



HAL
open science

PHARMACOGENOMIQUE DES ANTICANCEREUX

Exemples de la Bléomycine et du Methotrexate

Nicolas Pottier

► **To cite this version:**

Nicolas Pottier. PHARMACOGENOMIQUE DES ANTICANCEREUX Exemples de la Bléomycine et du Methotrexate. Sciences du Vivant [q-bio]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2010. Français. NNT: . tel-00558979

HAL Id: tel-00558979

<https://theses.hal.science/tel-00558979>

Submitted on 24 Jan 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.

UNIVERSITE de LILLE 2 - DROIT ET SANTE
ECOLE DOCTORALE DE LILLE BIOLOGIE ET SANTE

Thèse pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Discipline : Sciences du médicament

présentée et soutenue publiquement le 29 septembre 2010 par

Nicolas POTTIER

Sujet de thèse

PHARMACOGENOMIQUE DES ANTICANCEREUX

Exemples de la Bléomycine et du Methotrexate

Membres du Jury

Rapporteurs	Mr le Professeur Didier Cataldo
	Mr le Docteur Patrick Auberger
Examineurs	Mr le Docteur Pascal Barbry
	Mr le Docteur Jean-Marc Lo-Guidice

Directeur de thèse

Mr le Docteur Bernard Mari
Mr le Pr Franck Boly

J'exprime tous mes remerciements à :

Monsieur le Professeur Didier Cataldo et Monsieur le Docteur Patrick Auberger qui ont accepté la charge d'être rapporteurs de ce travail,

Messieurs les Docteurs Pascal Barbry et Jean Marc Lo-Guidice qui ont accepté d'examiner ce travail et de faire partie du jury de cette thèse,

Monsieur le Docteur Bernard Mari et Monsieur le Professeur Franck Broly qui ont accepté de co-diriger cette thèse.

RESUME

La réponse aux médicaments est souvent variable d'un individu à l'autre en termes d'efficacité et de tolérance, ce qui rend parfois leur utilisation difficile. Etant donné que de nombreux médicaments, et notamment les médicaments anticancéreux, présentent une fenêtre thérapeutique étroite, il est particulièrement important de pouvoir prédire leurs effets.

Ces dernières années, l'étude des tissus cancéreux par rapport aux tissus sains à l'aide des techniques de génomique à haut débit a conduit à la description d'une multitude de variations à différents niveaux : génétique ou épigénétique, profils d'expression d'ARNm et voies de transduction du signal. De ce fait, un des challenges actuel de la recherche sur le cancer est basé sur l'utilisation de ces données afin d'identifier des biomarqueurs moléculaires permettant l'amélioration des méthodes actuelles de diagnostic, de pronostic ou de prédiction de la réponse au traitement. C'est dans ce cadre que s'inscrit la pharmacogénomique des anti-cancéreux dont le but est d'identifier l'origine génétique de la variabilité inter-individuelle de réponse aux médicaments afin de permettre un traitement adapté à chaque patient. L'étude du génome dans son ensemble a déjà permis une meilleure compréhension des processus biologiques impliqués dans les phénomènes de chimiorésistance ou dans la survenue d'effets indésirables.

Ce travail de thèse s'est basé sur l'étude des profils d'expression génique associés à la réponse à deux anti-cancéreux : la bléomycine et le methotrexate. Par cette approche, nous avons pu identifier des nouveaux marqueurs impliqués dans le développement de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine d'une part, et dans la résistance des leucémies lymphoblastiques aiguës au methotrexate d'autre part. Au final, l'ensemble de ce travail de thèse illustre parfaitement l'apport des nouvelles technologies à haut débit dans le domaine de la pharmacogénomique du cancer à travers le développement de nouveaux marqueurs moléculaires pour la prise en charge personnalisée des patients.

SOMMAIRE

PUBLICATIONS.....	1
LISTE DES ABREVIATIONS.....	2
INTRODUCTION GENERALE.....	3
1/ LES DNA MICROARRAY : UN OUTIL DE CHOIX DANS LA PHARMACOGENOMIQUE DES ANTICANCEREUX.....	5
A/ LES DNA MICROARRAY.....	8
B/ LE CONCEPT DES SIGNATURES GENIQUES.....	9
C/ METHODOLOGIES NECESSAIRES L'OBTENTION DES SIGNATURES GENIQUES.....	10
D/ SIGNATURES GENIQUES PREDICTIVES DE LA REPONSE AUX ANTICANCEREUX.....	12
2/ MODELES CELLULAIRES EN PHARMARCOGENOMIQUES DES ANTICANCEREUX..	15
A/ SIGNATURES GENIQUES PREDICITIVES DE LA REPONSE AUX ANTICANCEREUX A PARTIR DE MODELES CELLULAIRES : EXEMPLE DES LIGNEES CELLULAIRES NCI-60.....	17
B/ VOIE DE SIGNALISATION.....	18
C/ APPROCHE PAR GENETIQUE FONCTIONNELLE.....	20
OBJECTIFS DES TRAVAUX.....	22
1/ IDENTIFICATION DE NOUVEAUX MARQUEURS DE SUSCEPTIBILITE A LA FIBROSE PULMONAIRE INDUITE PAR LA BLEOMYCINE.....	23
2/ IDENTIFICATION D'UN PROFIL D'EXPRESSION ASSOCIE A LA REPONSE AU METHOTREXATE DANS LE TRAITEMENT DES LAL DE L'ENFANT.....	22
TRAVAUX PERSONNELS.....	25
DISCUSSION GENERALE.....	26
CONCLUSION GENERALE.....	27

PUBLICATIONS

1. Pottier N, Paugh SW, Ding C, Pei D, Yang W, Das S, Cook EH, Pui C-H, Relling MV, Cheek MH, Evans WE. **Promoter polymorphisms in the beta-2 adrenergic receptor are associated with drug-induced gene expression changes and response in acute lymphoblastic leukaemia.** *Soumis*.
2. Leclerc J, Tournel G, Courcot-Ngoubo Ngangue E, Pottier N, Lafitte JJ, Jaillard S, Mensier E, Lhermitte M, Broly F, Lo-Guidice JM. **Profiling gene expression of whole cytochrome P450 superfamily in human bronchial and peripheral lung tissues: Differential expression in non-small cell lung cancers.** *Biochimie*. 2010. 92(3):292-306.
3. Pottier N*, Maurin T*, Chevalier B, Puisségur MP, Lebrigand K, Robbe-Sermesant K, Bertero T, Lino Cardenas C, Courcot E, Rios G, Fourre S, Lo-Guidice JM, Marcet B, Cardinaud B, Barbry P, Mari B. **Identification of Keratinocyte Growth Factor as a Target of microRNA-155 in Lung Fibroblasts: Implication in Epithelial-Mesenchymal Interactions.** *PLoS One*. 2009. 24;4(8):e6718
*co-premier auteur
4. Cheek M, Pottier N, Kager L, Evans WE. **Pharmacogenetics in ALL.** *Seminar and hematology*. 2009. 46(1):39-51.
5. Pottier N, Yang W, Assem M, Panetta JC, Pei D, Paugh SW, Cheng C, Den Boer ML, Relling MV, Pieters R, Evans WE, Cheek MH. **The SWI/SNF Chromatin-Remodeling Complex and Glucocorticoid Resistance in Acute Lymphoblastic Leukemia.** *J. Natl Cancer Inst*. 2008. 100(24):1792-803.
6. Pottier N, Cheek M, Kager L. **Antileukemic drug effects in childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2008. 1(3):401-413

7. Sorich MJ*, Pottier N*, Pei D, Yang W, Kager L, Stocco G, Cheng C, Panetta JC, Pui CH, Relling MV, Cheek MH, Evans WE. **In vivo response to methotrexate forecasts outcome of acute lymphoblastic leukemia and has a distinct gene expression profile.** *PLoS Med.* 2008. 15;5(4):e83.
*co-premier auteur
8. Pottier N*, Cheek MH*, Yang W, Assem M, Tracey L, Obenauer JC, Panetta JC, Relling MV, Evans WE. **Expression of SMARCB1 modulates steroid sensitivity in human lymphoblastoid cells: identification of a promoter SNP that alters PARP1 binding and SMARCB1 expression.** *Hum Mol Genet.* 2007. 1;16(19):2261-71.
*co-premier auteur
9. Pottier N, Chupin C, Defamie V, Cardinaud B, Sutherland R, Rios G, Gauthier F, Wolters PJ, Berthiaume Y, Barbry P, Mari B. **Relationships between early inflammatory response to bleomycin and sensitivity to lung fibrosis: a role for dipeptidyl-peptidase I and tissue inhibitor of metalloproteinase-3?** *Am J Respir Crit Care Med.* 2007. 1;176(11):1098-107
10. Cauffiez C, Pottier N, Tournel G, Lo-Guidice JM, Allorge D, Chevalier D, Migot-Nabias F, Kenani A, Broly F. **CYP2A13 genetic polymorphism in French Caucasian, Gabonese and Tunisian populations.** *Xenobiotica.* 2005. 35(7):661-9.
11. Cauffiez C, Klinzig F, Rat E, Tournel G, Allorge D, Chevalier D, Pottier N, Lovecchio T, Colombel JF, Lhermitte M, Lo-Guidice JM, Broly F. **Human CYP4F12 genetic polymorphism: identification and functional characterization of seven variant allozymes.** *Biochem Pharmacol.* 2004. 15;68(12):2417-25.

12. Cauffiez C, Klinzig F, Rat E, Tournel G, Allorge D, Chevalier D, Lovecchio T, Pottier N, Colombel JF, Lhermitte M, D'Halluin JC, Broly F, Lo-Guidice JM. **Functional characterization of genetic polymorphisms identified in the human cytochrome P450 4F12 (CYP4F12) promoter region.** *Biochem Pharmacol.* 2004. 15;67(12):2231-8.

