA. Spots are shown for duplicate experiments; the dashed line indicates the spot position (500- μ m diameter). **(B)** Percentile distribution of the ethidium red level for each U373 cell treated by various concentrations of the siRNAs (5, 10, 25, and 100 nM) in the presence (four red plain curves) or in the absence (four blue dashed curves) of CDDP.

spot, making it a convenient device for the establishment of sensitive HCS methods. With around 100 cells per spot, we can easily draw a representation of the phenotype distribution across the cell population and at the scale of the individual cell. Once established for each of the conditions, the phenotype profiles can be compared pairwise and the differences in cell responses to different stimuli appear as an offset of cell mortality. With this approach, the variety of the individual cell phenotypes is taken into account and subtle changes in cell physiological states can be highlighted by the statistical analysis. Such a sensitivity could not be obtained with the traditional population-averaged cell-preparation techniques.

Specific biostatistical tools should now be further developed, taking into account the work achieved with DNA and protein chip analyses, while adapting it to cell-based screening, analyzing more complex nonuniform fluorescent signals. We are now working towards the integration of the DropChip device within a complete platform combining nanoliter drop spotting, cell printing, cell-based assays, high-content screening, and data management.

Acknowledgments

We thank the "Ligue contre le Cancer" French charity for their support, Imstar's team for image analysis advice, F Schaack and JM Egly for helpful advice.

References

1. Ziauddin, J. and Sabatini, D. M. (2001), *Nature* 411, 107–110.
2. Baghdoyan, S., Roupioz, Y., Pitaval, A., et al. (2004), *Nuclei Acids Res.* 32, e77.
3. Butler, J. H., Cronin, M., Anderson, K. M., et al. (2001), *J. Am. Chem. Soc.* 123, 888–894.
4. Srinivasan, U., et al. (1998), *Biomems* 7, 252–259.
5. Garyantes, T. (2002), *Drug Discov. Today* 9, 48–90.
6. This concept is called a "linear expression element" by Kathryn Skyes and Stephen Johnston [(1999), *Nature Biotech.* 17, 355–359].
7. Chaney, S. G. and Sancar, A. (1996), *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 1346–1360.
8. Rosell, R., Lord, R. V., Taron, M., and Reguart, N. (2002), *Lung Cancer* 38, 217–227.
9. Yang, L. Y., Li, L., Jiang, H., Shen, Y., and Plunkett, W. (2000), *Clin. Cancer Res.* 6, 77–81.

VI. ANNEXE VI : BREVET

E I L S E N P R O P R I É T É I N D U S T R I E L L E



36, rue de St Pétersbourg
75008 PARIS
Tél. (33) 01 53 21 11 00
Fax (33) 01 53 21 08 88
(33) 01 53 21 08 63

http://www.cabinet-ores.com
E-mail : ores@cabinet-ores.com

BEATRICE ORES ①②
PHARMACIEN DIPLOMÉ
DE LA FACULTÉ DE PARIS

IRENE ORES ①②③
LICENCIÉE ES-SCIENCES
LICENCIÉE EN DROIT
ANCIEN CONSEIL JURIDIQUE

BERNARD ORES ①②③
INGÉNIEUR CHIMISTE ESCIL
LICENCIÉ ES-SCIENCES

MARIE-JOSÉ VIALLE-PRESLES ①②③
DOCTEUR EN BIOCHIMIE

PHILIPPE JACQUARD ①②
INGÉNIEUR INPG

HÉLÈNE LEBLOIS-PRÉHALID ②④
DOCTEUR EN MICROBIOLOGIE
DOCTEUR VÉTÉINAIRE

SOPHIE GOULARD ①②
MAÎTRE ES-SCIENCES ANALYSES
BIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES

VALÉRIE CORIZZI ①②
INGÉNIEUR ÉCOLE POLYTECHNIQUE (PARIS)
DOCTEUR EN CHIMIE

ENRICO PRIORI ②④
INGÉNIEUR ÉCOLE CENTRALE PARIS
DOCTEUR EN PHYSIQUE

MICHEL BOLINCHES ①②
INGÉNIEUR ENSIACET

VÉRONIQUE MARCADÉ ①②
INGÉNIEUR ÉCOLE CENTRALE PARIS
DOCTEUR EN BIOLOGIE

CHANTAL NOËL ①②
INGÉNIEUR ESCOM

HÉLÈNE CORRET ①②③
INGÉNIEUR ÉCOLE CENTRALE LYON
DESS DE DROIT DE LA PROP. INDUSTRIELLE

XAVIER RANÇON ②④
INGÉNIEUR AGRICULTURE INA P-G
MAÎTRE ES-SCIENCES

XAVIER RATABOUL ④
INGÉNIEUR ENSAT

STÉPHANIE PATARIN ④
DOCTEUR EN BIOLOGIE MOLECULAIRE

THOMAS CHANTEREAU ④
DESS GENIE CELLULAIRE

SERVICE JURIDIQUE

GUY CARDELLI ①③
MAÎTRE EN DROIT
DESS DE DROIT DE LA PROP. INDUSTRIELLE

NATHALIE ROUSSET ①③
MAÎTRE EN DROIT DES AFFAIRES

GENEVIÈVE VU THANH ①③
LICENCIÉE EN DROIT DES AFFAIRES

FABRICE PIGEALUX ④
DESS DROIT DU MSI

SERVICE ADMINISTRATIF

ERIC ANDRIEU
DIRECTEUR ADMINISTRATIF ET FINANCIER

ANNIE LECLUYER
RESPONSABLE ADMINISTRATIVE H

DOCUMENTATION

& INFORMATIQUE

FABRICE SALISSEREAU

DÉLUST DROIT INFORMATIQUE
ET SYSTEME D'INFORMATION

① CONSEIL EN PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

② MANDATAIRE EN BREVETS EUROPÉENS

③ MANDATAIRE AGRÉÉ PRÈS L'OHMI

④ DIPLOMÉ(E) DU CEPI

S.A. au Capital de 360 000,00 €

380 823 179 R.C.S. Paris

INSERM-TRANSFERT

BIOPARK

7, rue Watt

75013 PARIS

A l'attention de Mme Denise HIRSCH et

M. Alexis FIALKOVSKY

Paris, le 8 août 2007

Dépôt d'une Demande Internationale PCT

Au nom de : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM).

Pour : « Sensitization of cancer cells to therapy using siNA targeting
genes from the 1p and 19q chromosomal regions. »

Invention : BERGER François, PELLETIER Laurent,
ISSARTEL Jean-Paul, BOCCARD Sandra

Priorité : EUROPE - n° 06291241.5 du 31 juillet 2006

V/Réf. : Dossier BIO 02334.1 BERGER/ISSARTEL N/Réf. HLP/clg - F059800091/WO/PCT

Chère Madame, Cher Monsieur,

Conformément à vos instructions en date du 9 juillet 2007, nous avons procédé
aux formalités de Dépôt de la Demande Internationale PCT mentionnée en
référence.

Ce Dépôt a été effectué auprès de l'Organisation Mondiale de la Propriété
Industrielle en date du :

23 juillet 2007

en revendiquant la priorité du dépôt initial suivant :

- Pays : EUROPE
- Date : 31 juillet 2006
- Numéro : 06291241.5.

Nous avons désigné tous les Etats contractants du PCT au moment du dépôt.

I- Cette Demande Internationale PCT fera l'objet d'une publication à bref délai
après l'expiration d'un délai de 18 mois à compter de la date de Dépôt de la
Demande de Brevet d'origine, c'est-à-dire après le :

31 janvier 2008.

.../...

