

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2014

THESE 2014 TOU3 2096

THESE

POUR LE DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement par Cindy CAVELIER

Le 15 décembre 2014 à Toulouse

**DEVELOPPEMENT ET UTILISATION DES MODELES PRECLINIQUES
POUR LA DECOUVERTE DE NOUVELLES THERAPEUTIQUES
DANS LE CANCER DU PANCREAS**

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Bruno GOMES

Jury

Monsieur le Professeur Jean-Edouard GAIRIN

Président

Monsieur le Docteur Bruno GOMES

1^{er} assesseur

Monsieur le Docteur Florent PUISSET

2^{ème} assesseur

Monsieur le Professeur Bernard DUCOMMUN

3^{ème} assesseur





PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} octobre 2014

Professeurs Émérites

M. BASTIDE R.	Pharmacie Clinique
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Mycologie
Mme FOURASTÉ I.	Pharmacognosie
M. MOULIS C.	Pharmacognosie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire

Professeurs des Universités

Hospitolo-Universitaires

M. CHATELUT E.	Pharmacologie
M. FAVRE G.	Biochimie
M. HOUIN G.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. SIÉ P.	Hématologie
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BARRE A.	Biologie
Mme BAZIARD G.	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S.	Mathématiques – Biostat.
M. BENOIST H.	Immunologie
Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme DOISNEAU-SIXOU S.	Biochimie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E.	Pharmacologie
Mme MULLER-STAUMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. SALLES B.	Toxicologie
Mme SAUTEREAU A-M.	Pharmacie galénique
M. SÉGUI B.	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maitres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. CESTAC P	Pharmacie Clinique	Mme ARÉLLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme GANDIA-MAILLY P (*)	Pharmacologie	Mme AUTHIER H	Parasitologie
Mme JUILLARD-CONDAT B	Droit Pharmaceutique	M. BERGÉ M. (*)	Bactériologie - Virologie
M. PUISSET F	Pharmacie Clinique	Mme BON C	Biophysique
Mme SÉRONIE-VIVIEN S	Biochimie	M. BOUJILA J (*)	Chimie analytique
Mme THOMAS F	Pharmacologie	Mme BOUTET E	Toxicologie - Sémiologie
		M. BROUILLET F	Pharmacie Galénique
		Mme CABOU C	Physiologie
		Mme CAZALBOU S (*)	Pharmacie Galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S	Bactériologie - Virologie
		Mme COSTE A (*)	Parasitologie
		M. DELCOURT N	Biochimie
		Mme DERAÈVE C	Chimie Thérapeutique
		Mme ÉCHINARD-DOUIN V	Physiologie
		Mme EL GARAH F	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F	Toxicologie
		Mme GIROD-FULLANA S (*)	Pharmacie Galénique
		Mme HALOVA-LAJOIE B	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I	Biochimie
		Mme LEFEVRE L	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C	Pharmacognosie
		M. LEMARIE A	Biochimie
		M. MARTI G	Pharmacognosie
		Mme MIREY G (*)	Toxicologie
		Mme MONTFERRAN S	Biochimie
		M. OLICHON A	Biochimie
		M. PERE D	Pharmacognosie
		Mme PHILIBERT C	Toxicologie
		Mme PORTHE G	Immunologie
		Mme REYBIER-VUATTOUX K (*)	Chimie Analytique
		M. SAINTE-MARIE Y	Physiologie
		M. STIGLIANI J-L	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D	Hématologie
		Mme TOURRETTE A	Pharmacie Galénique
		Mme VANSTEELANDT M	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M	Mathématiques

(*) titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires		Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche	
Mme COOL C (**)	Physiologie	Mme PALOQUE L	Parasitologie
Mme FONTAN C	Biophysique	Mme GIRARDI C	Pharmacognosie
Mme KELLER L	Biochimie	M IBRAHIM H	Chimie anal. - galénique
M. PÉRES M. (**)	Immunologie		
Mme ROUCH L	Pharmacie Clinique		
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique		

(**) Nomination au 1^{er} novembre 2014

Remerciements

A mes membres de jury,

Monsieur le Professeur Jean-Edouard Gairin,

Pour avoir accepté de présider mon jury de thèse, et d'évaluer mon travail,
Pour vos enseignements très enrichissants au sein de la Faculté de Pharmacie.

Monsieur le Docteur Bruno Gomes,

Pour avoir accepté de diriger ma thèse d'exercice,
Pour l'aide régulière que tu m'as apportée pendant le stage et pendant la rédaction du manuscrit,
Pour ta gentillesse, ta confiance et tes encouragements. C'était un réel plaisir pour moi d'avoir travaillé à tes côtés.