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADAM	A disintegrin and metalloproteinase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
BCL3	B cell leukemia/lymphoma 3
CDC20	cell division cycle 20
CENPF	Centromere protein F
CTPS	CTP synthase
DHF	Dihydrofolate
DHFR	Dihydrofolate reductase
DPPI	Dipeptidyl peptidase I
FAIM3	Fas apoptotic inhibitory molecule 3
FDA	Food and Drug Administration
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
H2AFX	H2A histone family, member X
LAL	Leucémie aiguë lymphoblastique
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
MMP	Métalloprotéinase de la matrice extracellulaire
MTT	Methyl Thiazolyl Tetrazolium
MTX	Methotrexate
MTXPG	Methotrexate polyglutamate
NFkB	Nuclear Factor kappa B
PBS	Phosphate buffer saline
POLD3	Polymerase (DNA-directed) delta 3
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
RAS	Rat sarcoma
RFC	Reduced folate carrier
RNASEH2A	Ribonuclease H2, subunit A
RPA3	Replication protein A3
RRM1	Ribonucleotide reductase M1
TACE	TNF alpha converting enzyme
TGF	Transforming growth factor
THF	Tetrahydrofolate
TIMP	Tissue inhibitor of matrix metalloprotease
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1
TYMS	Thymidylate Synthase

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

La réponse à un médicament, définie par un bénéfice thérapeutique, une absence d'efficacité ou la survenue d'effets indésirables, est dans la plupart des cas imprévisible. Il est maintenant établi que des différences génétiques entre les individus conditionnent en partie leur réponse aux traitements, et de nombreuses études ont pu relier les différences de réponse au traitement à des variations génétiques au niveau de gènes codant, par exemple, pour des protéines impliquées dans le métabolisme, le transport des médicaments ainsi que leurs cibles. Jusqu'à présent, les résultats les plus probants ont été obtenus pour les médicaments anticancéreux. En effet, ces dix dernières années ont été marquées par des avancées majeures dans la caractérisation moléculaire des tumeurs humaines à l'aide de technologies à haut débit. Ceci a permis d'identifier de multiples variations au niveau chromosomique, chromatinien ou dans la séquence des acides nucléiques. Parmi ces variations, on distingue soit des anomalies irréversibles dans la structure et la séquence du DNA ainsi que dans le nombre de copies de séquences nucléiques particulières, de gènes ou de chromosomes, soit des anomalies réversibles comme des modifications épigénétiques du DNA et/ou des histones. L'ensemble de ces variations a pour conséquence la dérégulation de centaines voire de milliers de gènes contrôlant l'activation ou l'inhibition de différents processus biologiques impliqués dans la physiopathologie du cancer comme la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'angiogénèse ou la formation des métastases (Hanahan and Weinberg, 2000) (Figure 1).

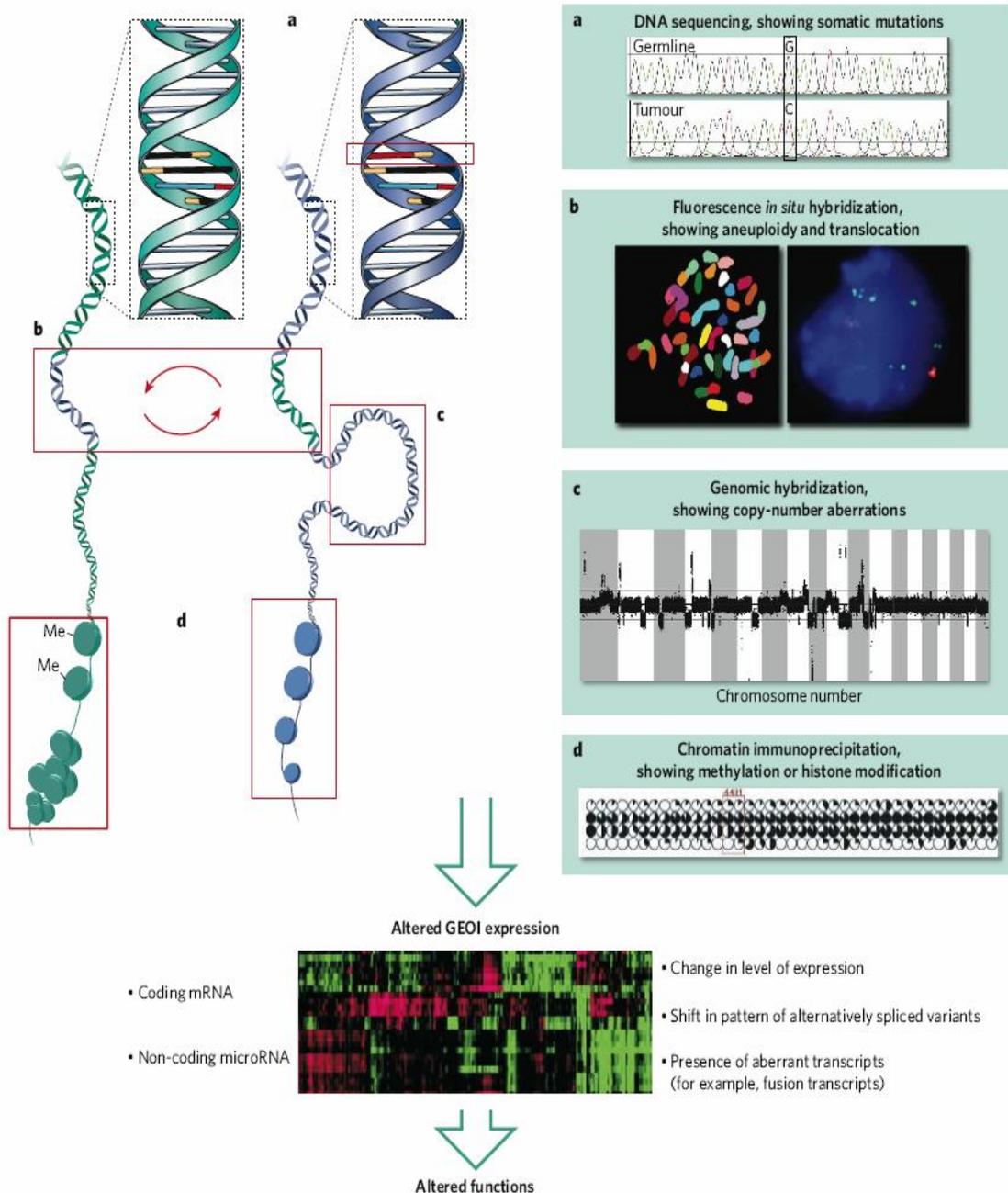


Figure 1. Anomalies génétiques et épigénétiques des cellules cancéreuses. Dans cette figure, sont représentées les principales anomalies génétiques et épigénétiques retrouvées dans les cellules tumorales ainsi que les principales méthodes de détection pouvant être utilisés (d'après Chin et Gray, 2008). a) variations dans la séquence de l'ADN mises en évidence par séquençage direct. b) anomalies de structure des chromosomes mises en évidence par hybridation *in situ*. c) variations dans le nombre de copies d'un gène pouvant être détectées par CGH (comparative genomic hybridization). d) Anomalie de méthylation de l'ADN et changement de structure chromatinienne mise en évidence par immunoprécipitation chromatinienne suivi d'une analyse par microarray des produits immunoprécipités.

L'ensemble de ces variations pouvant aboutir à une altération dans l'expression des gènes, la création de protéines de fusion, une altération dans le splicing des transcripts primaires ou des modifications dans la fonction d'un ou plusieurs gènes.

L'étude de l'ensemble de ces variations génétiques présente de nombreux intérêts cliniques et constitue la base des projets de recherche en génomique à travers, notamment, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques, l'identification de biomarqueurs moléculaires permettant l'amélioration des méthodes nécessaires au diagnostic, à la prédiction de la réponse thérapeutique ou du pronostic.

La transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse résulte de l'accumulation d'altérations génétiques modifiant l'activité de gènes bien spécifiques impliqués dans le contrôle de la prolifération, de la différenciation, de la sénescence cellulaire, de la réparation de l'ADN, ou de l'apoptose. Du point de vue génétique, les cellules tumorales sont particulièrement complexes puisqu'en plus des variations génétiques constitutionnelles s'ajoutent des anomalies génétiques acquises (somatiques) pouvant varier d'un patient à l'autre. Ceci permet d'expliquer les larges variations inter-individuelles dans la réponse aux agents anticancéreux (Van't Veer and Bernards, 2008d). De ce fait, l'emploi de biomarqueurs pouvant prédire par exemple la réponse aux traitements est particulièrement intéressant pour éviter l'administration d'un anticancéreux qui se révélerait non seulement inefficace mais pourrait également entraîner de sérieux effets indésirables comme une cardiotoxicité, une neutropénie, une neurotoxicité ou pneumotoxicité. C'est dans ce contexte qu'est apparue le concept de la pharmacogénomique dont le but est d'identifier l'origine génétique de la variabilité inter-individuelle de réponse aux médicaments afin d'identifier par exemple les patients répondeurs aux traitements de ceux qui n'en bénéficieront pas et qui développeront éventuellement des effets secondaires sévères. En conséquence, la thérapie dans le cadre des traitements anticancéreux a commencé à évoluer ces dernières années vers une approche plus personnalisée

dans laquelle chaque patient est traité en fonction de certains caractères génétiques de leur tumeur. Un des meilleurs exemples pour illustrer ce concept est celui du cancer du sein. En effet, des « meta-analyses » ont montré que parmi les femmes jeunes atteintes d'un cancer du sein de stade précoce (sans envahissement ganglionnaire) et bénéficiant d'une prise en charge par chirurgie et par radiation, seules 20-30% présentent un risque de rechute. Cependant, aux Etats-Unis, 85-95% des femmes souffrant de ce type de cancer sont traitées par une chimiothérapie adjuvante car il n'est pas possible d'identifier précisément les patientes à risque de rechute par les méthodes histopathologiques conventionnelles. De ce fait, 55 à 75% des patientes atteintes d'un cancer du sein de stade précoce reçoivent un traitement sans bénéfice mais en subissent inutilement les effets secondaires (van, V et al., 2002). L'apport de nouveaux biomarqueurs permettant d'identifier avec précision les patientes ayant vraiment besoin d'une chimiothérapie paraît dans ce cas particulièrement pertinent comme nous le verrons par la suite.

GENERALITES

La réponse aux agents anticancéreux est souvent variable d'un individu à l'autre en termes d'efficacité et de tolérance, ce qui rend parfois leur utilisation difficile. De ce fait, il est particulièrement important de pouvoir prédire leurs effets. Les techniques de génomique à haut débit ont conduit à la description d'une multitude de variations aux niveaux génétique et épigénétique, au niveau des profils d'expression génique ainsi qu'au niveau des voies de transduction du signal. De ce fait, un des challenges actuel de la recherche sur le cancer est basé sur l'utilisation de ces données afin d'identifier des biomarqueurs moléculaires permettant l'amélioration des méthodes actuelles de diagnostic, de pronostic ou de prédiction de la réponse au traitement. C'est dans ce cadre que s'inscrit la pharmacogénomique des anti-cancéreux dont le but est d'identifier l'origine génétique de la variabilité inter-individuelle de réponse aux médicaments afin de permettre un traitement adapté à chaque patient.

Dans ce chapitre, après un rappel sur la technologie des puces à ADN et les méthodologies nécessaires à l'obtention de signatures géniques, nous détaillerons à travers plusieurs exemples le potentiel de ce type d'approche dans la pharmacogénomique des anticancéreux.