VII. ANNEXE VII : POSTER PRESENTE ORALEMENT A L'EANO LE 15 SEPTEMBRE 2006

http://www.medacad.org/eano2006/content/eano2006.htm

Inserm

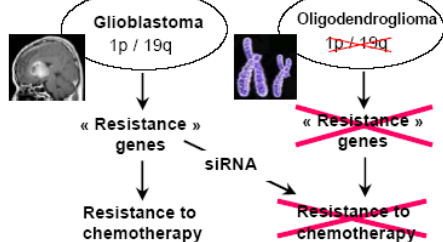
1p/19q DNA repair genes are potential targets to restore chemo-sensitivity in glioma

BOCCARD Sandra, PELLETIER Laurent, MARAND Sandie, ISSARTEL Jean-Paul, BERGER François
Unité INSERM 318, CHU A. Michallon, Pavillon B, BP 217x, 38 043 Grenoble Cedex 09, France

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
RENARD TILLOUZE HENRIE
SALADINO JEAN

Introduction

Despite recent progress, such as the introduction of temozolomide, glioblastomas remain a deadly disease with a median survival time of less than 15 months. This resistance to classical therapy is highly contrasting with oligodendroglioma chemosensitivity which has been correlated with 1p/19q loss of heterozygosity. In this context we hypothesized that genes involved in chemoresistance are located in this genomic area. We performed a bioinformatics analysis of this area and found more than 1,700 genes, including some with potential impact on drug resistance : drug efflux, metabolism, apoptosis, cell-cycle regulation and DNA-repair. We focused on DNA repair and performed a functional genomic study using siRNAs.



Results

Screening of DNA-repair genes involved in chemo-resistance of astrocytoma cells

To find out which genes are implicated in glioma chemo-resistance mechanisms, we developed an *in vitro* assay, designed for the siRNAs high-throughput screening. We measured cell number after chemotherapy and siRNA transfection to have a global chemosensitization evaluation, defined as a significant cell death increase compared with the effect of the drug alone. Preliminary experiments (not shown) established the drug and siRNA treatment protocols, and the specific temporal sequence of cell seeding, drug treatment, siRNA administration and cell viability measure.

We targeted 9 DNA-repair genes with siRNAs on an astrocytoma cell line. Significant chemosensitization effect was observed for 9 siRNAs directed to 6 genes (figure 1).

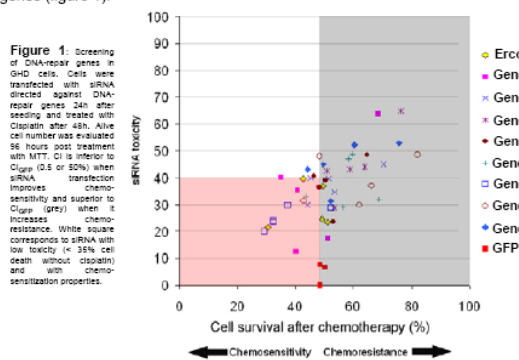


Figure 1: Screening of DNA-repair genes in GHD cells. Cells were transfected with siRNA directed against DNA-repair genes 24h after seeding and treated with Cisplatin after 48h. Alive cell number was evaluated 96 hours post treatment with MTT. CI is inferior to Clogp (0.5 or 50%) when siRNA transfection improves chemosensitivity and superior to Clogp (1pt) when it increases chemoresistance. White square corresponds to siRNA with low toxicity (< 35% cell death without cisplatin) and with chemosensitization properties.

We confirmed these results for 4 genes using several cell lines (U373, U138, U87, LN229, CCF) and qRT-PCR analysis (figure 2). These genes include the classical Ercc1 and 3 other targets under patenting.

Transposition of chemo-sensitization by siRNAs from CDDP to Temozolomide

We extended our study to Temozolomide, the chemotherapy gold standard for gliomas. Down-regulating ercc1 improved up to 24.5 % drug effects in GHD and U373 cells (figure 2). Ercc1 siRNAs were once more the most efficient. Chemo-resistance of these cells appears to be significantly based on ercc1 gene products for both CDDP and Temozolomide.

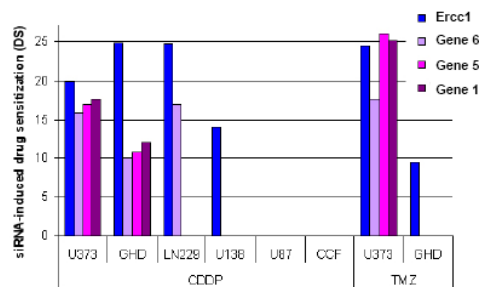


Figure 2: Drug sensitization by siRNAs. siRNAs were transfected in 2 different glioma-derived cell lines treated with Temozolomide (TMZ). DS corresponds to chemo-sensitization induced by siRNA. Data represents the mean of 3 independent experiments. Only significant results are reported.

Study for a link between the expression of DNA-repair genes and chemo-sensitivity

We studied the expression of the 4 DNA-repair genes by qRT-PCR in tumor extracts. For 3 of them, we observed approximately 50% decrease in expression in chemo-sensitive oligodendrogliomas compared to resistant glioblastomas.

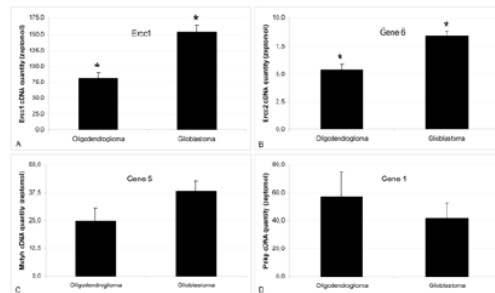
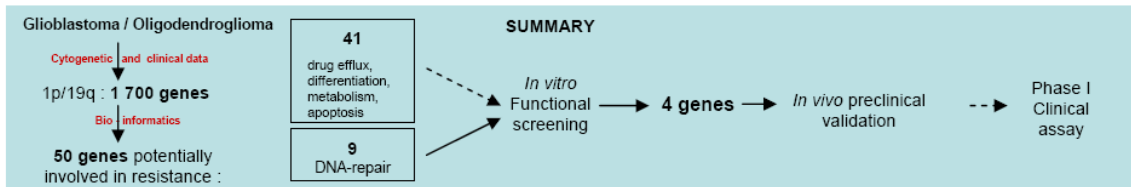


Figure 3: Expression of the 4 genes in tumors extracts. Ercc1 (A), gene 6 (B), gene 5 (C) and gene 1 (D) expressions were quantified by qRT-PCR (zeptomols or 10⁻²¹ moles) in 3 oligodendrogliomas and in 5 glioblastomas extracts. The difference of cDNA content was significant for ercc1 and gene 6 (*).

Conclusion and perspectives

This results provide new therapeutical strategy to increase chemosensitivity in glioblastoma, especially associated with Temozolomide. Preclinical studies are planned to confirm *in vivo* efficacy. They also suggest that DNA repair activity in glioblastoma could be predictive for therapy response.



CHU
GRENOBLE

Patent (06291241.5)

« Sensitization of cancer cells to therapy using siRNA targeting genes from 1p and 19q chromosomal regions »
Assigne : INSERM; Inventors : BOCCARD Sandra, PELLETIER Laurent, ISSARTEL Jean-Paul, BERGER François

cea

RNA interference targeting Ercc1 and Ercc2 DNA-repair genes increases glioblastoma cell chemosensitivity similarly to MGMT

Running title

Targeting DNA-repair genes chemo-sensitizes glioblastoma

BOCCARD Sandra G. 1, PELLETIER Laurent A. 1, MARAND Sandie V. 1, ISSARTEL Jean-Paul C. 1 2, BERGER François R1.

¹ INSERM U836 équipe 7, Grenoble Institut des Neurosciences, Bâtiment Edmond J. Safra Domaine de la Merci 38706 La Tronche Cedex 9 FRANCE

Phone : 33 4 56 52 06 29 / fax :33 4 56 52 06 39

² CNRS

Correspondance: L. PELLETIER; E-mail: laurent.pelletier@ujf-grenoble.fr

Abstract

Gliomas are the most common primary brain tumors. To date, therapies do not allow curing patients, and glioblastomas are especially associated with poor prognosis. As illustrated by recent introduction of temozolomide, considerable progress can still be realized by optimizing adjuvant chemotherapy.