Monsieur le Docteur Florent Puisset,

Pour avoir accepté d'évaluer mon travail,
Pour votre enseignement de pharmacie clinique que vous dispensez au sein de la Faculté avec beaucoup d'enthousiasme et d'entrain. Merci pour vos conseils avisés en oncologie.

Monsieur le Professeur Bernard Ducommun,

Pour avoir accepté d'évaluer mon travail et d'être présent, une seconde fois, dans mon jury de thèse, cette fois c'est pour la thèse d'exercice !! Merci beaucoup d'avoir répondu présent, et de me faire l'immense plaisir d'être là.

A mes proches,

Tristan,

Pour ton amour, ton soutien, ton écoute,
Pour tout ce que tu fais pour moi. Ce second doctorat a été une véritable épreuve pour nous, merci pour ta patience débordante !!

Ma petite Junon,

Pour ton amour,
Pour l'envie que tu me donnes d'aller vers l'avant, quelle chance j'ai de t'avoir comme petite fille.

A ma famille, ma belle-famille, et mes amis,

Pour votre soutien, votre écoute, votre réconfort, vos encouragements,
Pour tout ce que vous m'apportez.

A tous, je vous présente mes plus sincères remerciements.

Table des matières

Liste des Figures	7
Liste des Tableaux	8
Abréviations	9
Introduction.....	11
I – Le pancréas, anatomie et physiologie du pancréas	13
II - Le cancer du pancréas.....	15
A. Généralités	15
B. Epidémiologie.....	17
C. Diagnostic du cancer du pancréas.....	17
1. La tomодensitométrie (TDM) ou scanner	18
2. L'imagerie par résonance magnétique (IRM).....	18
3. La tomographie par émission de positons (TEP)	19
4. Les populations à haut risque de cancer du pancréas	19
D. La biologie du cancer du pancréas	20
1. La carcinogénèse	20
2. Marqueur sérologique.....	22
3. Le micro-environnement tumoral	22
4. Les cellules souches pancréatiques.....	23
E. La prise en charge thérapeutique du cancer du pancréas	23
1. Chimiothérapie curative, adjuvante, néo-adjuvante et palliative : généralités.....	23
2. La thérapie du cancer du pancréas	24
a) Le protocole FOLFIRINOX	28
o Le fluorouracile ou 5-FU	28
o Acide folinique.....	29
o Irinotécan	29
o Oxaliplatine.....	31
b) La gemcitabine	32
3. Les soins de support	33
a) La douleur.....	33
b) Les mucites	34
c) L'hématotoxicité.....	34
d) Les troubles digestifs : nausées vomissements, diarrhées.....	34
e) L'alopécie.....	35
F. Mise en évidence de la nécessité de poursuivre les recherches dans ce cancer.....	35

III – Les modèles précliniques développés en recherche pour l'évaluation de nouvelles molécules thérapeutiques dans le cancer du pancréas	36
A. L'approche <i>in vitro</i>	36
1. Les lignées cellulaires de cancer du pancréas	36
2. Les échantillons tumoraux de cancer du pancréas	37
3. Les modèles <i>in vitro</i> 3D de cancer du pancréas	38
B. L'approche <i>in vivo</i>	41
1. Les modèles de greffes sous-cutanées.....	41
2. Les modèles de greffes orthotopiques.....	42
3. Les modèles transgéniques	42
4. Construction de lignées stables bioluminescentes pour l'élaboration de nouveaux modèles <i>in vivo</i> de cancer du pancréas	44
5. Bilan sur le projet d'établissement de modèles cellulaires par intégration ciblée et application à la pharmacologie préclinique en oncologie.....	77
IV – Perspectives dans la prise en charge du cancer du pancréas	78
A. Les pistes de recherche pour un diagnostic précoce du cancer du pancréas.....	78
1. Recherche de nouveaux biomarqueurs du cancer pancréatique	78
a) Les marqueurs sériques.....	78
b) Protéomique.....	79
c) hENT1, marqueur prédictif de réponse à la gemcitabine	80
2. L'écho-endoscopie, vers un diagnostic personnalisé du cancer du pancréas.....	81
3. Vers une meilleure caractérisation de l'adénocarcinome ductal.....	81
B. Quelques molécules innovantes en cours d'essai clinique dans le cancer du pancréas.....	82
1. Essais cliniques en cours d'investigation pour le cancer du pancréas	82
2. Molécules ciblant le microenvironnement tumoral.....	85
a) Voie du VEGF : en cours d'essai clinique de phase III.....	85
b) Voie du TGF- β : en cours d'essai clinique de phase I et II	85
3. Molécules ciblant les voies de signalisation.....	86
a) Erlotinib : en cours d'essai clinique de phase III.....	86
b) Ruxolitinib : en cours d'essai clinique de phase III	87
c) Autres molécules	87
4. La déplétion en nutriments : ERY-ASP/GRASPA® : en cours d'essai clinique de phase II	87
5. L'immunothérapie : Algenpantucel : en cours d'essai clinique de phase III	88
6. Molécules conjuguées à un anticorps	89
a) ⁹⁰ Y-clivatuzumab tetraxetan.....	89
b) Isatuzumab Govitecan : en cours d'essai de phase I/II	90
7. De nouveaux vecteurs pour les cytotoxiques.....	90