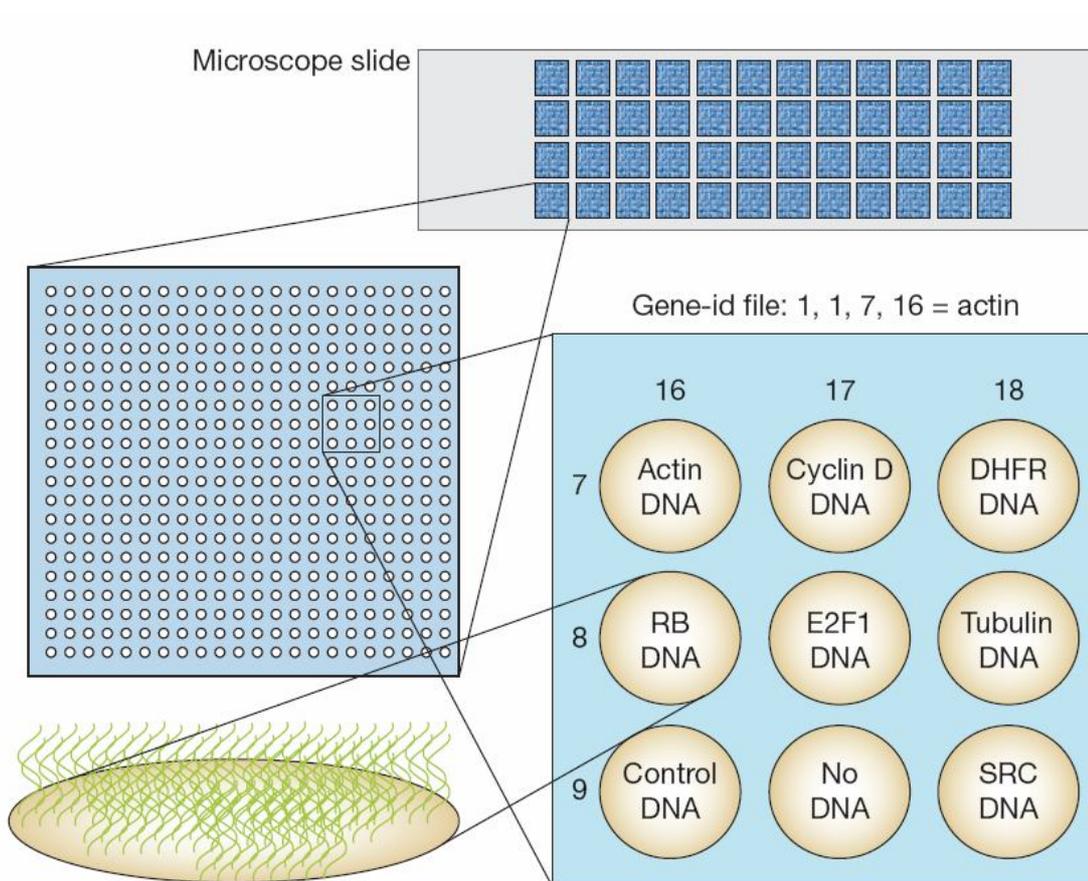
1/ Les puces à ADN: un outil de choix en pharmacogénomique

A/ Les puces à ADN (Figure 2)

Les puces à ADN ou DNA microarrays ont été développées au début des années 1990 et permettent de mesurer simultanément et quantitativement l'expression de plusieurs milliers de gènes à partir d'un support solide de taille réduite (quelques

cm²). Le principe de fonctionnement des DNA-microarrays repose sur l'hybridation spécifique de deux séquences complémentaires d'acides nucléiques. Plusieurs milliers de séquences d'ADN (ADN complémentaire (ADNc) ou oligonucléotides de synthèse), sont immobilisés sur une surface solide et les acides nucléiques à étudier, préalablement marqués à l'aide d'un fluorochrome, sont hybridés sur ce support. La puce est ensuite scannée et un logiciel de traitement génère, à partir de ces signaux, une image de synthèse où chaque unité est représentée par des pixels dont l'intensité est fonction de la quantité d'acide nucléique retenue par chaque séquence d'oligonucléotides.

A



B

Type of array	Number of array spots	Target	Manufacturer	Year introduced	Usage
Nylon/nitrocellulose—cDNA ^a	500–5,000	cDNA clones	NA	1996	Almost out of use
Glass—cDNA	50–40,000	cDNA clones	NA	1996	Rapidly decreasing
Glass/quartz—oligonucleotide	6,000	20mer oligonucleotides	Affymetrix	1998	Almost out of use
	22,000–45,000	25mer oligonucleotides	Affymetrix	2000–2001	Increasing
	22,000–44,000	60mer oligonucleotides	Agilent	2004	Increasing
Exon array	1 million exons	123mer oligonucleotides (median)	Affymetrix	2005	Increasing
BeadArray	50,000	50mer oligonucleotides	Illumina	2005	Increasing

^aAlthough nylon membranes provide some advantages, such as flexibility, low cost and possibility of striping and rehybridizations, their use has almost disappeared. Abbreviations: cDNA, complementary DNA; NA, not applicable.

Figure 2. Principe des DNA microarrays (d'après Abdullah-Sayani et al, 2006). (A) Représentation schématique. Plusieurs milliers de spots, contenant un grand nombre de fragments d'ADN identiques et spécifiques d'un gène donné, sont immobilisés sur une surface solide. (B) Evolution de la technologie des DNA microarrays.

B/Le concept des signatures géniques

Une signature génique est une simple représentation d'un état biologique donné par l'intermédiaire de la mesure de l'expression d'un ensemble de gènes propre à cet état biologique. De ce fait, tout processus biologique comme la réponse à un stress cellulaire ou la prolifération cellulaire est caractérisé par des changements spécifiques dans l'expression des gènes. Les signatures géniques présentent l'avantage d'être sensibles et dans certains cas transposable à partir d'un système *in vitro* aux tissus lésés.

C/ Méthodologie pour l'obtention de signatures géniques (Figure 3)

L'obtention de ces signatures géniques peut s'effectuer suivant trois approches :

- La première consiste, à partir de données d'expression du génome dans son ensemble (genome wide approach), à identifier une signature génique associée à une caractéristique cellulaire ou tissulaire d'intérêt. L'intérêt majeur de cette approche est d'être non biaisée puisqu'il n'y a pas d'hypothèse préalable quant aux gènes à étudier.

- La deuxième consiste, à partir des données de la littérature scientifique, à sélectionner des gènes d'intérêt répertoriés comme importants pour le caractère étudié. Etant donné que cette approche concerne un nombre limité de gènes, la technique de PCR en temps réel est particulièrement adaptée dans ce cas. Ce type d'approche est également fréquemment utilisé pour l'analyse d'ARN obtenu à partir de tissus tumoraux fixés à la formaline et inclus en paraffine car ces ARN ne sont pas le plus souvent d'assez bonne qualité pour permettre l'étude de l'expression du génome dans son ensemble via la technique des DNA-microarrays. L'inconvénient majeur de cette approche est l'exclusion de gènes dont la fonction n'est pas encore connue et potentiellement important pour le caractère étudié.
- La troisième approche consiste à extrapoler les données transcriptionnelles obtenues sur des modèles expérimentaux (cellulaires...) pour prédire la réponse des tissus pathologiques à certains stimuli spécifiques, comme la réponse des cellules tumorales aux anti-cancéreux. Cette approche présente certains inconvénients car l'utilisation de modèles expérimentaux reflète imparfaitement, dans certains cas, le comportement des tissus humains.

Le traitement des données générées nécessite par la suite l'utilisation de deux types d'analyse :

- Le premier type d'analyse consiste à regrouper les échantillons présentant un profil d'expression similaire : c'est la classification non supervisée. Ce type d'analyse a, par exemple, permis d'identifier deux nouvelles entités pronostiques parmi les lymphomes B diffus à grandes cellules. Chaque entité est associée à une étape distincte de la différenciation des lymphocytes B : la

première entité (regroupant environ 50 % des patients) présente une signature d'expression proche de celle des lymphocytes B normaux issus d'un centre germinatif normal et la deuxième entité (30 % des patients) révèle une signature d'expression proche de celle des lymphocytes B du sang circulant, activés par un anticorps anti-IgM (A.A. Alizadeh, M.B. Eisen, R.E. Davis; nature 2000).

- Le second type d'analyse des données consiste à diviser les échantillons en différents groupes, en fonction des données cliniques (exemple : réponse à l'anticancéreux versus absence de réponse ou rechute versus absence de rechute) puis de rechercher les gènes permettant de correctement identifier les individus au sein de ces groupes. Une première cohorte (training set) d'individus est utilisée pour identifier la signature génique permettant de correctement classer les individus puis une seconde cohorte indépendante d'individus (validation set) est utilisée pour tester la performance de la signature génique: c'est la classification supervisée. C'est par ce type d'approche que Holleman et al. ont pu identifier un profil d'expression de 124 gènes associés à la résistance des cellules leucémiques aux quatre agents anticancéreux principaux utilisés dans le traitement d'induction des leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant (prednisolone, vincristine, asparaginase et daunorubicine).