The current low chemotherapy efficiency originates in intrinsic or acquired resistance. DNA repair mechanisms, allowing chemotherapy-induced alteration reversion, are the most studied when considering alkylating agents, such as temozolomide.

The aim of our study was to functionally investigate involvement of a set of DNA repair genes in Cisplatin and Temozolomide resistance.

We chose DNA repair genes located in the commonly chromosomal deleted region in oligodendroglioma (1p/19q) highly correlated with response to chemotherapy. We also incorporated the mgmt gene to our study because of its probable involvement, suggested by the correlation between the mgmt promoter methylation and response to temozolomide.

We measured the effects of siRNA-induced inhibition of expression of ten DNA-repair genes on the response of astrocytoma cells to cisplatin and temozolomide. Five siRNAs that target the mgmt, ercc1, ercc2, mutyh, and pnpk gene products were found to significantly sensitize cells to chemotherapy. Inhibition of expression of mgmt, ercc1, pnpk and mutyh, decreased chemo-resistance in a very similar way, increasing cell death up to 25% (ercc2 ?). Our results demonstrate that DNA-repair genes are involved in astrocytoma chemo-resistance and point to them as new targets in adjuvant chemo-sensitization treatment.

Keywords

DNA-repair, chemo-resistance, glioma, cisplatine (CDDP), temozolomide (TMZ), siRNA

Introduction

Glioblastoma is characterised a high degree of chemo-radioresistance. Since the publication of the phase III study initiated by EORTC and NCIC groups in 2005, standard treatment has become surgery followed by radiotherapy and temozolomide-based chemotherapy (Stupp et al., 2005). Concomitant radiotherapy and temozolomide administration has significantly improved median survival of glioma patients. While temozolomide will not cure patients with a modest survival increase, this result offered a new interest for chemotherapy in glioma therapy, after several decades of doubt concerning chemotherapy efficiency. New treatments have to be developed, using new chemotherapy agents or innovative treatments increasing existent chemotherapy efficacy.

Fighting chemoresistance mechanisms would be a promising way. Intrinsic or acquired resistance indeed remains a major limitation in the use of cytotoxic chemotherapy. A variety of cancer cell resistance mechanisms have been described, including decreased drug uptake into cells or increased drug efflux, intracellular drug inactivation or repair of drug-induced damage.

Data concerning involvement of drug efflux systems in multi-drug resistance (MDR) phenotype of gliomas, in particular the P-glycoprotein (PGP), are scattered and conflicting (Bahr et al., 2003; Demeule et al., 2001; Ashmore et al., 1999).

Many studies support the link between DNA-repair and chemo-resistance³⁻⁶. Indeed, most commonly employed chemotherapy drugs such as the PCV regimen (Procarbazine, Lomustine (CCNU), and Vincristine), Cisplatin (CDDP), Fotemustine or Temozolomide are DNA-alkylating molecules that damage DNA, leading cells to apoptosis. But cells can correct chemotherapy-induced alterations thanks to various DNA-repair mechanisms^{7, 8} and thus overcome treatment.

Interestingly, response to Temozolomide was strongly correlated with methylation of the DNA repair gene MGMT⁹. Down regulation of MGMT expression would explain sensitivity to therapy due to the absence of repair of alkylating adducts.

Altogether, these observations point to DNA repair pathways as major regulators of chemotherapy response. These mechanisms can therefore be considered as a promising therapeutic target to enhance the efficacy of temozolomide.

Contrasting with astrocytomas, oligodendrogliomas have a dramatic chemo-sensitivity resulting in a median survival of 10 years. Oligodendroglioma response to chemotherapy has been correlated with the loss of heterozygosity (LOH) on 1p and 19q chromosomal arms. Such a correlation strongly suggests that cytogenetic events modify expression in some critical genes involved in chemo-sensitivity. This correlation, associated with the completion of human genome sequencing provided us the opportunity to investigate a restricted number of potential candidates. Indeed 10 of the 150 DNA repair genes listed by Wood were located there, among 1 700 other genes (Wood, 2005).

SiRNAs offer new opportunities for addressing the functional impact of these genes in glioblastoma chemoresistance. RNA interference is a powerful tool to perform loss-of-function genetic screening, not only used as an approach to reverse functional genomics, but also as an effectively potent strategy for gene silencing-based therapeutics. We used siRNA for knocking down expression of the 10 DNA repair genes individualized on 1p/19q in several human glioma cell lines.

We showed that 4 of the 10 1p/19q DNA repair genes had significant impact on cisplatin or Temozolomide effect : Ercc1, Ercc2, Mutyh and Pnkp. We also tested the capability of

siRNA targeting Mgmt, which involvement was suggested in resistance to temozolomide. As expected, but never observed using siRNA, targeting of Mgmt was also effective. SiRNA directed to all five gene were quite similarly active for chemo-sensitizing glioma cells. This functional genomic analysis allowed us to emphasize involvement of already well known genes as well as new potential candidates in the DNA repair pathway providing both a way to explain oligodendroglioma chemosensitivity and new targets for glioblastoma chemosensitivation in association to the classical Stupp regimen.

Materials and Methods

Cell lines and culture

U373, U138, U87, CCF and LN229 cells deriving from human astrocytomas were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD), maintained in DMEM (Cambrex Biosciences, New Jersey, USA) with 10% foetal calf serum (v/v; AbCys, Paris, France), and incubated in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C.

The GHD cell line was obtained in our laboratory from a human glioblastoma (the genotype was checked with fluorescence in situ hybridization and contained chromosome 7 polysomy, chromosome 10 monosomy).

Inhibition of gene expression by siRNA

Three to five siRNA pairs were designed for each targeted gene (Table 1) and delivered in duplex form (Eurogentec, Belgium). We used siRNA targeting Green Fluorescent Protein (GFP) as a control siRNA.

SiRNAs at a concentration of 150nM were added to the culture medium with oligofectamine (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) 24h after cell seeding according to the manufacturer's instructions.

Each condition (siRNA) was tested in 3 independent experiments, with six replicates each time.

Growth of cells and evaluation of the effect of siRNA on drug sensitivity

Cells were seeded in 96-well plates. The chemotherapy drugs Cisplatin (CDDP, Merck, USA) and temozolomide (TMZ; Schering-Plough, Levallois-Perret, France) were added after 48h. Temozolomide was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 10mg/ml and stored at -20°C.

Cell survival was determined by measuring mitochondrial succinate dehydrogenase activity with 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma; 0.5mg/ml) added to the culture medium. Culture medium was discarded after 4h and formazan crystals were dissolved in DMSO/ethanol (50/50). Optical density (OD) was read at 540nm.

Chemoresistance was related to an index (CI) corresponding to the proportion of a cell population that survived chemotherapy. It was calculated as follows: cell number (OD) with chemotherapy / cell number (OD) in control condition.

The benefit of transfection was represented by the siRNA-induced drug sensitization index (DS), which corresponds to the cell population (%) that survived a simple chemotherapy treatment but died in response to the same treatment following siRNA transfection. It was calculated as follows: $(CI_{siRNA\ GFP} - CI_{siRNA\ X}) / CI_{siRNA\ GFP} \times 100$.

Significant differences between series were tested by ANOVA using Statview (SAS institute). Differences were considered significant when $p < 0.05$ (*) and very significant when $p < 0.01$ (**).

QRT-PCR

RNA was extracted on silica columns (NucleoSpin, Macherey-Nagel, Germany). cDNA was purified after reverse transcription (Mini Elute, PCR Purification Kit, Qiagen, France). DNA samples were amplified in a Light Cycler (Roche Diagnostic, France) with specific primers.

Measures were performed twice from each cell sample and results were expressed as the mean of at least three independent samples (originating from independent *in vitro* experiments).