a) Le Nab-paclitaxel : en cours d'essai clinique de phase III.....	90
b) MM-398 : en cours d'essai clinique de phase III	91
c) Lipoplatine : en cours d'essai clinique de phase III	92
Perspectives : vers une thérapie personnalisée.....	93
Bibliographie.....	94
Summary	99

Liste des Figures

Figure 1 : Physiologie du pancréas.....	13
Figure 2: Structure chimique du fluorouracile.....	28
Figure 3 : Structure chimique de l'irinotécan	30
Figure 4 : Structure chimique de l'oxaliplatine.....	31
Figure 5: Comparaison de chimiorésistance entre des cultures en 2D et 3D pour de multiples agents cytotoxiques.....	39
Figure 6 : Survie sans récurrence des patients atteints de cancer du pancréas recevant de la gemcitabine ou du 5-FU, par analyse multivariée.....	80

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Facteur de risque pour le cancer du pancréas	20
Tableau 2 : Comparaison indirecte des traitements disponibles pour le cancer pancréatique avancé	27
Tableau 3 : Modèles murins de cancer du pancréas	43
Tableau 4 : Etudes cliniques en cours pour le cancer du pancréas, répertoriées par l'Institut National du Cancer	83

Abréviations

ADC	Antibody-Drug Conjugates
ADN	Acide Désoxyribonucléique
α -GT	α -1,3-galactosyl transférase
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ARNm	Acide ribonucleique messenger
ASNS	Asparagine Synthétase
ATU	Autorisation Temporaire d'Utilisation
CAPS	Cancer of the Pancreas Screening
CBNPC	Cancer Bronchique Non à Petites Cellules
CDK4	Cyclin-Dependent Kinase 4
CMV	CytomégaloVirus
CROE	Centre de Recherche en Oncologie Expérimentale
CRP	C-Reactive Protein
DACH	diaminocyclohexane
dFdC	2'-déoxy-2', 2'-difluorocytidine (Gemcitabine)
DPD	Dihydropyrimidine Déshydrogénase
EF1a	Eucaryotic Elongation factor 1 alpha
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGP-1	Epithelial Glycoprotein-1 antigen
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
¹⁸ FDG	¹⁸ F-fluorodeoxyglucose
FGF	Fibroblast Growth Factor
FOLFIRINOX (protocole)	Fluorouracile, Acide Folinique, Irinotécan, Oxaliplatine
5-FU	Fluorouracile
hENT1	human Equilibrate Nucleoside Transporter
IPMN	Intraductal Papillary Mucinous Neoplasia
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IV	Intra-veineuse
JAK	Janus Kinase
LAL	Leucémie Aiguë Lymphoblastique

LAM	Leucémie Aiguë Myéloïde
MIC-1	Macrophage Inhibitory Cytokine 1
MUC-1	Carbohydrate antigens of mucin-1
PanIN	Pancreatic Intraepithelial Neoplasia
PC	Pancreatic cancer
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDAC	Ductal Adenocarcinoma of the Pancreas
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PEFG (protocole)	Gemcitabine, Cisplatine, Epirubicin, Fluorouracile
RNAse	Ribonuclease
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SDF	Stromal Derived Factor
SPARC	Secreted Protein-Acid Rich in Cysteine
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SV40	Simian Virus 40
TDM	Tomodensitométrie
TGF β -1	Transforming Growth Factor β -1
TEP	Tomographie par Emission de Positons
TS	Thymidilate Synthase
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT	Wild Type

Introduction

Le cancer du pancréas comprend à la fois des tumeurs endocrines et des tumeurs exocrines, en fonction du type cellulaire touché par la pathologie. Parmi les tumeurs exocrines, l'adénocarcinome ductal est très largement majoritaire avec environ 90% des cas de cancers exocrines. Ce type de cancer fait donc l'objet de cette thèse d'exercice.