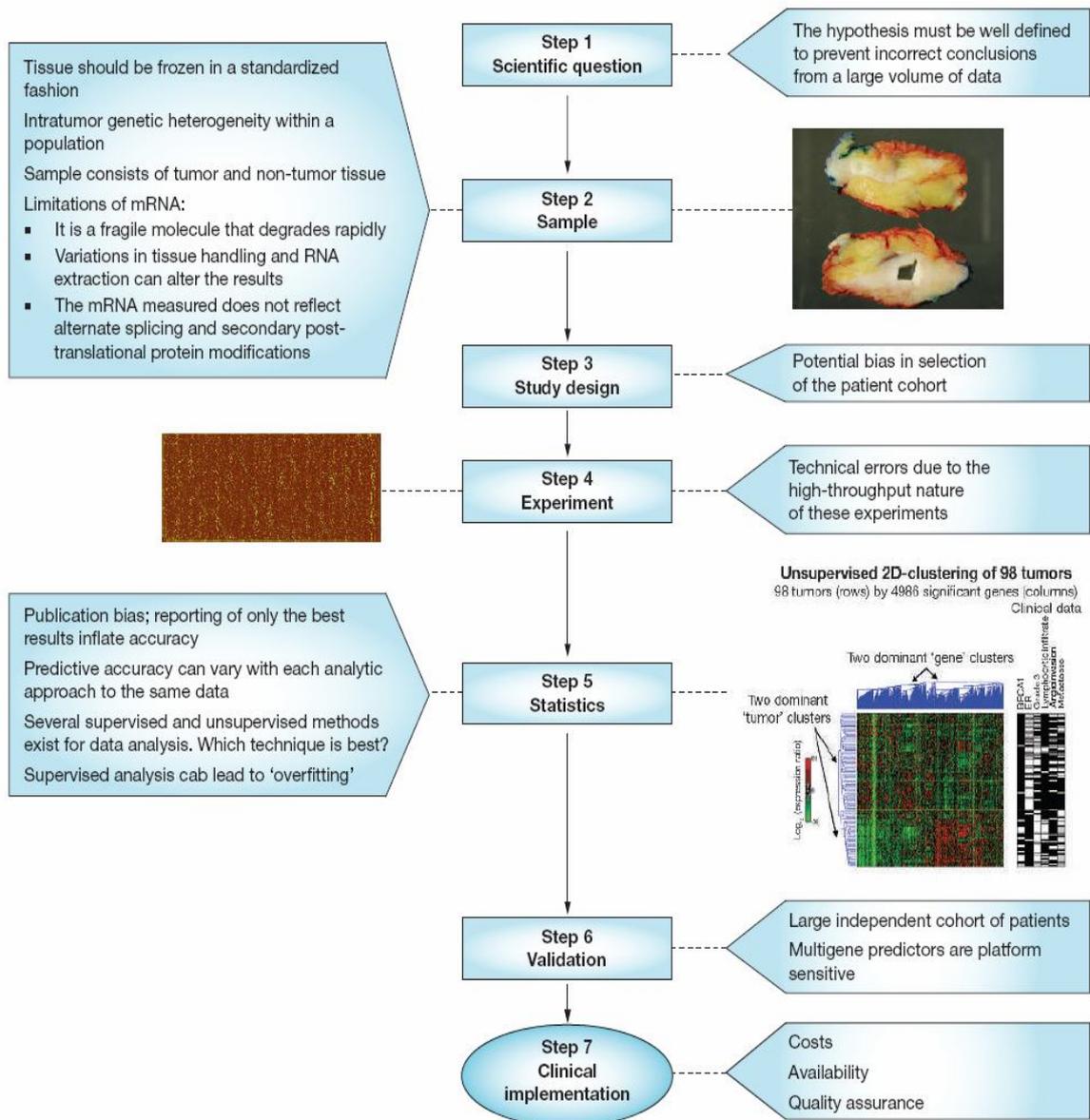


Figure 3. Les différentes étapes clés nécessaires à la réalisation d'une analyse par DNA microarrays (d'après Abdullah-Sayani et al, 2006).

D/Signatures géniques prédictives de la réponse aux traitements anticancéreux

Contrairement aux signatures géniques à visée pronostique, il existe encore peu de signatures géniques permettant de prédire la réponse aux traitements anticancéreux. En effet, l'identification d'une signature génique associée à la réponse à un traitement n'est pas possible dans le cadre de thérapie adjuvante (cas où la thérapie adjuvante est sans effet du fait d'une tumeur associée à un bon pronostic) (Van't

Veer and Bernards, 2008c). De même, les patients atteints de cancers métastatiques reçoivent souvent l'administration de polychimiothérapie rendant de ce fait impossible l'identification de signature génique associée à un médicament donné (Van't Veer and Bernards, 2008b).

Une solution possible est de rechercher des signatures prédictives de réponse lors de chimiothérapie néoadjuvante où les patients reçoivent un traitement systématique avant intervention chirurgicale pour retirer la tumeur. La réponse à court terme à un traitement anticancéreux peut être déterminée dans ce cas par les technologies d'imagerie (Van't Veer and Bernards, 2008a). De nombreux essais cliniques utilisant ce type d'approche sont en cours comme l'essai I-SPY (<http://tr.nci.nih.gov/iSpy>) qui consiste, à partir d'une cohorte de patientes ayant un cancer du sein de stade III, à identifier des marqueurs moléculaires associées à la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante objectivée par IRM, ou encore l'essai I-SPY 2 qui consiste à évaluer, chez des patientes atteints de cancer du sein, l'efficacité de nouveaux agents anticancéreux en combinaison avec les traitements standards sur la base des caractéristiques moléculaires de la tumeur.

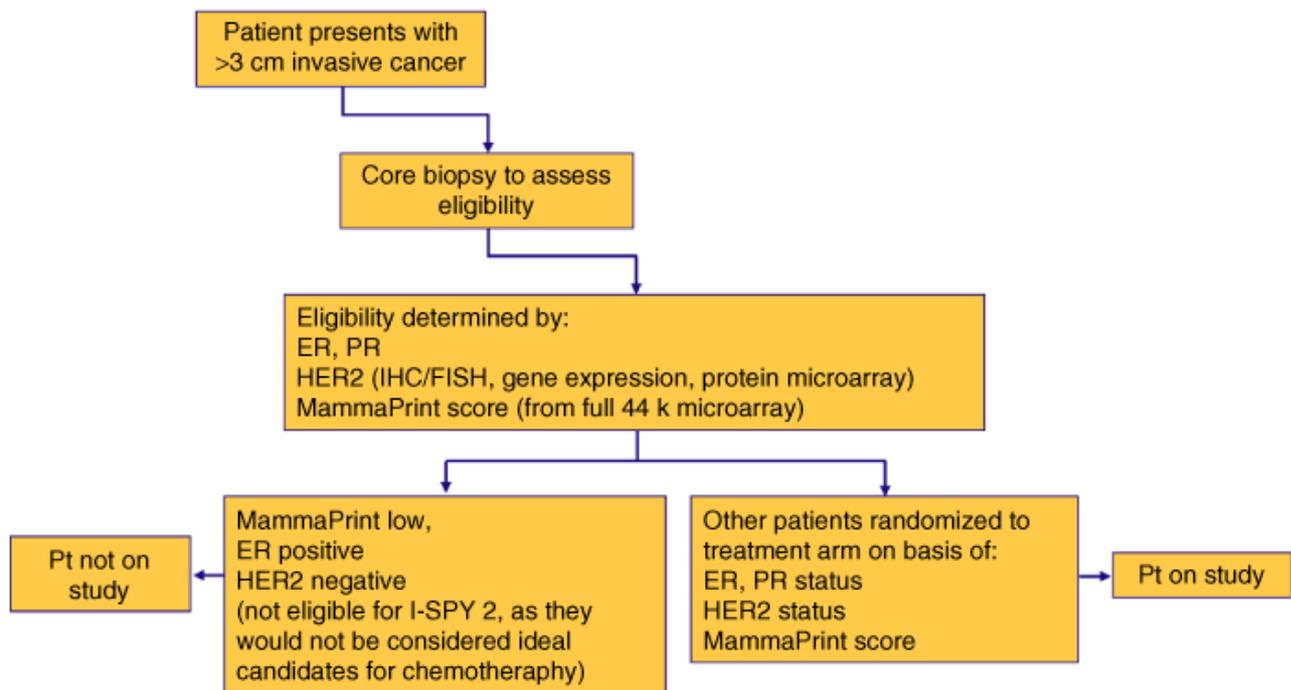


Figure 4. Critères d'inclusion de l'essai I-SPY 2 (d'après Baker et al, 2009). ER, de l'oestrogène; FISH, fluorescence in situ hybridization; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; IHC, immunohistochimie; PR, récepteur de la progestérone; Pt, patient.

E/ Signatures géniques prédictives de la survenue d'effets indésirables

Certaines études ont pu établir des signatures géniques associées à des effets indésirables graves comme la survenue de cancer secondaire à la chimiothérapie. Par exemple, le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques nécessite, entre autre, l'utilisation d'inhibiteur de la topoisomérase II et de certains agents alkylants, deux classes de médicament à risque pour le développement de cancers secondaires. En conséquence, 1 à 10% des patients traités à l'aide de ces molécules développent secondairement des leucémies aiguës myéloïdes ou un syndrome myélodysplasique (Neglia JP et al., 2001 ; Smith MA et al., 1996). Récemment, une étude a identifié une signature génique, à partir de cellules leucémiques obtenues au diagnostic, permettant d'identifier les patients à risque de développer ce type de cancer chimioinduit (Bogni et al., 2006).

Par ailleurs, la radiothérapie est utilisée chez environ 60% des patients atteints d'un cancer et 5 à 10% d'entre eux présentent la survenue d'effets indésirables sévères. En se basant sur la réponse transcriptionnelle après irradiation de lymphocytes B immortalisés issus de patients ayant présenté une toxicité aiguë lors de radiothérapie, une équipe de chercheur a identifié une signature génique prédictive de ce type de toxicité (Krieger et al., 2004).

2/ Les modèles cellulaires en pharmacogénomique des anticancéreux

Pour contourner les problèmes précédemment cités (cas des polychiomiothérapies etc...), une voie de recherche s'est orientée vers l'utilisation de modèles cellulaires. A partir de tels modèles, il est possible de générer des profils d'expression et d'identifier des gènes ou des voies métaboliques (« pathways ») caractéristiques de la réponse des cellules à un médicament donné. Ces résultats *in vitro* peuvent par la suite être validés sur des échantillons issus de patients.

A/ Signatures géniques prédictives de la réponse aux traitements à partir de modèles cellulaires (Figure 5a): exemple des lignées cellulaires NCI-60.

Les NCI-60 représentent un set de 59 lignées cellulaires tumorales humaines d'origine histologique variée. La réponse de ces cellules à plus de 100 000 agents chimiques et chimiothérapeutiques a été caractérisée ainsi que leur profil d'expression (Scherf et al., 2000; Ross et al., 2000). De ce fait, plusieurs études se sont attachées à identifier des profils d'expression associés à la réponse à ces agents antitumoraux *in vitro* et récemment, Potti et al. ont montré que ces données

d'expression générées *in vitro* pour le docétaxel pouvaient prédire la réponse clinique du docétaxel dans le cancer du sein (Potti et al., 2006).

A partir de modèles cellulaires, il est également possible de constituer des bases de données contenant les profils d'expression caractéristiques de la réponse de lignées cellulaires à une série de petites molécules chimiques incluant des composés approuvés par la FDA. Il est ensuite possible d'interroger la base de données pour identifier des similitudes avec un profil d'expression d'intérêt (connectivity map initiée par Golub) (Figure 6). Cette approche est particulièrement intéressante car elle est uniquement basée sur l'identité des gènes ce qui permet d'éviter les problèmes relatifs aux différences inter-plateformes dans la mesure des données d'expression. Par cette approche, il a récemment été montré que la signature de réponse à la rapamycine présentait des similarités avec celle de cellules primaires de leucémie aiguë lymphoblastique sensible à la prednisolone. Ceci a permis de montrer que la rapamycine augmente la sensibilité des blastes aux glucocorticoïdes (Wei et al., 2006a).