Design of primers

The primers employed in these studies were obtained from Eurogentec (Belgium):
CyclophilinA (Y00052) Forward 5'-TTC ATC TGC ACT GCC AAG AC-3'
and Reverse 5'-TCG AGT TGT CCA CAG TCA GC-3'
Ercc1 (NM001983) Forward 5'-GGC GAC GTA ATT CCC GAC TA-3'
and Reverse 5'-AGT TCT TCC CCA GGC TCT GC-3'
Ercc2 (NM000400) Forward 5'-CGG AAC TAT GGG AAC CTC CT-3'
and Reverse 5'-TAC TTC TCC AGG GCG ACA CT-3'
Mutyh (NM012222) Forward 5'-GTC CTG ACG TGG AGG AGT GT-3'
and Reverse 5'-CCT CTG CAC CAG CAG AAT TT-3'
Pnkp (NM007254) Forward 5'-TCG AGA GAT GAC GGA CTC CT-3'
and Reverse 5'-TTT ATT GTG GAG GGG AGC TG-3'
Mgmt (NM002412) Forward 5'- AGCTGATGCCGTGGAGGT-3'
and Reverse 5'- ACGACTCTTGCTGGAAAACG-3'

Results

In silico identification of candidate genes

To select genes potentially involved in glioblastoma chemo-resistance, we screened the chromosomal area commonly considered as correlated with oligodendroglioma chemo-sensitivity (1p36-1p32 and 19q13.2-19q13.4; ¹²). We found nine genes belonging to different DNA-repair systems among the 1700 genes located in these regions (Table 2). We were surprised to also find a MDR-related gene that we incorporated in our study (MGC1370). We used databases on the web (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>; <http://www.ensembl.org/>; http://www.cgal.icnet.uk/DNA_Repair_Genes.html; Supplement to the paper by Wood, 2005) and published data ¹³⁻¹⁵.

Development of the *in vitro* chemo-sensitivity test

To find out which genes (Table 2) were implicated in glioma chemo-resistance mechanisms, we developed an *in vitro* assay designed for high-throughput screening of siRNAs. We measured cell number after chemotherapy and siRNA transfection to have a global chemo-sensitization evaluation, defined as a significant increase in cell death compared with the effect of the drug alone. Preliminary experiments (not shown) established the protocols for drug treatment, siRNA administration and cell viability measurements.

We chose CDDP because it is an alkylating agent harbouring a very reproducible activity *in vitro*. As already observed ¹⁶, most, if not all, cell damages occurred during the first hour of drug treatment since one and 24 hour(s) incubations were equally efficient. Moreover, we established that the mRNA level was the lowest 24 and 48 hours after siRNA transfection. Altogether, these data suggested that siRNAs had to be added prior to the drug. Chemo-

sensitization was effectively observed only in this condition and no significant chemo-sensitization arose when transfection was carried out after chemotherapy.

Screening of DNA-repair genes involved in chemo-resistance of astrocytoma cells

Our project was developed as a three part-strategy. We first screened siRNAs targeting candidate genes on one cell line. Then, we extended our study to six astrocytoma-derived cell lines and validated them at the molecular level. Finally, we extended the study to a second chemotherapeutic agent, temozolomide.

We screened 9 DNA-repair genes and the MDR-like gene MGC1370 with up to 5 different siRNAs per gene (Table 1) on the GHD cell line. Cell viability was measured in the absence and presence of CDDP. SiRNAs were selected on the basis of two criteria: the absence of basal toxicity and their ability to improve chemotherapy treatment. We discarded toxic siRNAs inducing more than 35% cell death after transfection (without CDDP). In contrast, we retained those increasing sensitivity to the chemotherapy drug. A siRNA increased chemo-sensitivity when its chemo-resistance index (CI) was lower than GFP siRNA CI, which was 0.5. In figure 1, the white square corresponds to a siRNA with low toxicity and with chemo-sensitization properties. Nine siRNAs out of 46 matched with these criteria, corresponding to 6 genes: *ercc1*, *ercc2*, *mtyh*, *pnkp*, *ruvbl2* and *pold1*. Only one siRNA corresponding to *ercc1*, *mtyh*, *pnkp*, *ruvbl2* and *pold1* increased chemo-sensitivity, while 4 out of 5 sequences targeting *ercc2* fulfilled these conditions. No siRNA directed to MGC1370 led to a significant effect (Fig. 1).

Highlighted genes were further analysed to validate preliminary screening, using only the most efficient siRNA for each gene (Table 1). We extended the experiments to 5 other cell lines and we confirmed that 4 siRNAs, *ercc1*, *ercc2*, *mtyh* and *pnkp*, had significant chemo-sensitization effects (Table 3). Inhibition of *ercc1* was the most potent in sensitizing cells to CDDP (up to 24.9%). Moreover, its effect was the most widespread since 4 out of the 6 cell lines were sensitized. The 3 other siRNAs were equally efficient (up to 17%) but only on 2 (*mtyh* and *pnkp*) or 3 (*ercc2*) cell lines (Table 3). Adding multiple (2 or 3) siRNAs to the cells did not show any greater efficiency (data not shown).

In order to validate these effects at the molecular level, we confirmed downregulation of the mRNAs corresponding to all of the siRNAs by using qRT-PCR (Table 4). The target specificity was confirmed by the absence of an effect of any siRNA on either cyclophilin A or other gene expression (data not shown). There was no obvious link between the efficiency of siRNA in decreasing mRNA levels (nor with final mRNA content; not shown) and functional impact on cell viability (Table 3). This is reinforced by the observation that the *ercc1* mRNA level actually decreased (by 65 %) in U87 cells which were yet not chemosensitized.

Transposition of chemo-sensitization by siRNAs from CDDP to temozolomide

Since temozolomide has become the gold standard in chemotherapy for gliomas, we extended our study to this drug using GHD and U373 cell lines. All siRNAs sensitized U373 cells to both CDDP and TMZ with a similar efficacy (Fig. 2).

The siRNAs were less efficient on GHD cells treated with TMZ compared to CDDP and only the effects of the *ercc1* siRNA remained statistically significant (not shown).

Mgmt is considered as a major DNA-repair enzyme involved in resistance to several chemotherapy drugs since the end of twentieth century. Recently, Hegi et al have shown a correlation between the DNA repair gene Mgmt and response to temozolomide (Hegi, 2005). Since Mgmt has become a very exciting candidate gene for taking account of glioma chemoresistance, we integrated it to our study.

The siRNA we designed reduced Mgmt mRNA content by more than 80 % (table 3). When added prior to either Cisplatin or Temozolomide, this siRNA significantly improved the drug effect. The CDDP effect was increased by 31.6 %, and the Temozolomide one was increased by 27.9 %.

Discussion

Despite the recent demonstration of the improvement in survival following radio- and chemotherapy regimens (TMZ) for glioblastoma, this malignancy remains an incurable disease. In contrast, oligodendrogliomas constitute a chemoresponsive clinico-biological entity. The unique correlation between 1p/19q LOH and oligodendroglioma chemosensitivity prompted us to perform a bio-informatic analysis of these chromosomal areas in order to investigate genes potentially involved in chemo-sensitivity. In a very recent publication Jenkins et al demonstrated that 1p/19q LOH was mediated by a translocation. This early cytogenetic event was also associated with a longer overall survival. These results first help to better understand how these cytogenetic alterations can be frequently associated. But, above all, they reinforce the hypothesis that expression of genes located in both regions can be altered, being finally responsible for chemo-sensitivity of oligodendroglioma.

Several teams have focused the search on genes with potential oncogenic properties, whose inactivation would lead to oligodendroglioma oncogenesis, but no convincing results have been obtained to date. Among the 1700 genes located on the common area, we were surprised to found 10 DNA-repair genes, and among them one of the more paradigmatic DNA repair gene, ERCC1. Surprisingly, the involvement of 1p19q DNA repair genes in the unknown mechanisms of oligodendroglioma chemosensitivity has not been hypothesized previously. To prove functionally this hypothesis we developed an *in vitro* chemosensitivity assay and conducted a RNA interference study.