De nombreuses investigations en recherche et développement sont en cours puisque ce cancer présente un des taux de survie les plus bas parmi l'ensemble des cancers, avec environ 74% des patients qui décèdent durant la 1^{ère} année qui suit le diagnostic et 94% durant les 5 années suivant le diagnostic. Ce faible taux est lié au fait que la plupart des patients diagnostiqués présentent déjà des formes avancées voire métastatiques de la pathologie. La place de la radiothérapie chez les patients atteints de cancer du pancréas résécable ou avancé est actuellement controversée et fait l'objet de nombreux protocoles d'essai clinique. Aussi, la prise en charge standard est une chimiothérapie par gemcitabine pendant 6 mois. Un protocole associant 3 agents cytotoxiques, le protocole FOLFIRINOX (fluorouracile, irinotécan, oxaliplatine), a récemment apporté une alternative à la gemcitabine avec une augmentation des chances de survie à 1 an de 2,4 fois par rapport à la gemcitabine (Vaccaro *et al.*, 2011). Ce protocole est actuellement en cours d'essai clinique multi-centrique de phase III (étude PRODIGE 24) pour des cancers opérables, en comparaison du traitement standard par gemcitabine.

Etant donné qu'un diagnostic précoce de la pathologie permet d'offrir aux patients les meilleures chances de survie, en effet, un taux de survie à 5 ans de 30 à 60% est obtenu pour les patients présentant des tumeurs localisées, de tailles inférieures à 20 mm, sans envahissement ganglionnaire ni métastase, pouvant même dépasser les 75% pour des tumeurs de tailles inférieures à 10 mm, des efforts considérables sont déployés pour permettre ce diagnostic précoce. Ces efforts portent notamment sur la recherche de marqueurs sériques performants, qui pourraient être complémentaire du CA19.9 actuellement recherché, sur l'imagerie qui permet à l'heure actuelle des diagnostics de masses tumorales de plus en plus petites, et enfin sur la caractérisation biologique du cancer. Cette caractérisation a permis une meilleure connaissance du micro-environnement tumoral, du rôle des différents acteurs cellulaires dans la tumorigenèse, des phénomènes de résistance, ainsi que des mutations récurrentes de ce cancer. La mutation de l'oncogène *kras* est retrouvée dans 95% des cas, du suppresseur de tumeur *tp53* dans 50 à 75%, et de *dpc4* dans 50%. Ces mutations récurrentes aboutissent à la dérégulation de nombreuses voies de signalisation, aujourd'hui mieux caractérisées pour ce cancer, et par conséquent pouvant faire l'objet de thérapies ciblées.

La place des modèles pré-cliniques *in vitro* et *in vivo* est cruciale dans ces phases de recherche et développement. Ces modèles comprennent des lignées cellulaires du cancer du pancréas caractérisées, cultivées dans des systèmes à deux ou trois dimensions, en mono-culture ou en co-culture, qui sont donc des modèles *in vitro*, et des modèles *in vivo* de souris qui se rapprochent de la tumeur humaine au sein de son micro-environnement. L'élaboration d'un nouveau modèle pré-clinique *in vivo* du cancer du pancréas a fait l'objet de mon stage d'application dans le cadre de mon cursus de pharmacie. Nous verrons que le but de ce stage était d'évaluer les performances d'un nouveau système d'intégration ciblée pour la création de lignées cellulaires bioluminescentes stables de cancer du pancréas (cellules MIA PaCa-2). La bioluminescence permet l'émission de photons capables de traverser les tissus de l'animal pour être capter par un système d'imagerie, qui permettra de rendre compte de la masse tumorale présente au sein de tissus plus profonds.

Pour conclure ce travail, une revue d'un certain nombre de molécules thérapeutiques actuellement en cours d'évaluation clinique est présentée. Ces thérapies rapportées illustrent la diversité des pistes thérapeutiques en cours d'exploration pour le cancer du pancréas : des molécules ciblant le micro-environnement tumoral, les voies de signalisation dérégulées, les nutriments requis pour la croissance tumorale, l'immunothérapie pour ce cancer ou encore de nouvelles formes galéniques des agents cytotoxiques couramment utilisés.

I – Le pancréas, anatomie et physiologie du pancréas

Le pancréas est à la fois une glande exocrine et une glande endocrine. Il est étroitement lié à la voie biliaire et au duodénum (Huguet *et al.*, 2010). C'est un organe profond, en avant de la première et de la deuxième vertèbre lombaire. Son grand axe est oblique en haut, à gauche et en arrière. C'est un organe fixe accolé à la paroi abdominale postérieure par le fascia de Treitz. Il est solidaire du cadre duodénal. Ses dimensions sont de 15 cm de longueur, 6 cm de hauteur et 2 cm d'épaisseur. Il est constitué de quatre structures dénommées de droite à gauche : la tête, l'isthme, le corps et la queue.