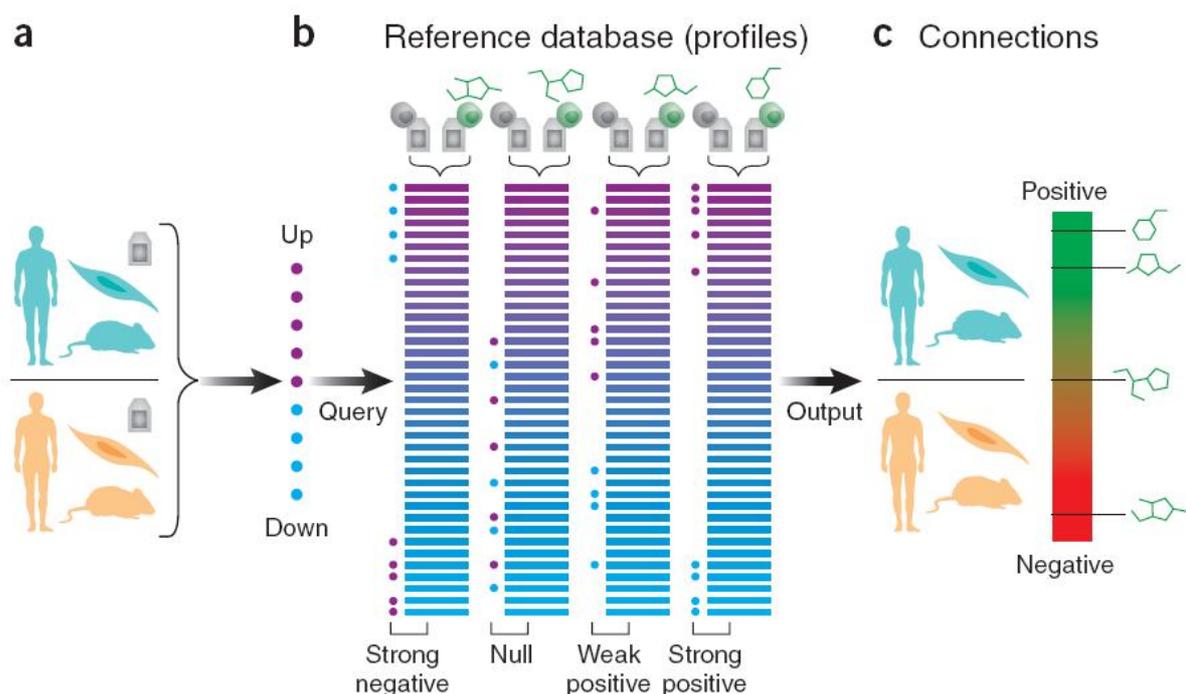


Figure 6. Connectivity map. a) Identification d'une signature génique associée au phénotype d'intérêt. b) Interrogation de la base de données par comparaison de la signature génique identifiée aux signatures de référence spécifique d'une molécule approuvée par la FDA. c) Résultat : Identification de molécules d'intérêts associée au phénotype étudié.

B/ Signatures géniques associées à l'activation de voies de signalisation (Figure 5b)

Différentes équipes de chercheurs ont pu montrer que l'activation de certaines voies de signalisation induit des changements caractéristiques dans l'expression des gènes. Il a ainsi pu être établi expérimentalement à partir de lignées cellulaires, différentes signatures correspondant à l'activation de « pathways » fréquemment dérégulés dans les cellules tumorales tel que RAS, SRC, MYC et E2F. Ces signatures, trouvées *in vitro*, ont pu être corrélées au pronostic des patients atteints de cancers du poumon, de l'ovaire et du sein ainsi qu'à la réponse *in vitro* à différents agents anticancéreux ciblant des protéines impliquées dans ces pathways (Bild et al., 2006). Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques ciblées sur les patients dont les tumeurs présentent une dérégulation de certains « pathways » biologiques.

C/ Approche par génétique fonctionnelle (Figure 5c)

Cette approche consiste à effectuer à partir de lignées cellulaires un criblage génétique permettant l'identification de gènes ou de « pathways » associés à la réponse à un agent anticancéreux. Une fois les gènes candidats identifiés, il est ensuite possible de mesurer leur expression dans les tumeurs issues de patients et de corrélérer leur niveau d'expression à la réponse *in vivo* aux anticancéreux.

Cette approche a notamment permis d'améliorer les connaissances des mécanismes à l'origine des différences de réponse au trastuzumab, un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur HER2, dans le cancer du sein (Berns et al., 2007a). En effet, le trastuzumab est utilisé dans le traitement du cancer du sein exprimant le récepteur HER2. Cependant, seulement 35% environ des patientes atteintes de cancer du sein métastatique et exprimant HER2 répondent au trastuzumab et les causes de cet échec thérapeutique sont largement inconnues. Pour mieux comprendre ces phénomènes de résistance, une étude a récemment utilisé une approche d'ARN interférence pour identifier des gènes impliqués dans la résistance au trastuzumab (Berns et al., 2007b). Sur 8000 gènes testés, seule la perte de fonction du gène suppresseur de tumeur PTEN a été reliée à la résistance au trastuzumab dans un modèle cellulaire. Les signatures géniques correspondant à la perte de fonction de PTEN dans le cancer du sein existent et pourraient de ce fait être utilisées pour prédire la réponse au trastuzumab.

3/ Signatures géniques et pratique clinique

Le transfert des résultats de génomique obtenus en recherche vers la pratique clinique a souvent été frustrant par le passé. En effet, malgré la fiabilité et la reproductibilité des puces à ADN (projet « Microarray Quality Control » (MAQC) (Shi et al., 2006), la plupart des biomarqueurs initialement identifiés lors d'études rétrospectives n'ont pas été validés par la suite dans des études prospectives indépendantes. De plus, d'une étude à l'autre, les signatures géniques associées à un même phénotype sont le plus souvent très différentes (Ein-Dor et al., 2006). Cette faible concordance entre les études peut en partie s'expliquer par des

différences méthodologiques à de multiples niveaux : l'hétérogénéité entre les populations étudiées (âge, stade tumoral...), les traitements systémiques administrés, la taille de la population, les plates-formes de puces à ADN utilisées, les sets de gènes testés, les erreurs d'annotation des sondes, les méthodes d'hybridations, de pré-traitement et surtout d'analyse des données (critères de jugement, seuils statistiques différents...). Par ailleurs, la complexité et l'hétérogénéité moléculaire des cancers sont des facteurs supplémentaires de variations. En effet, pour aboutir à un même effet biologique, ce ne sont pas toujours les mêmes gènes qui sont impliqués, mais parfois des gènes différents appartenant à une même voie de signalisation (Ein-Dor et al., 2005).

D'un point de vue législatif, la FDA a récemment exprimé son intention de réguler ces tests moléculaires de manière identique à la régulation des agents anticancéreux. En septembre 2006, la FDA a édité un premier document relatif à l'utilisation de ces tests moléculaires appelé « an *in vitro* diagnostic multivariate index assay » puis une deuxième version de ce document est apparue en juillet 2007 suite aux commentaires de la communauté médicale et industrielle (<http://www.fda.gov/cdrh/oivd/guidance/1610.pdf>). Cette démarche de la FDA devrait ainsi faciliter l'acceptation de ces tests en pratique clinique. Enfin, la FDA a récemment lancé la phase 2 du projet MAQC qui consiste à établir un consensus concernant le *design* et l'analyse statistique nécessaire au développement et la validation de modèles prédictifs basées sur l'expression des gènes obtenue à partir de la technologie des puces a ADN.

Enfin, concernant l'application clinique des signatures, la FDA a déjà approuvé l'utilisation de deux signatures sous la forme des tests MammaPrint® et Oncotype DX™. Mais pour atteindre un niveau de preuve suffisant et optimal quant à leur utilité réelle, ces signatures sont actuellement testées dans deux essais cliniques prospectifs: MINDACT (<http://www.breastinternationalgroup.org/TRANSBIG/MINDACT>) et TAILORx (www.cancer.gov/clinicaltrials/digestpage/TAILORx). Le test Oncotype DX™ permettrait d'affiner la stratification du risque de rechutes locales et métastatiques des patientes ne présentant pas d'envahissement ganglionnaire, exprimant le récepteur à l'oestrogène et recevant du tamoxifène en adjuvant. A partir de ce test, un score de rechute est calculé et trois niveaux de risque sont définis : risque faible, risque intermédiaire et risque élevé de rechute. Le test MammaPrint® permettrait de classer les patientes sans atteinte ganglionnaire, dont la taille de la tumeur est inférieure ou égale à 5 cm (stade I ou II) et âgées de moins de 61 ans, à haut risque et bas risque de rechute.

OBJECTIFS DES TRAVAUX

OBJECTIFS DES TRAVAUX

Ces dernières années, en cancérologie, la recherche s'est orientée vers l'identification de biomarqueurs moléculaires de susceptibilité aux cancers, de détection précoce, de pronostic ou de prédiction de la réponse aux traitements. Dans ce domaine de recherche, l'utilisation des profils d'expression génique occupe une place prépondérante.

Ce travail de thèse a eu pour objectif d'identifier des profils d'expression génique associés à la réponse aux médicaments anticancéreux. En particulier, nous nous sommes intéressés à deux agents anticancéreux : la bléomycine pour l'identification de biomarqueurs de toxicité dans le cadre de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine à l'aide d'un modèle animal, et le methotrexate, pour l'identification de biomarqueurs d'efficacité dans le cadre des leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant à partir d'une cohorte de patients.

Par cette approche, nous avons pu identifier des nouveaux marqueurs impliqués dans la réponse des leucémies lymphoblastiques aiguës au methotrexate d'une part, et dans le développement de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine d'autre part.

TRAVAUX PERSONNELS

1/ Identification d'un profil d'expression associé à la réponse au methotrexate dans le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant.

Le methotrexate (MTX) est un agent anti-cancéreux majeur, couramment utilisé dans le traitement de certains cancers comme les ostéosarcomes ou le cancer du sein. Dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL), bien que la dose optimale soit toujours controversée, le MTX est utilisé à haute dose dans la plupart des protocoles thérapeutiques au cours du traitement de consolidation et de prophylaxie de l'atteinte du système nerveux central, et à dose conventionnelle lors du traitement de maintenance.

Le MTX est transporté à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire du reduced folate carrier (RFC) alors que l'efflux de cette molécule hors de la cellule est médiée par certains transporteurs de type ATP binding cassette (Chen et al., 2002; Zeng et al., 2001; Hooijberg et al., 1999). Le MTX est un inhibiteur de l'enzyme dihydrofolate réductase (DHFR), empêchant la synthèse de tétrahydrofolate (THF) à partir du dihydrofolate (DHF), interférant ainsi avec le métabolisme cellulaire des folates (Uga et al., 2006). Au niveau intracellulaire, le MTX est métabolisé sous forme de polyglutamates (MTXPG) par la polyglutamyl synthase (McGuire et al., 1980). Par rapport aux formes monoglutamates, les formes polyglutamates sont retenues plus longtemps dans la cellule car leur efflux est moins efficace (Chabner et al., 1985b; Banerjee et al., 2002b). Les MTXPGs inhibent également d'autres enzymes

cellules primaires obtenues au diagnostic et provenant d'une cohorte de 161 patients atteint de LAL.