We developed an adequate *in vitro* chemo-sensitivity assay in 96-well plates, responding to the requirement of high-throughput analysis. The most important parameter was the temporal sequence of treatments, since siRNA impact on DNA repair activity had to line up with chemotherapy treatment. We succeeded in interfering with drug-induced DNA adduct repair when siRNA transfection was performed 24 hours prior to chemotherapy in accord with data published by Parker ¹⁶, who showed that drug effects occur in the first 6 hours of treatment.

Taking into account the poor reliability of siRNA sequence algorithms for predicting efficient siRNAs, we performed the first experiments using up to 5 designed siRNA sequences per gene. In our high-throughput strategy, it was impossible to measure the impact of siRNAs on both mRNA and protein (there are no antibodies available for the targets). However, downregulation of gene expression was always confirmed by qRT-PCR in subsequent validation experiments. To ensure accurate conclusions, we chose to eliminate siRNAs inducing toxic effects (defined as siRNA transfection-induced cell death). This could be due to the targeting of an essential gene. Although probably interesting, siRNA toxicity would have masked any chemo-sensitization. On the other hand, siRNAs that did not have any impact on cell number were left out. Finally, among the 46 sequences tested in this study, only 9 had a significant chemo-sensitivity impact, demonstrating the importance of a

validated high-throughput test to bring out efficient siRNA targets.

Several studies suggest that chemo-resistance results from drug efflux. However, they failed to establish a consensus¹⁷. Expression of the MDR-1 P-glycoprotein (P-gp), a protein associated with MDR, was not preferentially detected in resistant gliomas¹⁸, and these data were only obtained *in vitro* on well established cell lines. Bahr¹⁹ demonstrated that this mechanism is absent in primary glioma cultures and appears in long-term cultured cell lines and that only cerebral endothelium may contribute to the MDR *in vivo*.

Finally, previously implicated MDR-related genes were not located in the common 1p/19q deletion. However, our bio-informatics analysis interestingly allowed us to find one gene there (MGC13170) coding for an MDR equivalent, but the corresponding siRNAs failed to improve drug effects *in vitro*.

We observed heterogeneity in responses to siRNAs among the 6 cell lines. These differences were not related to known differences in cytogenetic or genetic (as p53 mutations) status. While no siRNA improved chemotherapeutic effects on CCF and U87, all siRNAs sensitized U373 to both CDDP and temozolomide. Such heterogeneous results were already observed for glioma cell lines in an unrelated work²⁰.

It is important to notice that among cell lines with opposite behaviors, U373 and U87 are the most frequently used for studying gliomas, as shown by the number of publications (search «glioma» and «U87» or «U373» or «U138» or «LN229» or «CCF»: 454, 272, 35, 20, 32 respectively in pubmed on 2006 October). Thus, no cell line can be sufficiently representative for constituting an *in vitro* model, and results obtained with only one cell line should be taken in account very cautiously in clinical applications.

Heterogeneity in responses to siRNAs between our cell lines probably results from the strong variability in gene expression. However, we did not find any correlation between the mRNA levels (in basal or CDDP conditions) and the siRNAs' ability to chemo-sensitize.

DNA-repair systems have redundant functions. So, basal chemo-resistance/sensitivity or the ability of a siRNA to chemo-sensitize could probably be evaluated with a precise measure of all genes belonging to the different systems potentially involved in these mechanisms.

We selected one siRNA for each of the following genes: *ercc1*, *ercc2*, *mutyh* and *pnkp*. Subsequent studies extended to six cell lines confirmed their involvement in drug resistance of glioma cells.

First, we found two genes belonging to the BER system: *mutyh* and *pnkp*. Only the systematic bio-informatics analysis prompted us to analyze them, as no previous publication involved them in chemo-sensitivity.

Mutyh is known to repair 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) caused by oxidation. Gene mutations and variants were associated with development of multiple colorectal adenomas and cancers²¹. This is the first time that *mutyh* has been implicated in chemo-sensitivity, warranting further studies to investigate its mechanisms of action.

Pnkp was shown to be involved in repairing DNA strand breaks caused by reactive oxygen species, ionizing radiation or alkylating agents^{22, 23}. It has been related to susceptibility to genotoxic agents but not to chemo-sensitivity²⁴. Nevertheless, interactions of *pnkp* with another DNA-repair protein such as *Xrcc1*, which is related to tumoral processes, could account for our results²⁵.

The main functional impact was observed with the two most studied genes of the NER system: *ercc1* and *ercc2* (XPD). The NER system has a critical role in repairing DNA and has been extensively studied in cancer cells.

Ercc2 expression was correlated with resistance to alkylating compounds in numerous cell lines^{26, 27}, including glioma cell lines²⁸, but no link has been established between this expression and NER activity²⁷. This suggests that *Ercc2* is not a NER rate-limiting enzyme as in primary lymphocytes²⁹. It could also act via homologous recombination repair system as in SKMG-4 glioma cells³⁰. Another complexity level is the number of *ercc2* polymorphisms without clear associated phenotypes³¹. These polymorphisms obviously contribute to governing *ercc2* cellular function. So, while a previous report showed that its overexpression increased DNA repair in a glioma cell line³², the present results are the first demonstration of its functional involvement in drug resistance.

The most important chemo-sensitization occurred when *ercc1* expression was inhibited: DS was not larger but significant sensitization was found in a greater number of cell lines (4 vs 3 for *ercc2*, and 2 for *mutyh* and *pnkp*). These results emphasize previous reports on the major role of *ercc1* in repairing DNA alterations related to alkylating chemotherapy. For example, it is involved in CDDP-induced adduct repair *in vitro*^{7, 33}, and reduction of its expression enhances cisplatin cytotoxicity in ovarian cancer cell lines^{34,35}. But it is only recently that direct functional evidence showed that *ercc1* is involved in drug resistance of cultured cells^{36,37}.

Both, an important activity of *ercc1* and its overexpression in astrocytoma (SAGE NCBI) point at *ercc1* as a major actor in drug resistance. As a consequence, it would be at least partially responsible for differences in oligodendroglioma/astrocytoma responses to chemotherapy. This would be reinforced by analysis of *ercc1* function in oligodendroglioma and astrocytoma. *Ercc1* therefore has a critical clinical interest, and inhibition of its expression must be considered as a promising adjuvant treatment in astrocytomas.

Moreover, it has been shown that descriptive analysis concerning *ercc1*, such as expression or polymorphisms, were correlated with stage or clinical outcome in several cancers: glioma³⁸, stomach³⁹, ovary⁴⁰ and lung^{41,42}, for example (for review, see:^{43,44}). It appears as a very recurrent if not universal component of tumor drug resistance and thus as a universal diagnostic/prognostic marker and/or therapeutic target.

In any case, clinical application of such a strategy using siRNAs would benefit from the measure of the target expression (mRNA or protein) in order to better fit treatment to tumor specificities and finally optimize response to therapy. This analyse would in fact comprise measurement of expression of all genes with redundant function in order to take in account their relative involvement.

The aim of our study was to elucidate a part of the mechanism of astrocytoma drug resistance. The study benefited from the strong correlation between the remarkable chemo-sensitivity and 1p/19q LOH observed in oligodendrogliomas. Furthermore, this correlation allowed focusing on a fewer number of but more relevant candidate genes. We demonstrated here that knockdown of DNA-repair genes increased chemo-sensitivity of astrocytoma cells to both CDDP and temozolomide. Beside the recently demonstrated impact of MGMT, we add several new DNA repair genes not previously related to glioblastoma chemoresistance. This study is thus a good example of the synergistic results that can be obtained by associating cytogenetics with bio-informatics and functional genomic analysis.

siRNAs would be the basis of a real revolution in gene therapy since they are now currently used *in vivo*, and several phase I clinical trials are in progress.

Finally, our results concerning involvement of *ercc1*, *ercc2*, *mutyh* and *pnkp* in the drug resistance of astrocytoma encourage us to prepare clinical assays based on siRNA-based adjuvant treatment associated with temozolomide.