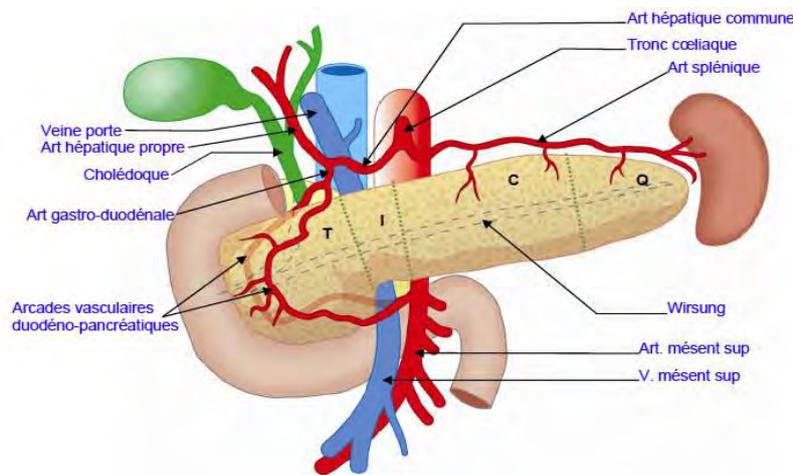


Figure 1 : Physiologie du pancréas.

T : tête, I : Isthme ou col, C : corps, Q : queue, Art : artère, V : veine.

Ses canaux excréteurs sont au nombre de deux : le canal de Wirsung est le canal excréteur principal, qui parcourt toute la glande de gauche à droite et qui reçoit une multitude de petits canaux latéraux. Il s'accôle au bord inférieur du cholédoque dans la tête du pancréas et se termine par deux orifices juxtaposés à la partie moyenne. Le deuxième canal est le canal de Santorini, c'est un canal plus petit qui parcourt la tête du pancréas et vient rejoindre le duodénum. La veine porte est au contact du pancréas ; dans les cancers, son envahissement est précoce.

Concernant sa fonction exocrine, elle est assurée par les cellules acineuses et les cellules ductales (ou canalaies), qui permettent la sécrétion d'un suc enzymatique alcalin responsable de la digestion des aliments. Les cellules acineuses sont responsables de la sécrétion des enzymes pancréatiques et d'une partie de la sécrétion hydroélectrique. Elles sont regroupées en acini, qui sont des unités fonctionnelles. Chaque acinus débouche sur un canal appelé canal intercalaire. L'association de plusieurs acini et de leurs canaux intercalaires forme un lobule. À l'intérieur de ce lobule, les canaux

intercalaires se jettent dans les canaux intra-lobulaires. Les canaux intra-lobulaires des différents lobules se rejoignent eux-mêmes pour former un canal inter-lobulaire s'ouvrant sur le canal de Wirsung. En plus de cette fonction de libération des sécrétions par les canaux intercalaires, ils ont également une autre fonction majeure, celle de production et de sécrétion des ions bicarbonates. Les cellules des canaux interlobulaires et du canal de Wirsung sont identiques et sécrètent des sialoglycoprotéines riches en cystéine et en tryptophane.

Les enzymes pancréatiques sont :

- lipolytiques : phospholipase A2, lipase pancréatique, procolipase, carboxylester hydrolase
- amylolytiques : α amylase pancréatique
- nucléolytiques : désoxyribonucléases
- protéolytiques : endopeptidases (trypsinogène, chymotrypsinogène, proélastase, kallikréinogène) et exopeptidases (carboxypeptidases).

A l'intérieur du pancréas, ces enzymes doivent impérativement être sous forme inactive, c'est-à-dire sous forme de zymogène, afin de ne pas digérer cet organe. Elles doivent en revanche être actives au niveau du duodénum pour digérer le bol alimentaire. Chez le sujet sain, les enzymes sont sécrétées sous forme inactive dans le suc pancréatique : la trypsine, par exemple est présente sous la forme de trypsinogène (zymogène) inactif au niveau du pancréas. Lors de son arrivée dans le duodénum, le trypsinogène est activé en trypsine par l'entérokinase intestinale, elle exercera ensuite un rôle d'activation des autres pro-enzymes pancréatiques.

Il existe un autre moyen de protection du pancréas contre l'activation inappropriée de zymogènes : l'inhibiteur tryptique sécrétoire (inhibiteur de Kazal) est capable de séquestrer une grande partie de l'activité tryptique. Concernant la régulation de la sécrétion pancréatique, elle répond à des stimulations hormonales et nerveuses (parasymphatique), constituées par la cholecystokinine, la sécrétine, le Gastrin Releasing Peptide et l'acétylcholine. Leur mise en jeu physiologique est encore inconnue, et il semblerait que la stimulation soit en réalité complexe, avec notamment des « peptides libérant les hormones ». Les principaux inhibiteurs de la sécrétion sont la somatostatine, le glucagon, le Pancreatic Polypeptide et le peptide YY.