2/ identification de nouveaux marqueurs de susceptibilité à la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine

La bléomycine est un antibiotique cytotoxique découvert par Umezawa et al. en 1965 et isolé à partir du *Streptomyces verticillus* (Umezawa, 1965). La bléomycine exerce son activité cytotoxique en induisant à la fois des cassures simple brin et double brin au niveau de l'ADN. Pour entraîner une altération de l'ADN, la bléomycine nécessite la présence d'oxygène et de métaux qui se comportent comme des cofacteurs. Le complexe Fe^{2+} -bléomycine se lie à l'oxygène puis à l'ADN, entraînant la formation de radicaux libres et des cassures de l'ADN (Hecht, 2000) (figure 7).

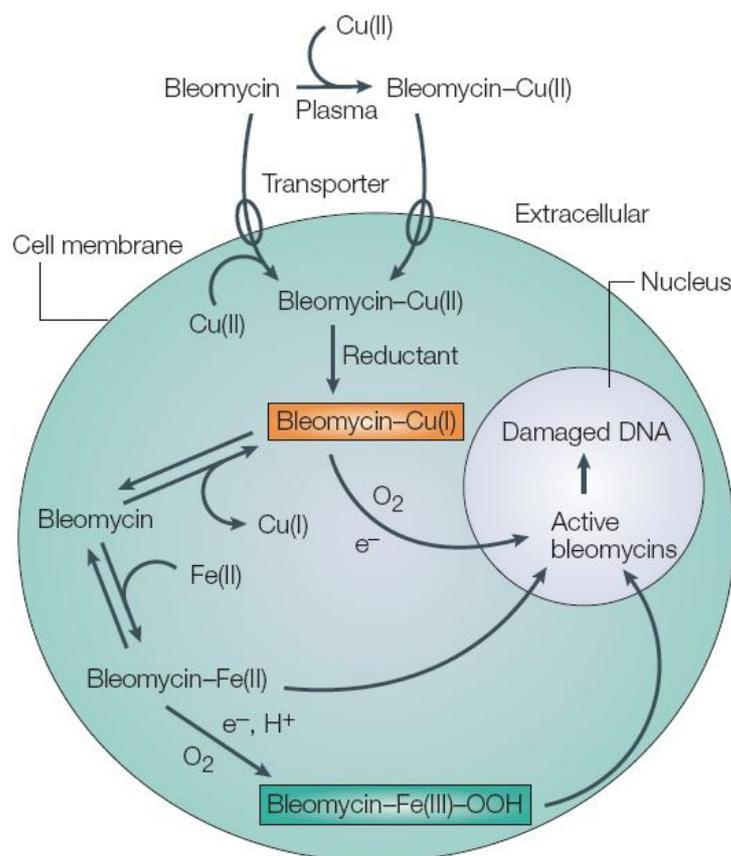


Figure 7. Métabolisme de la bléomycine (d'après Chen et Stubbe, 2006).

La bléomycine est un anticancéreux largement utilisé, seul ou en association avec d'autres molécules pour le traitement de certains cancers (lymphomes, carcinomes

testiculaires, carcinomes des cellules squameuses ...). Contrairement à la plupart des autres antitumoraux, la bléomycine présente une faible toxicité hépatique, rénale et médullaire. Cependant, son utilisation est limitée par sa toxicité pulmonaire puisqu'elle induit en particulier une fibrose pulmonaire potentiellement mortelle (Chen and Stubbe, 2005). A ce titre, la bléomycine est également l'outil expérimental de choix pour induire une fibrose pulmonaire sur différents modèles animaux (Chua et al., 2005; Raisfeld, 1980). Ainsi, les souris de souche C57BL/6 sont considérées comme sensibles à la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine alors que les souches BALB/c sont résistantes (Harrison, Jr. and Lazo, 1987). A partir de ce modèle, de très nombreuses études ont cherché à identifier les facteurs à l'origine de cette différence de réponse et de nombreux processus biologiques faisant intervenir le système immunitaire, les mécanismes de réparation de l'ADN ou l'inflammation ont été suggérés (Haston and Travis, 1997; Haston et al., 2002; Cavarra et al., 2004).

Afin de mieux comprendre les processus moléculaires impliqués dans la toxicité pulmonaire de la bléomycine, différentes études ont analysé avec succès, par la technique des DNA-microarrays, les variations d'expression géniques en réponse à l'exposition à cette molécule (Kaminski et al., 2000; Katsuma et al., 2001; Zuo et al., 2002) et permis l'identification de nouveaux gènes candidats.

Notre projet a consisté à identifier d'autres nouveaux marqueurs de susceptibilité à la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine en comparant les profils d'expression génique entre souches sensible et résistante en dehors de tout traitement à la bléomycine.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Ces dix dernières années, grâce aux progrès réalisés en biologie moléculaire, la recherche en pharmacogénomique a considérablement évolué à travers l'émergence croissante des approches permettant d'évaluer le génome dans son ensemble par rapport aux approches conventionnelles par gènes candidats. Les différents travaux présentés dans cette thèse illustrent parfaitement ces nouveaux concepts. En effet, l'identification de nouvelles signatures géniques basées sur les niveaux d'expression des gènes m'a permis de mettre en évidence de nouveaux marqueurs associés à la réponse à deux anti-cancéreux : la bléomycine et le methotrexate.

1/Bléomycine

La technologie des puces à ADN a déjà été appliquée avec succès dans l'identification de gènes de susceptibilité à diverses pathologies (Ogden et al., 2004; Diosdado et al., 2004). Dans l'étude de la fibrose pulmonaire, l'utilisation de cette technologie a déjà permis, à travers plusieurs études, une meilleure compréhension des processus biologiques à l'origine du développement de la fibrose pulmonaire chez la souris en réponse à l'administration de bléomycine (Kaminski et al., 2000; Zuo et al., 2002 ; Katsuma et al., 2001). Cependant aucune étude ne s'était encore attachée à évaluer si des différences d'expression à l'état basal entre souches de souris sensibles et résistantes à la bléomycine permettait d'identifier de nouveaux gènes candidats. Dans notre étude, les résultats de l'analyse transcriptome ont révélé, parmi un panel de gènes exprimés différemment dans le poumon des deux souches de souris, l'identification de deux gènes potentiellement importants dans la susceptibilité à la fibrose pulmonaire : TIMP-3 (Tissue inhibitor of matrix

metalloprotease-3) et la cathepsine C, respectivement deux fois moins exprimé et 16 fois plus exprimé chez la souche sensible (C57bl/6) à la bléomycine par rapport à la souche résistante (Balb/C).

Afin d'expliquer la susceptibilité génétique à la fibrose pulmonaire, plusieurs études d'analyse de liaison génétique ont permis de mettre en évidence un certain nombre de loci associés à cette maladie (Haston et al., 2002a; Haston et al., 2002b; Barth et al., 2002). Cependant, ni TIMP-3, ni la cathepsine C ne sont situés sur les différents loci identifiés à ce jour. Une des explications rendant compte de ces différents résultats viendrait de l'utilisation de souches de souris différentes entre les différentes études.

Le TNF apparaît comme une cytokine clé dans la genèse de la fibrose pulmonaire (Miyazaki et al., 1995). TACE (TNF alpha converting enzyme) permet la conversion du proTNF alpha en TNF alpha et récemment, Mohammed et al. (2004) ont montré que TIMP-3, en inhibant TACE, était crucial dans le contrôle de l'inflammation. Dans ce contexte, il est apparu important d'étudier la réponse inflammatoire induite par la bléomycine chez la souche sensible, les résultats de microarray ayant montré chez celle-ci un déficit en TIMP-3 au niveau ARNm. Nous n'avons pas pu confirmer au niveau protéique les niveaux d'expression de TIMP-3 par Western Blot. En effet, cette protéine, localisée dans la matrice extracellulaire, est difficilement détectable dans les lysats pulmonaires. Cependant, nos résultats montrent l'apparition précoce d'un syndrome inflammatoire uniquement chez la souche sensible avec augmentation de l'activité TACE, des taux d'IL-6, TNF alpha, MCP-1 ainsi qu'une diminution d'IL-10. Le déficit en TIMP-3 chez la souche sensible pourrait donc

conduire à un défaut dans le contrôle de la réponse inflammatoire qui favoriserait ainsi le développement de la fibrose pulmonaire.

De nombreuses études ont montré que l'apoptose des cellules épithéliales pulmonaires participait au remodelage du poumon et à l'initiation du processus fibrotique (Uhal, 2003). La bléomycine, en se complexant à des ions fer et des molécules d'oxygène entre les paires de bases de l'ADN, induit des cassures simples et double brins de la double hélice d'ADN (Chandler, 1990; Jules-Elyse, 1990). Ces cassures peuvent soit induire directement l'apoptose, soit stimuler l'activation d'endonucléases qui peuvent entraîner la mort cellulaire programmée (Ortiz et al., 1998). Des travaux antérieurs ont démontré que les lésions de l'ADN induites par la bléomycine étaient comparables entre les deux souches de souris (Harrison et al., 1989). Ce qui suggère que la différence d'apoptose observée entre les deux souches n'est pas due à un effet direct de la bléomycine (Ortiz et al., 1998). Comme le TNF alpha est capable d'induire le phénomène de mort cellulaire programmée (Aggarwal, 2003), on peut raisonnablement penser que la plus forte sécrétion de TNF alpha chez la souche sensible après injection de bléomycine rend compte de la plus forte apoptose observée chez celle-ci. Cette hypothèse est renforcée par une plus grande activité caspase 8 chez la souche sensible associée à l'absence de différence significative d'activité caspase 9 entre les deux souches de souris. En effet, l'activation de la caspase 8 est médiée par la fixation du TNF alpha sur le récepteur TNFR1 (Aggarwal, 2003) alors que l'activation de la caspase 9 est médiée lors de lésions à l'ADN via le relargage de cytochrome c par la mitochondrie (Kim, 2005). Cependant, le TNF alpha peut aussi induire la survie cellulaire via l'activation de NFkB (Aggarwal, 2003). La présence d'IL-6 dans le liquide de Lavage Broncho-Alvéolaire (LBA) des souris sensibles suggère fortement l'activation de NFkB par le

TNF alpha et donc des voies de survie cellulaire (Yamada et al., 1997). Il est possible qu'au début, l'augmentation de TNF alpha active les voies de survie cellulaire puis, à cause du défaut d'inhibition de TACE lié au déficit en TIMP-3, la production accrue de TNF alpha conduite à l'apoptose des cellules épithéliales pulmonaires.