Collectively, our data provide a strong mechanistic rationale for the combination of siRNA targeting several DNA repair genes and temozolomide, and should propel the clinical testing of this therapy approach in patients with malignant gliomas.

Acknowledgements

We thank Mrs Virginie Pautre for her help in qRT-PCR, Mrs Danièle Adamski, Mrs Loubna Larag and Mr Matthieu Ségura for their assistance in cell culture, Mr Brivael Trelhu for his work on chemotherapy test development, and Mrs Mariko Matsui, Mr Manuel François and Mr Sébastien Maréchal for their work on functional *in vitro* experiments.

This work is part of the national program "Carte d'Identité des Tumeurs® (CIT), funded and developed by the Ligue Nationale Contre le Cancer. SB was supported by La Ligue Contre le Cancer – comité de l'Isère. SM was supported by La Ligue Nationale Contre le Cancer.

References :

1. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 2005;109(1):93-108. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15685439.
2. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352(10):987-96. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15758009.
3. Bosken CH, Wei Q, Amos CI, Spitz MR. An analysis of DNA repair as a determinant of survival in patients with non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002;94(14):1091-9. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12122100.
4. Bellmunt J, Paz-Ares L, Cuello M, Cecere F, Albiol S, Guillem V, Gallardo E, Carles J, Mendez P, de la Cruz J, Taron M, Rosell R, et al. Gene expression of ERCC1 as a novel prognostic marker in advanced bladder cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Ann Oncol* 2007;18(3):522-8. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17229776.
5. McNeill DR, Wilson DM, 3rd. A dominant-negative form of the major human abasic endonuclease enhances cellular sensitivity to laboratory and clinical DNA-damaging agents. *Mol Cancer Res* 2007;5(1):61-70. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17259346.

6. Garcia-Campelo R, Alonso-Curbera G, Anton Aparicio LM, Rosell R. Pharmacogenomics in lung cancer: an analysis of DNA repair gene expression in patients treated with platinum-based chemotherapy. *Expert Opin Pharmacother* 2005;6(12):2015-26. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16197356.
7. Li Q, Yu JJ, Mu C, Yunmbam MK, Slavsky D, Cross CL, Bostick-Bruton F, Reed E. Association between the level of ERCC-1 expression and the repair of cisplatin-induced DNA damage in human ovarian cancer cells. *Anticancer Res* 2000;20(2A):645-52. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10810335.
8. Wu X, Fan W, Xu S, Zhou Y. Sensitization to the cytotoxicity of cisplatin by transfection with nucleotide excision repair gene xeroderma pigmentosum group A antisense RNA in human lung adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2003;9(16 Pt 1):5874-9. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14676109.
9. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352(10):997-1003. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15758010.
10. Perry JR, Louis DN, Cairncross JG. Current treatment of oligodendrogliomas. *Arch Neurol* 1999;56(4):434-6. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10199331.
11. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald DR, Ino Y, Ramsay DA, Louis DN. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(19):1473-9. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9776413.
12. Smith JS, Alderete B, Minn Y, Borell TJ, Perry A, Mohapatra G, Hosek SM, Kimmel D, O'Fallon J, Yates A, Feuerstein BG, Burger PC, et al. Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. *Oncogene* 1999;18(28):4144-52. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10435596.
13. Harris AL. DNA repair: relationship to drug and radiation resistance, metastasis and growth factors. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1985;48(5):675-90. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3932243.
14. Wood RD, Mitchell M, Lindahl T. Human DNA repair genes, 2005. *Mutat Res* 2005;577(1-2):275-83. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15922366.
15. Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 2003;193(1-2):3-34. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14599765.

16. Parker RJ, Poirier MC, Bostick-Bruton F, Vionnet J, Bohr VA, Reed E. Peripheral blood leukocytes as a surrogate marker for cisplatin drug resistance: studies of adduct levels and the repair gene ERCC1. *Basic Life Sci* 1990;53:251-61. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1704215.
17. Ashmore SM, Thomas DG, Darling JL. Does P-glycoprotein play a role in clinical resistance of malignant astrocytoma? *Anticancer Drugs* 1999;10(10):861-72. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10630353.
18. Demeule M, Shedid D, Beaulieu E, Del Maestro RF, Moghrabi A, Ghosn PB, Moundjian R, Berthelet F, Beliveau R. Expression of multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) in human brain tumors. *Int J Cancer* 2001;93(1):62-6. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11391622.
19. Bahr O, Rieger J, Duffner F, Meyermann R, Weller M, Wick W. P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein mediate specific patterns of multidrug resistance in malignant glioma cell lines, but not in primary glioma cells. *Brain Pathol* 2003;13(4):482-94. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14655754.
20. Saino M, Maruyama T, Sekiya T, Kayama T, Murakami Y. Inhibition of angiogenesis in human glioma cell lines by antisense RNA from the soluble guanylate cyclase genes, GUCY1A3 and GUCY1B3. *Oncol Rep* 2004;12(1):47-52. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15201957.
21. Chow E, Thirlwell C, Macrae F, Lipton L. Colorectal cancer and inherited mutations in base-excision repair. *Lancet Oncol* 2004;5(10):600-6. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15465463.
22. Whitehouse CJ, Taylor RM, Thistlethwaite A, Zhang H, Karimi-Busheri F, Lasko DD, Weinfeld M, Caldecott KW. XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. *Cell* 2001;104(1):107-17. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11163244.
23. Chappell C, Hanakahi LA, Karimi-Busheri F, Weinfeld M, West SC. Involvement of human polynucleotide kinase in double-strand break repair by non-homologous end joining. *Embo J* 2002;21(11):2827-32. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12032095.
24. Rasouli-Nia A, Karimi-Busheri F, Weinfeld M. Stable down-regulation of human polynucleotide kinase enhances spontaneous mutation frequency and sensitizes cells to genotoxic agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(18):6905-10. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15100409.
25. Plo I, Liao ZY, Barcelo JM, Kohlhagen G, Caldecott KW, Weinfeld M, Pommier Y. Association of XRCC1 and tyrosyl DNA phosphodiesterase (Tdp1) for the repair of topoisomerase I-mediated DNA lesions. *DNA Repair (Amst)* 2003;2(10):1087-100. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13679147.

26. Chen ZP, Malapetsa A, Monks A, Myers TG, Mohr G, Sausville EA, Scudiero DA, Panasci LC. Nucleotide excision repair protein levels vis-a-vis anticancer drug resistance in 60 human tumor cell lines. *Ai Zheng* 2002;21(3):233-9. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12451985.
27. Xu Z, Chen ZP, Malapetsa A, Alaoui-Jamali M, Bergeron J, Monks A, Myers TG, Mohr G, Sausville EA, Scudiero DA, Aloyz R, Panasci LC. DNA repair protein levels vis-a-vis anticancer drug resistance in the human tumor cell lines of the National Cancer Institute drug screening program. *Anticancer Drugs* 2002;13(5):511-9. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12045463.
28. Chen ZP, McQuillan A, Mohr G, Panasci LC. Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency gene 2 expression and chloroethylnitrosourea resistance in human glioma cell lines. *Neurosurgery* 1998;42(5):1112-9. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9588557.
29. Vogel U, Dybdahl M, Frentz G, Nexø BA. DNA repair capacity: inconsistency between effect of over-expression of five NER genes and the correlation to mRNA levels in primary lymphocytes. *Mutat Res* 2000;461(3):197-210. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11056291.
30. Aloyz R, Xu ZY, Bello V, Bergeron J, Han FY, Yan Y, Malapetsa A, Alaoui-Jamali MA, Duncan AM, Panasci L. Regulation of cisplatin resistance and homologous recombinational repair by the TFIIH subunit XPD. *Cancer Res* 2002;62(19):5457-62. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12359753.
31. Benhamou S, Sarasin A. ERCC2 /XPD gene polymorphisms and lung cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2005;161(1):1-14. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15615908.
32. Chen Z, Zhang J, Mohr G. Enhancing alkylating agent resistance through ERCC2 gene transfection in human glioma cell line. *Chin Med J (Engl)* 2003;116(8):1171-4. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12935404.
33. Chaney SG, Sancar A. DNA repair: enzymatic mechanisms and relevance to drug response. *J Natl Cancer Inst* 1996;88(19):1346-60. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8827012.
34. Selvakumaran M, Pisarcik DA, Bao R, Yeung AT, Hamilton TC. Enhanced cisplatin cytotoxicity by disturbing the nucleotide excision repair pathway in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 2003;63(6):1311-6. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12649192.
35. Chen H, Shao C, Shi H, Mu Y, Sai K, Chen Z. Single nucleotide polymorphisms and expression of ERCC1 and ERCC2 vis-a-vis chemotherapy drug cytotoxicity in human glioma. *J Neurooncol* 2006. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17151930.
36. Chang IY, Kim MH, Kim HB, Lee do Y, Kim SH, Kim HY, You HJ. Small interfering RNA-induced suppression of ERCC1 enhances sensitivity of human cancer cells to cisplatin.