Concernant le rôle endocrine du pancréas, il assure une sécrétion d'insuline, de glucagon et de somatostatine par les îlots de Langerhans.

II - Le cancer du pancréas

A. Généralités

Le terme de cancer du pancréas regroupe en réalité plusieurs types de cancers en fonction du type cellulaire touché par la pathologie :

- Tumeurs endocrines qui comprennent les tumeurs carcinoïdes et les tumeurs neuroendocrines. On peut également distinguer des tumeurs fonctionnelles qui auront un impact sur la production de substances biologiques (peptides, amines...) et seront donc responsables de symptômes devant être nécessairement pris en charge ; et des tumeurs non fonctionnelles, sans symptômes ;
- Tumeurs exocrines qui comprennent les adénocarcinomes ductaux et des acini pancréatiques.

Parmi ces pathologies tumorales bien caractérisées d'un point de vue anatomo-pathologique, l'adénocarcinome ductal est très largement majoritaire (environ 90% des cas de cancers du pancréas) et fera l'objet de ce travail de thèse.

Il est rapporté dans la littérature que 74% des patients atteints de cancer du pancréas décèdent durant la 1^{ère} année qui suit le diagnostic et environ 94% des patients décèdent dans les 5 années suivant le diagnostic. Ce cancer présente donc les taux de survie les plus bas parmi l'ensemble des cancers. Ce faible taux de survie même pour les patients présentant une tumeur résécable est lié au fait que la plupart des patients diagnostiqués présentent déjà des formes avancées voire métastatiques.

La médiane de survie est très dépendante du stade du cancer au moment du diagnostic, les meilleurs résultats étant obtenus avec des masses tumorales localisées, de petites tailles. En effet, la médiane de survie est d'environ 20 mois post-réséction, cependant, des résultats significativement meilleurs sont rapportés pour des tumeurs de petites tailles, diagnostiquées à des stades précoces. Pour les patients présentant des tumeurs localisées, de tailles inférieures à 20 mm, sans envahissement ganglionnaire ni métastase, une résection tumorale complète permet d'atteindre un taux de survie à 5 ans de 30 à 60%. Ces taux peuvent même dépasser les 75% pour des tumeurs de tailles inférieures à 10 mm (Jemal A. *et al.*, 2009).

Classification des cancers du pancréas, selon l'AJCC (American Joint Committee on Cancer, 2002) (Huguet *et al.*, 2010):

T – Tumeur primitive:

- T0 : pas de tumeur primitive ;
- Tis : carcinome in situ ;
- T1 : tumeur limitée au pancréas inférieure ou égale à 2 cm dans son grand diamètre ;
- T2 : tumeur limitée au pancréas supérieure à 2 cm dans son grand diamètre ;
- T3 : tumeur s'étendant au-delà du pancréas mais sans envahir le tronc coélique ni l'artère mésentérique supérieure ;
- T4 : tumeur étendue au tronc coélique ou à l'artère mésentérique supérieure.

N – Adénopathies:

- Nx : renseignements insuffisants pour classer les adénopathies régionales ;
- N0 : pas de métastases ganglionnaire régionales ;
- N1 : envahissement des ganglions lymphatiques régionaux.

M – Métastases viscérales:

- M0 : pas de métastase à distance ;
- M1 : présence de métastase(s) à distance.

Stades :

- Stade 0 : Tis N0, M0 ;
- Stade IA : T1, N0, M0 ;
- Stade IB : T2, N0, M0 ;
- Stade IIA : T3, N0, M0 ;
- Stade IIB : T1-3, N1, M0 ;
- Stade III : T4, tout N, M0 ;
- Stade IV : M1 quels que soient T et N.

Cette classification est peu utilisée. En pratique, on distingue 3 groupes de prise en charge et pronostic distincts. Premièrement, les tumeurs résécables (stades I et II), pour lesquelles le traitement de référence est l'exérèse chirurgicale. Deuxièmement, les tumeurs localement évoluées (stade III), non métastatiques mais non résécables en raison d'un envahissement vasculaire pour lesquelles il n'existe actuellement pas de standard thérapeutique. Troisièmement, les tumeurs métastatiques (stade IV) pour lesquelles le seul traitement est la chimiothérapie.

B. Epidémiologie

7 700 nouveaux cancers du pancréas ont été diagnostiqués en France en 2009 (Guérin *et al.*, 2010). Ce cancer est plus fréquent chez l'homme avec un sexe ratio de 1,6. Les taux d'incidence en 2005 étaient de 7,7 pour 100 000 habitants chez l'homme et 4,7 pour 100 000 chez la femme (Belot A, *et al.*, 2008). Ils sont en augmentation depuis deux décennies, plus nettement chez la femme (3,8% par an) que chez l'homme (2% par an). Le risque de voir se développer un cancer du pancréas jusqu'à 50 ans est faible (moins de 5% des cas) puis augmente avec un pic de fréquence entre 65 et 75 ans. C'est la 5^{ème} cause de décès par cancer avec 8 623 décès observés en 2007 en France (5,3% des décès par cancer). Le taux de mortalité est stable chez l'homme et en légère augmentation chez la femme.