Les métalloprotéinases (MMPs), enzymes régulant le remodelage de la matrice extracellulaire, jouent un rôle fondamental dans le développement de la fibrose pulmonaire (Corbel et al., 2001 ; Corbel et al., 2002). La gélatinase-A (MMP-2) et la gélatinase-B (MMP-9) sont deux MMPs impliquées dans la fibrose pulmonaire mais leur rôle est encore mal défini (Corbel et al., 2001). La MMP-9 est relarguée par les cellules inflammatoires alors que la MMP-2 est synthétisée par les cellules endothéliales, les cellules épithéliales et les fibroblastes (Corbel et al., 2002). Les lysats pulmonaires montrent, 24 heures après l'administration de bléomycine, une induction et une activation importante de la gélatinase B à 92 kD, et une activation de la MMP-2 chez la souche sensible, alors que chez la souche résistante, cet effet est nettement moins visible. Le TNF alpha étant capable d'induire la transcription de la pro-MMP9 (Zhang et al., 1998) ainsi que l'activation de la pro-MMP-2 en MMP-2 via la MT1-MMP (Han et al., 2001), on peut penser que cette différence de réponse à la bléomycine entre les deux souches est également due au TNF alpha. Ce dernier jouerait donc également un rôle central dans le remodelage pulmonaire, via la régulation de différentes MMPs.

La cathepsine C (DPPI) est une protéase à cystéine principalement sécrétée par les macrophages alvéolaires (Wolters et al., 2000). Chez les souris DPPI $-/-$, des études ont montré l'importance de la cathepsine C dans l'activation de trois enzymes spécifiques du polynucléaire neutrophile : la cathepsine G, l'élastase neutrophilaire et

la protéinase 3 (Adkison et al., 2002). Dans notre étude, en dehors de tout traitement, une surexpression des taux d'ARNm de DPPI chez la souche sensible par rapport à la souche résistante a été observée. Nous avons pu également mettre en évidence une plus forte activité enzymatique de l'élastase neutrophilaire et de la cathepsine G chez la souche sensible. Les macrophages alvéolaires de la souche sensible semblent donc présenter une plus grande quantité de cathepsine C dans leur granule permettant, après activation par la bléomycine, la sécrétion d'une plus grande quantité de cathepsine C. Ces niveaux d'expression différents seraient à l'origine d'une activation supérieure des trois protéases à sérine du polynucléaire neutrophile. La cathepsine C, via l'activation de ces trois protéases à sérine, pourrait de ce fait participer au développement de la fibrose pulmonaire. En effet, Li et al (2002) ont récemment établi l'importance des polynucléaires neutrophiles dans ce processus. Comme les deux types de souris présentent un afflux de polynucléaires neutrophiles dans les alvéoles suite à l'administration de bléomycine (données antérieures du laboratoire), on peut donc penser que les polynucléaires neutrophiles jouent un rôle fondamental dans l'induction de la fibrose notamment par le biais des protéases à sérine. Plusieurs études ont déjà montré le rôle de l'élastase neutrophilaire dans ce processus (Mitsubishi et al., 1996; Dunsmore et al., 2001) mais les rôles de la protéinase 3 et de la cathepsine G restent à évaluer. De plus, ces protéases à serine (notamment la protéinase 3) pourraient amplifier le syndrome inflammatoire en augmentant la production de TNF alpha et d'IL-1 beta (Coeshott et al., 1999) et augmenter l'apoptose des cellules épithéliales pulmonaires (Yang et al., 2001).

Cependant, les résultats obtenus sur la souris DPPI -/- ne nous ont pas permis de confirmer nos hypothèses. En effet, les souris de type C57/Bl 6 déficientes en DPPI,

après administration de bléomycine, n'ont présenté aucune différence significative au niveau de la mortalité ou dans la formation de l'œdème pulmonaire. De ce fait, il est possible qu'une inhibition complète de l'activité DPPI renforce les effets délétères de la bléomycine. En effet, nos résultats ont montré une activité DPPI significative chez les souris de type BalB/C après administration de bléomycine. A l'inverse, il est également possible qu'une activité DPPI excessive puisse conduire à l'activation de molécules impliquées dans le développement de la fibrose pulmonaire.

En conclusion, ce travail de recherche décrit pour la première fois les mécanismes moléculaires précoces à l'origine du développement de la fibrose pulmonaire. Ce travail a également permis l'identification de deux nouveaux gènes candidats pouvant être impliqués dans le développement de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine. Une nouvelle étude serait souhaitable afin de valider ces résultats chez l'homme.

2/Methotrexate

Dans les leucémies aiguës lymphoblastiques, l'étude de l'expression des gènes par la technique des DNA microarrays a déjà permis de nombreuses avancées telle qu'une meilleure compréhension des processus biologiques à l'origine de la leucémogénèse ou l'identification de nouveaux facteurs pronostiques.

Dans ce travail de recherche, nous avons utilisé ce type d'approche dans le but de mieux comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de la chimiorésistance *de novo* au methotrexate. La réponse au methotrexate a été évaluée *in vivo* chez les patients enrôlés dans les protocoles total XIII et total XV

Nos résultats ont permis d'identifier 48 gènes et 2 clones cDNAs dont l'expression est significativement associée à la réduction du nombre de cellules circulantes après un traitement initial au MTX à forte dose. Parmi ces gènes, certains sont impliqués dans le métabolisme des nucléotides (*TYMS* et *CTPS*), la prolifération cellulaire et l'apoptose (*BCL3*, *CDC20*, *CENPF* et *FAIM3*), ou la réplication et la réparation de l'ADN (*POLD3*, *RPA3*, *RNASEH2A*, *RRM1*, et *H2AFX*). Les effets cytotoxiques du methotrexate impliquant l'inhibition de la synthèse des bases puriques et pyrimidiques, nos résultats suggèrent que des variations interindividuelles dans la synthèse des nucléotides influencent la réponse *in vivo* à cet agent.

Par ailleurs, nos résultats montrent également une association significative entre des niveaux d'expression bas de *DHFR*, *TYMS* et *CTPS*, et une mauvaise réponse au methotrexate. Ces gènes étant fortement impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire et la synthèse de l'ADN, nos résultats suggèrent que les faibles niveaux d'expression de ces gènes sont le reflet d'une plus faible proportion de cellules leucémiques en phase S du cycle cellulaire. Le methotrexate étant un agent anti-cancéreux phase S dépendant, il paraît tout à fait probable que les patients ayant une plus faible proportion de cellules leucémiques en phase S ont une moins bonne réponse au methotrexate. Nous avons pu confirmer cette hypothèse en montrant une forte corrélation entre ces 3 gènes et le pourcentage de cellules en phase S ainsi que la réponse *in vivo* au methotrexate. Ce résultat n'est pas en contradiction avec d'autres études ayant montré qu'une plus forte expression de *TYMS* était associée avec un mauvais pronostic. En effet, dans ces études, l'augmentation des niveaux d'expression de *TYMS* a pour origine un polymorphisme génétique au niveau du promoteur n'ayant aucune influence sur la prolifération cellulaire.

Par ailleurs, nos données montrent également qu'un mauvais pronostic est associé aux patients ayant des cellules leucémiques peu proliférantes. Ceci est en concordance avec une étude précédente ayant mis en évidence *in vitro* une relation entre des faibles taux de prolifération et une résistance à plusieurs anticancéreux (Kaaijk et al., 2003). Dans notre étude, nous avons trouvé une association significative entre le profil d'expression associé à la réponse *in vivo* au methotrexate et le pronostic des patients à haut risque. Ceci pourrait s'expliquer par un plus fort potentiel des cellules leucémiques de ces patients à acquérir des mutations durant le traitement (plus forte instabilité génétique des cellules leucémiques) ou par des cellules leucémiques présentant une résistance intrinsèque au methotrexate.

Les autres gènes connus comme participant au métabolisme des folates n'ont pas été associée à la signature génique identifiée. Ceci suggère que ces gènes pourraient être moins importants dans la résistance *de novo* au methotrexate. Il est également possible que la fonction de ces gènes soit plus prépondérante dans les phénomènes de résistance acquise au methotrexate. Une dernière explication possible pourrait provenir d'une absence de corrélation entre les niveaux d'ARNm et les niveaux protéiques de ces gènes.

Enfin, parmi les 50 gènes dont l'expression permet de discriminer les patients sur la base de leur réponse au methotrexate, 29 sont surexprimés chez les bons répondeurs. De ce fait, des approches visant à inhiber ou à diminuer spécifiquement l'expression de ces gènes, à l'aide par exemple de petites molécules chimiques, pourraient permettre d'augmenter la réponse au methotrexate. Une telle approche a déjà été appliquée avec succès. A titre d'exemple, des cellules leucémiques résistantes à la prednisolone ont été sensibilisées par traitement à la rapamycine (Wei et al., 2006b). De même, des stratégies visant à augmenter spécifiquement

l'expression de gènes sous exprimés chez les mauvais répondeurs pourrait être développée pour moduler la réponse au methotrexate.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

L'apparition d'une résistance aux thérapies anticancéreuses ou la survenue d'effets indésirables grave est un obstacle majeur dans le traitement des pathologies néoplasiques. De ce fait, il est donc extrêmement important de développer de nouvelles méthodes diagnostiques pour permettre l'identification de patients non répondeurs aux traitements conventionnels ou à risque de développer des effets indésirables et dans ce cas proposer l'alternative thérapeutique la plus efficace. Les recherches menées dans le domaine de la pharmacogénomique des anticancéreux présentent non seulement un intérêt purement médical, mais aussi économique. En effet, l'identification des patients non répondeurs ou à risque de développer des effets indésirables à un traitement anti-cancéreux devrait permettre de mieux maîtriser les coûts en terme de Santé Publique, en évitant la prescription de traitements longs, coûteux, voire inutile ou dangereux pour un certain nombre de patients. Les variations de réponse aux médicaments d'origine génétique sont désormais reconnues comme un problème médical et de santé publique majeur notamment aux Etats Unis à travers l'adoption du « Genomics and Personalized Medicine Act » par le congrès américain et des mesures prises par la FDA, afin d'intégrer la pharmacogénomique dans le développement d'un médicament ou en pratique clinique.

A ce jour, la simple approche « gène candidat » consistant à identifier, au niveau d'un gène donné, des polymorphismes génétiques influençant significativement la réponse au traitement, n'a aboutit qu'à un nombre très restreint d'applications cliniques. La réponse au traitement étant très probablement dans la majorité des cas

multigénique, les approches de type « genomewide » à travers l'identification de signature génique apparaissent particulièrement pertinente. Cependant, il existe encore de nombreuses limitations à ce type d'approche en clinique comme des résultats non transposables d'une plateforme à l'autre ou la possibilité d'identifier plusieurs signatures associées à un même phénotype. De ce fait, il est particulièrement important de tester la robustesse des signatures géniques en validant les résultats sur de larges cohortes indépendantes.