Biochem Biophys Res Commun 2005;327(1):225-33. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15629453.

37. Cummings M, Higginbottom K, McGurk CJ, Wong OG, Koberle B, Oliver RT, Masters JR. XPA versus ERCC1 as chemosensitising agents to cisplatin and mitomycin C in prostate cancer cells: role of ERCC1 in homologous recombination repair. *Biochem Pharmacol* 2006;72(2):166-75. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16756962.

38. Chen P, Wiencke J, Aldape K, Kesler-Diaz A, Miike R, Kelsey K, Lee M, Liu J, Wrensch M. Association of an ERCC1 polymorphism with adult-onset glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9(8):843-7. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10952103.

39. Metzger R, Leichman CG, Danenberg KD, Danenberg PV, Lenz HJ, Hayashi K, Groshen S, Salonga D, Cohen H, Laine L, Crookes P, Silberman H, et al. ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 1998;16(1):309-16. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9440758.

40. Dabholkar M, Bradshaw L, Parker RJ, Gill I, Bostick-Bruton F, Muggia FM, Reed E. Cisplatin-DNA damage and repair in peripheral blood leukocytes in vivo and in vitro. *Environ Health Perspect* 1992;98:53-9. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1486863.

41. Lord RV, Brabender J, Gandara D, Alberola V, Camps C, Domine M, Cardenal F, Sanchez JM, Gumerlock PH, Taron M, Sanchez JJ, Danenberg KD, et al. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8(7):2286-91. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12114432.

42. Olausson KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, Andre F, Haddad V, Taranchon E, Filipits M, Pirker R, Popper HH, Stahel R, Sabatier L, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006;355(10):983-91. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16957145.

43. Altaha R, Liang X, Yu JJ, Reed E. Excision repair cross complementing-group 1: gene expression and platinum resistance. *Int J Mol Med* 2004;14(6):959-70. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15547660.

44. Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(12):1513-30. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12496039.

Tables

Targeted gene	ercc1	ercc2	mutyh	pnkp
1	AUC-CCG-UAC-UGA-AGU-UCG-U	GGA-CGU-CGA-UGG-GAA-AUG-C	GAA-GCA-UGC-UAA-GAA-CAA-C	CAC-ACU-GUA-UUU-GGU-CAA-U
2	GGA-GCU-GGC-UAA-GAU-GUG-U	AGA-CGG-UGC-UCA-GGA-UCA-A	UGG-GAU-GAU-UGC-UGA-GUG-U	AGA-GAC-CCG-CAC-ACC-AGA-A
3	CAA-GGC-CUA-UGA-GCA-GAA-A	UCA-UCA-UCG-AGC-CCU-UUG-A	GCA-CCC-UUG-UUU-CCC-AGC-A	GAA-UCU-UGU-ACC-CAG-AGA-U
4	ACA-GCU-CAU-CGC-CGC-AUC-A	GGA-ACA-AGC-UGC-UCU-UUA-U	GGU-UGU-CCA-CAC-CUU-CUC-U	AGU-CCA-CCU-UUC-UCA-AGA-A
5	AGA-GAA-GAU-CUG-GCC-UUA-U	UGA-CUU-UCU-UAC-CUU-CGA-U	GCU-GAC-AUA-UCA-AGU-AUA-U	CAA-CCG-GUU-UCG-AGA-GAU-G
Targeted gene	pold1	rad54L	lig1	mad2L2
1	GGA-GAU-GGA-GGC-AGA-ACA-C	CCA-GCA-UUG-UGA-AUA-GAU-G	AGA-CGC-UCA-GCA-GCU-UCU-U	GAA-GAA-UGA-UGU-GGA-GAA-A
2	GUU-GGA-GAU-UGA-CCA-UUA-U	UCA-CCU-CGC-UAA-AGA-AGC-U	GAA-GAU-AGA-CAU-CAU-CAA-A	GAC-UCG-CUG-UUG-UCU-CAU-G
3	UCA-CCG-GUU-ACA-ACA-UCC-A	GGA-GCU-GUU-UAU-CCU-GGA-U	AGA-CAG-CAG-AGG-CCA-GAA-A	CUC-GCA-ACA-UGG-AGA-AGA-U
4	CUU-AGA-CUC-CAC-CAG-CUG-C	UGA-UCU-GCU-UGA-GUA-UUU-C	GCA-GAC-GUU-CUG-CGA-GGU-U	GAA-GAU-CCA-GGU-CAU-CAA-G
5	AUU-CAG-AUG-GGA-UAC-CUC-C	GCA-GUG-AGA-CCC-AGA-UCC-A	GCA-GAU-CCA-GCC-AUU-CCA-A	UGA-GCA-GGA-UGU-CCA-CAU-G
Targeted gene	RUVBL2	MGC13170	GFP	Mgmt
1	AUC-UUC-UCC-CUG-GAG-AUG-A	CAA-GGA-CUU-GGC-UGC-UGA-G	GAC-GUA-AAC-GGC-CAC-AAG-UUC	AAG-CTG-GAG-CTG-TCT-GGT-TGT
2	ACU-GAC-CCU-CAA-GAC-CAC-A	GGA-GAA-GGU-GGA-UAA-GUG-G		AAG-GTT-GTG-AAA-TTC-GGA-GAA
3	ACG-CAA-GGG-UAC-AGA-AGU-G	GAA-GGU-GGA-UAA-GUG-GGC-U		

Table 1

Sequences of tested siRNA. siRNA responsible for a significant sensitization effect in subsequent experiments are highlighted.

DNA repair genes	DNA repair system	Reference	Location
ercc1	NER	NM_001983	19q13.2-3
lig1	NER	NM_000234	19q13.2-3
ercc2	NER	NM_000400	19q13.3
pold 1	NER and MMR	NM_002691	19q13.3
ruvbl2	Homologous Recombination	NM_006666	19q13.3
pnkp	BER	NM_007254	19q13.3-4
rad 54L	Homologous Recombination	NM_003579	1p32
mutyh	BER	NM_012222	1p34.3
mad2L2	ADN polymerase	NM_006341	1p36

Table 2

List of DNA repair-associated genes located on 1p/19q LOH regions
According to Wood et al, 2005