Les facteurs de risque du cancer du pancréas sont assez mal connus. L'exposition aux amines aromatiques (contenues dans la fumée de cigarette) est associée à une augmentation du risque de ce cancer, c'est le facteur de risque le mieux connu. Des études cas-témoins ont observé un risque relatif de cancer du pancréas de 1,3 à 5,5 chez les fumeurs (Gold *et al.*, 1998). Il existe aussi probablement une augmentation du risque de cancer du pancréas dans certaines catégories de travailleurs exposés à ces amines aromatiques, dans l'industrie chimique et pétrochimique.

L'association entre alimentation riche en viande et poisson cuits et cancer du pancréas peut être expliquée par les propriétés mutagènes et carcinogènes des amines aromatiques hétérocycliques formées lors de la cuisson par pyrolyse (Huguet *et al.*, 2010). En revanche, la consommation de fruits et légumes a un effet protecteur vis-à-vis du cancer du pancréas probablement grâce aux effets anti-oxydants notamment de la vitamine C qu'ils contiennent. Les rôles du café et de l'alcool ont été longtemps controversés mais semblent aujourd'hui écartés.

Dans 5 à 10% des cas, on retrouve chez les patients une histoire familiale de cancer pancréatique (Hruban RH *et al.*, 1999).

C. Diagnostic du cancer du pancréas

Un examen clinique ne peut s'avérer performant dans la détection précoce de ce type de cancer compte tenu de sa position rétro-péritonéale. Même si l'imagerie ne permet pas toujours de mettre en évidence des masses tumorales de petites tailles (< 3 cm), en partie à cause de leurs structures cellulaires constituées de tissu fibreux dense, elle reste le premier recours lors du criblage des

populations à haut risque ainsi qu'en routine lors de la prise en charge et du suivi des cancers du pancréas (Okano *et al.*, 2014). Ces dix dernières années, l'approche par imagerie a bénéficié de nombreux progrès technologiques, même s'il est encore difficile de détecter des lésions de taille inférieure au centimètre.

1. La tomодensitométrie (TDM) ou scanner

Il s'agit du premier examen réalisé pour le diagnostic et le suivi du cancer du pancréas. C'est une technique d'imagerie médicale qui consiste à mesurer l'absorption des rayons X par les tissus puis à numériser et reconstruire des images 2D ou 3D des structures anatomiques, par traitement informatique. Pour acquérir les données, la technique d'analyse tomographique (par coupe) est employée, en soumettant le patient au balayage d'un faisceau de rayons X. Cette technique présente une sensibilité de 75 à 100% et une spécificité de 70 à 100%. Pour des lésions inférieures à 2 cm, la sensibilité diminue (68 à 77%) avec une exactitude de 77% (Okano *et al.*, 2014). Le diagnostic des petits carcinomes pancréatiques est alors associé à un critère anatomique, une dilatation du canal pancréatique principal, et pathologique, une pancréatite.

2. L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

Comme la TDM, l'IRM constitue le premier examen réalisé pour le diagnostic et le suivi des cancers pancréatiques, le choix entre TDM et IRM dépendant surtout de l'expertise technique des établissements de santé. L'IRM est une technique d'imagerie médicale qui repose sur le principe de la résonance magnétique nucléaire (RMN) qui utilise les propriétés quantiques des noyaux atomiques. L'IRM nécessite un champ magnétique puissant et stable produit par un aimant supraconducteur qui crée une magnétisation des tissus par alignement des moments magnétiques de spin. Contrairement à la TDM et à la TEP (Tomographie par Emission de Positons), l'examen IRM n'est pas invasif et n'irradie pas le sujet, cela en fait donc un outil de prédilection pour la recherche médicale. Il a été rapporté dans une publication que l'IRM réalisée pour le diagnostic du cancer du pancréas offre des performances de sensibilité, spécificité, exactitude, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative de l'ordre de 88%, 100%, 90%, 100% et 70% respectivement (Miller *et al.*, 2006). La résolution excellente de l'IRM obtenue avec l'agent de contraste gadolinium apporte une valeur ajoutée pour la détection de petites tumeurs.