Enfin, il est fort probable que dans les années à venir, la recherche s'orientera vers l'utilisation de nouvelles signatures basées par exemple sur l'expression des microRNAs ou sur des anomalies de structure des gènes (variations du nombre de copies etc...). En théorie, il est en effet possible d'incorporer ces différentes informations en un modèle combiné qui aurait une meilleure valeur prédictive. Dans cette optique, les nouvelles technologies de séquençage à haut débit apparaissent particulièrement séduisantes car elles offrent de nombreux avantages comme la détection quantitative des ARNm, des transcrits rares, des microARNs et des transcrits alternatifs ainsi que des informations sur la séquence nucléotidiques des transcrits.

En conclusion, la génomique fonctionnelle a incontestablement amélioré notre compréhension de la biologie du cancer. D'un point de vue clinique, l'utilisation de signatures géniques pour prédire la réponse au traitement paraît particulièrement intéressante. Cependant, même si certains profils géniques sont déjà approuvés par la FDA, l'utilisation de ces données comme outil clinique nécessite auparavant une validation prospective sur de large population. Ce type d'étude constitue une étape essentielle vers une prise en charge personnalisée des traitements anticancéreux.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Reference List

Banerjee,D., Mayer-Kuckuk,P., Capiiaux,G., Budak-Alpdogan,T., Gorlick,R., and Bertino,J.R. (2002b). Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase. *Biochim. Biophys. Acta 1587*, 164-173.

Banerjee,D., Mayer-Kuckuk,P., Capiiaux,G., Budak-Alpdogan,T., Gorlick,R., and Bertino,J.R. (2002a). Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase. *Biochim. Biophys. Acta 1587*, 164-173.

Berns,K., Horlings,H.M., Hennessy,B.T., Madiredjo,M., Hijmans,E.M., Beelen,K., Linn,S.C., Gonzalez-Angulo,A.M., Stemke-Hale,K., Hauptmann,M., Beijersbergen,R.L., Mills,G.B., van,d., V, and Bernardis,R. (2007a). A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell 12*, 395-402.

Berns,K., Horlings,H.M., Hennessy,B.T., Madiredjo,M., Hijmans,E.M., Beelen,K., Linn,S.C., Gonzalez-Angulo,A.M., Stemke-Hale,K., Hauptmann,M., Beijersbergen,R.L., Mills,G.B., van,d., V, and Bernardis,R. (2007b). A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell 12*, 395-402.

Bild,A.H., Potti,A., and Nevins,J.R. (2006). Linking oncogenic pathways with therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer 6*, 735-741.

Cavarra,E., Carraro,F., Fineschi,S., Naldini,A., Bartalesi,B., Pucci,A., and Lungarella,G. (2004). Early response to bleomycin is characterized by different cytokine and cytokine receptor profiles in lungs. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol 287*, L1186-L1192.

Chabner,B.A., Allegra,C.J., Curt,G.A., Clendeninn,N.J., Baram,J., Koizumi,S., Drake,J.C., and Jolivet,J. (1985a). Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *J. Clin. Invest 76*, 907-912.

Chabner,B.A., Allegra,C.J., Curt,G.A., Clendeninn,N.J., Baram,J., Koizumi,S., Drake,J.C., and Jolivet,J. (1985b). Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *J. Clin. Invest 76*, 907-912.

Chen,J. and Stubbe,J. (2005). Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat. Rev. Cancer 5*, 102-112.

Chen,Z.S., Lee,K., Walther,S., Raftogianis,R.B., Kuwano,M., Zeng,H., and Kruh,G.D. (2002). Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Res. 62*, 3144-3150.

Chua,F., Gauldie,J., and Laurent,G.J. (2005). Pulmonary fibrosis: searching for model answers. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 33*, 9-13.

- Hanahan,D. and Weinberg,R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Harrison,J.H., Jr. and Lazo,J.S. (1987). High dose continuous infusion of bleomycin in mice: a new model for drug-induced pulmonary fibrosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 243, 1185-1194.
- Haston,C.K. and Travis,E.L. (1997). Murine susceptibility to radiation-induced pulmonary fibrosis is influenced by a genetic factor implicated in susceptibility to bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Cancer Res.* 57, 5286-5291.
- Haston,C.K., Wang,M., Dejournett,R.E., Zhou,X., Ni,D., Gu,X., King,T.M., Weil,M.M., Newman,R.A., Amos,C.I., and Travis,E.L. (2002). Bleomycin hydrolase and a genetic locus within the MHC affect risk for pulmonary fibrosis in mice. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1855-1863.
- Hecht,S.M. (2000). Bleomycin: new perspectives on the mechanism of action. *J. Nat. Prod.* 63, 158-168.
- Hooijberg,J.H., Broxterman,H.J., Kool,M., Assaraf,Y.G., Peters,G.J., Noordhuis,P., Scheper,R.J., Borst,P., Pinedo,H.M., and Jansen,G. (1999). Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res.* 59, 2532-2535.
- Kaaijk,P., Kaspers,G.J., Van Wering,E.R., Broekema,G.J., Loonen,A.H., Hahlen,K., Schmiegelow,K., Janka-Schaub,G.E., Henze,G., Creutzig,U., and Veerman,A.J. (2003). Cell proliferation is related to in vitro drug resistance in childhood acute leukaemia. *Br. J. Cancer* 88, 775-781.
- Kaminski,N., Allard,J.D., Pittet,J.F., Zuo,F., Griffiths,M.J., Morris,D., Huang,X., Sheppard,D., and Heller,R.A. (2000). Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 1778-1783.
- Katsuma,S., Nishi,K., Tanigawara,K., Ikawa,H., Shiojima,S., Takagaki,K., Kaminishi,Y., Suzuki,Y., Hirasawa,A., Ohgi,T., Yano,J., Murakami,Y., and Tsujimoto,G. (2001). Molecular monitoring of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by cDNA microarray-based gene expression profiling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288, 747-751.
- McGuire,J.J., Hsieh,P., Coward,J.K., and Bertino,J.R. (1980). Enzymatic synthesis of folylpolyglutamates. Characterization of the reaction and its products. *J. Biol. Chem.* 255, 5776-5788.
- Potti,A., Dressman,H.K., Bild,A., Riedel,R.F., Chan,G., Sayer,R., Cragun,J., Cottrill,H., Kelley,M.J., Petersen,R., Harpole,D., Marks,J., Berchuck,A., Ginsburg,G.S., Febbo,P., Lancaster,J., and Nevins,J.R. (2006). Genomic signatures to guide the use of chemotherapeutics. *Nat. Med.* 12, 1294-1300.
- Raisfeld,I.H. (1980). Pulmonary toxicity of bleomycin analogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 56, 326-336.
- Ross,D.T., Scherf,U., Eisen,M.B., Perou,C.M., Rees,C., Spellman,P., Iyer,V., Jeffrey,S.S., van de,R.M., Waltham,M., Pergamenschikov,A., Lee,J.C., Lashkari,D., Shalon,D., Myers,T.G., Weinstein,J.N., Botstein,D., and Brown,P.O. (2000). Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat. Genet.* 24, 227-235.

Rots,M.G., Pieters,R., Kaspers,G.J., van Zantwijk,C.H., Noordhuis,P., Mauritz,R., Veerman,A.J., Jansen,G., and Peters,G.J. (1999). Differential methotrexate resistance in childhood T- versus common/preB-acute lymphoblastic leukemia can be measured by an in situ thymidylate synthase inhibition assay, but not by the MTT assay. *Blood* 93, 1067-1074.

Scherf,U., Ross,D.T., Waltham,M., Smith,L.H., Lee,J.K., Tanabe,L., Kohn,K.W., Reinhold,W.C., Myers,T.G., Andrews,D.T., Scudiero,D.A., Eisen,M.B., Sausville,E.A., Pommier,Y., Botstein,D., Brown,P.O., and Weinstein,J.N. (2000). A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat. Genet.* 24, 236-244.

Uga,H., Kuramori,C., Ohta,A., Tsuboi,Y., Tanaka,H., Hatakeyama,M., Yamaguchi,Y., Takahashi,T., Kizaki,M., and Handa,H. (2006). A new mechanism of methotrexate action revealed by target screening with affinity beads. *Mol. Pharmacol.* 70, 1832-1839.

Umezawa,H. (1965). Bleomycin and other antitumor antibiotics of high molecular weight. *Antimicrob. Agents Chemother. (Bethesda.)* 5, 1079-1085.

Van't Veer,L.J. and Bernards,R. (2008c). Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. *Nature* 452, 564-570.

Van't Veer,L.J. and Bernards,R. (2008d). Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. *Nature* 452, 564-570.

Van't Veer,L.J. and Bernards,R. (2008b). Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. *Nature* 452, 564-570.

Van't Veer,L.J. and Bernards,R. (2008a). Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. *Nature* 452, 564-570.

van, V., Dai,H., van,d., V, He,Y.D., Hart,A.A., Mao,M., Peterse,H.L., van der,K.K., Marton,M.J., Witteveen,A.T., Schreiber,G.J., Kerckhoven,R.M., Roberts,C., Linsley,P.S., Bernards,R., and Friend,S.H. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530-536.

Wei,G., Twomey,D., Lamb,J., Schlis,K., Agarwal,J., Stam,R.W., Opferman,J.T., Sallan,S.E., den Boer,M.L., Pieters,R., Golub,T.R., and Armstrong,S.A. (2006b). Gene expression-based chemical genomics identifies rapamycin as a modulator of MCL1 and glucocorticoid resistance. *Cancer Cell* 10, 331-342.

Wei,G., Twomey,D., Lamb,J., Schlis,K., Agarwal,J., Stam,R.W., Opferman,J.T., Sallan,S.E., den Boer,M.L., Pieters,R., Golub,T.R., and Armstrong,S.A. (2006a). Gene expression-based chemical genomics identifies rapamycin as a modulator of MCL1 and glucocorticoid resistance. *Cancer Cell* 10, 331-342.

Zeng,H., Chen,Z.S., Belinsky,M.G., Rea,P.A., and Kruh,G.D. (2001). Transport of methotrexate (MTX) and folates by multidrug resistance protein (MRP) 3 and MRP1: effect of polyglutamylation on MTX transport. *Cancer Res.* 61, 7225-7232.

Zuo,F., Kaminski,N., Eugui,E., Allard,J., Yakhini,Z., Ben-Dor,A., Lollini,L., Morris,D., Kim,Y., DeLustro,B., Sheppard,D., Pardo,A., Selman,M., and Heller,R.A. (2002). Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 6292-6297.