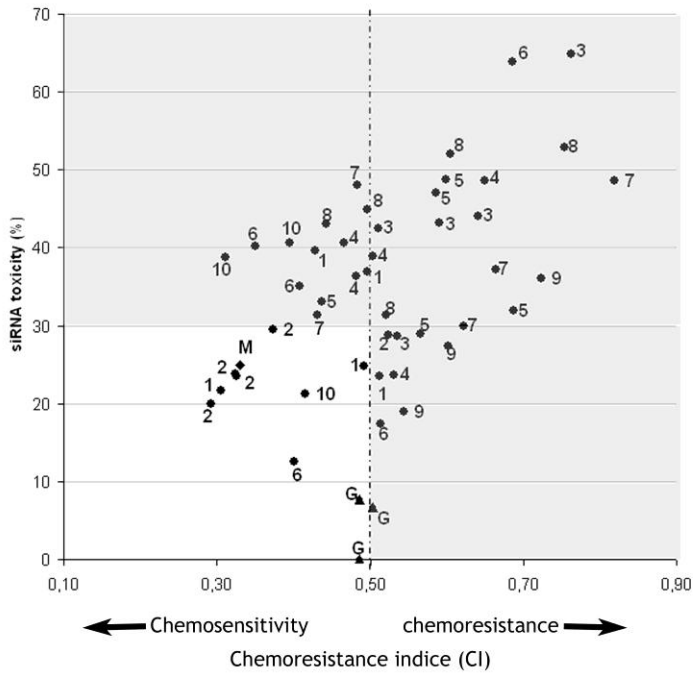


Figure 1

Screening of DNA-repair genes in GHD cells. Cells were transfected with siRNA 24h after seeding and treated with Cisplatin after 48h. Alive cell number was evaluated 96 hours post treatment with MTT. 1 : ercc1, 2 : ercc2, 3 : lig1, 4 : MGC1370, 5 : mutyh, 6 : pnkp, 7 : pold1, 8 : rad54L, 9 : Rev7(Mad2L2), 10 : ruvb12, G : GFP. CI is inferior to CIGFP (0.5 or 50%) when siRNA transfection improves chemo-sensitivity and superior to CIGFP (grey) when it increases chemo-resistance. White square corresponds to siRNA with low toxicity (< 35% cell death without cisplatin) and with chemo-sensitization properties.

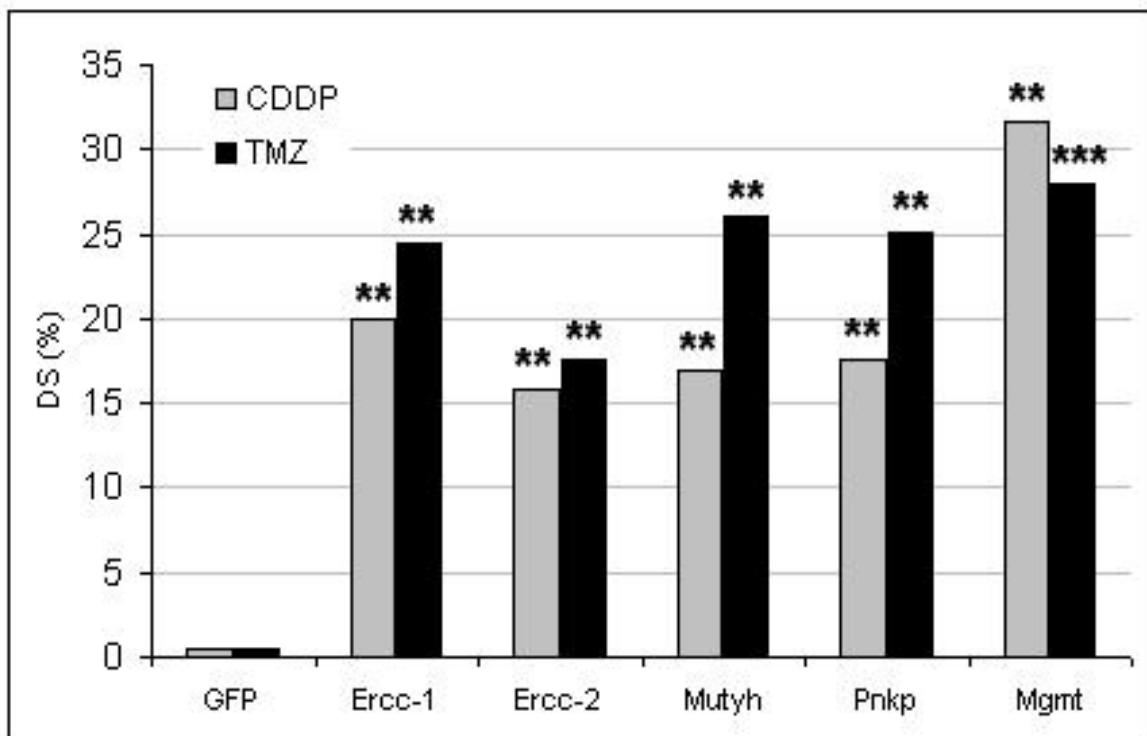


Figure 2

Drug sensitization by siRNAs. SiRNAs were transfected in U373 cell line treated with CDDP (grey) or temozolomide (black). DS corresponds to chemo-sensitivity induced by siRNA. Data represented the mean of 3 independent experiments. Only significant results were reported. Differences are very significant with $p < 0.01$ (**).

	quantified mRNA	Inhibition (%)	p (ANOVA)
GHD	ercc1	58,6	0,019
	ercc2	61,6	0,011
	mutyh	71,0	0,004
	pnkp	83,8	0,005
U373	ercc1	77,4	0,018
	ercc2	95,7	0,003
	mutyh	72,9	0,007
	pnkp	44,2	0,013
	mgmt	80,4	<0,0001

Table 3

Validation of siRNA-induced mRNA content down-regulation.

Mgmt, Ercc1, ercc2, mutyh and pnkp mRNA were quantified by qRT-PCR in cells transfected with corresponding siRNAs or control GFP siRNA. The mRNA content (%) decrease was significant in all cases.

IX. ANNEXE IX : POSTER RESULTATS CK2B

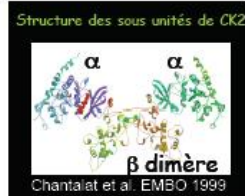


La sous-unité régulatrice de la protéine-kinase CK2: une cible thérapeutique en cancérologie?



Odile Filhol¹, Sandra Boccard², Laurent Pelletier², François Berger², Alexandra Metz¹, Alexandre Deshière¹, Peggy Charbonnier¹, Claude Cochet¹
 1 INSERM U873, TS, IRTSV, CEA Grenoble, 2 INSERM U318, CHU de Grenoble

INTRODUCTION



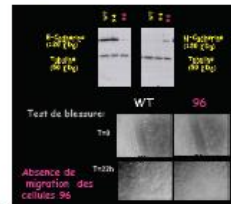
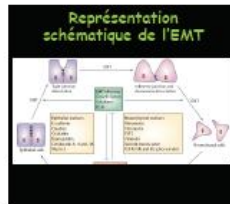
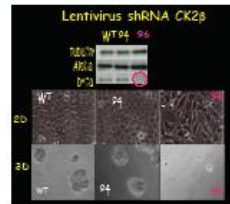
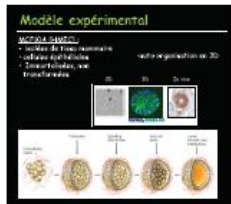
CK2 et Cancer

TISSUS	CK2 (positivité)	T (%)
NOIRIAUX	10,6 ± 5,9	
ESOPH	16,3 ± 3,2	1,6
CANCER	71 ± 21,9	8,9
HYPERPLASIE	77,7 ± 32,6	7,2

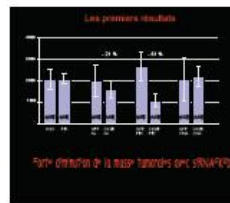
From: Hoshino
 Prolifération et survie des cellules tumorales

RESULTATS

In vitro:
Le Knock Down de CK2β dans les cellules épithéliales mammaires induit une Transition Epithélio-Mésenchymateuse (EMT)



In vivo:
Le Knock Down de CK2β dans les tumeurs gliales induit leur régression



Perspectives
 - Mise au point des modèles et protocoles
 - Etude pharmacocinétique et de la toxicité des shRNA
 - Quantité de shRNA, fréquence d'injection, combinaison thérapeutique
 - Objectifs de cellules pré-cliniquement associées à CK2β
 - Essais de thérapie ciblée in vivo
 - 2 modèles animaux, orthotopiques et métastatiques orthotopiques