3. La tomographie par émission de positons (TEP)

La TEP est une imagerie fonctionnelle permettant de détecter des tumeurs grâce à leurs activités métaboliques. C'est une méthode d'imagerie médicale pratiquée en médecine nucléaire qui permet de mesurer en 3D une activité métabolique ou moléculaire d'un organe grâce aux émissions produites par les positons issus d'un produit radioactif injecté au préalable. Le traceur radioactif utilisé en oncologie est le ¹⁸F-FDG (¹⁸F-fluorodeoxyglucose), un analogue non métabolisable du glucose. La TEP associée à un scanner (rayons X) pour l'imagerie structurelle, permet la détection de petites lésions pancréatiques primaires, de métastases à distance, de récurrence en post-chirurgie. Elle est donc devenue un examen très important pour le diagnostic et la prise en charge du cancer pancréatique. Une méta-analyse récente a mis en évidence une sensibilité globale de 90.1%, et une spécificité globale de 80.1% (Tang *et al.*, 2011).

Malgré ces résultats satisfaisants, le rôle de la TEP dans la détection précoce et la détermination du stade clinique reste controversé pour le cancer du pancréas, puisque des progrès sont attendus au niveau des traceurs radioactifs afin qu'ils soient plus spécifiques de l'adénocarcinome pancréatique ductal.

4. Les populations à haut risque de cancer du pancréas

Compte tenu du faible taux d'incidence du cancer du pancréas (7,7 pour 100 000 habitants chez l'homme et 4,7 pour 100 000 chez la femme répertoriés en 2005) (Belot A, *et al.*, 2008), seul un dépistage des groupes à haut risque semble raisonnablement envisageable. Bon nombre d'études ont en effet identifié des groupes à risque et des facteurs de risque pour le développement du cancer du pancréas (Okano *et al.*, 2014). Un risque élevé de développer un cancer du pancréas est associé à un homme, fumeur, Afro-Américain, de plus de 55 ans, obèse, précédemment diagnostiqué pour une tumeur intracanalair papillaire et mucineuse du pancréas ou pour un diabète. Un risque augmenté de développement du cancer du pancréas est également observé pour les personnes présentant une histoire familiale de cancer du pancréas, une pancréatite chronique, une pancréatite héréditaire, un syndrome de Peutz-Jeghers, un mélanome atypique multiple familial, une fibrose kystique, un cancer familial, incluant le syndrome de Lynch, une polypose adénomateuse familiale (causée par la mutation du gène *apc*), et enfin un cancer héréditaire de l'ovaire ou du sein associé à la mutation des gènes

brca1 et *brca2*. Le **Tableau 1** reprend l'ensemble de ces critères de risque de développement du cancer du pancréas.

Tableau 1 : Facteur de risque pour le cancer du pancréas

Variables	Association
Non-genetic risk factors	
Age	Ages 55-64 yr: 20.7% of cases; ages 65-74 yr: 25.8% of cases; ages 75-84 yr: 27.8% of cases; age 85 + yr: 13.3% of cases
Gender	The incidence rate is 13.8 per 100000 men and 10.8 per 100000 women
Smoking	Most established risk factor for PC. Risk increases significantly with greater intensity: ≥ 30 cigarettes/day (OR = 1.75, 95%CI: 1.27-22.42); duration ≥ 50 yr (OR = 2.13, 95%CI: 1.25-3.62); and cumulative smoking dose ≥ 40 pack-years (OR = 1.78, 95%CI: 1.35-2.34)
Obesity	Obese individuals (BMI ≥ 30) have a slightly higher risk (RR: 1.19) of developing PC compared with normal-weight individuals (BMI < 25)
Race	15.5 males and 12.6 females per 100000 in African-Americans, while 8.4 males and 6.9 females per 100000 for Asians/Pacific Islanders
Diabetes mellitus (DM)	Meta-analysis from 35 cohort studies revealed a RR ratio of 1.94 (95%CI: 1.66-62.27) between type 2 DM and PC. 40%-100% increases in the risk of PC are observed with established diabetes
New-onset diabetes	New-onset diabetes is associated with a four- to seven-fold increase in risk, such that 1%-2% of patients with recent-onset diabetes will develop PC within 3 yr
Intraductal papillary mucinous neoplasms	Standardized incidence ratio 16
Hereditary cancer syndromes	
Familial pancreatic cancer	1 first-degree relative: 4.6-fold increased risk (95%CI: 0.5-16.4); ≥ 2 first-degree relatives: 6.4-fold increased risk (95%CI: 1.8-16.4); \geq first-degree relatives: 32-fold increased risk (95%CI: 10.2-74.7)
Chronic pancreatitis	An incidence ratio of 14-18 observed for the development of PC in CP cases, which is further increased by cigarette smoking
Hereditary pancreatitis	A 53-fold (95%CI: 23-105) increased risk for developing PC and a lifetime risk (age 70 yr) of PC of 30%-40% in comparison with normal. RR increases further in smokers
Peuts-Jeghers	132-fold (95%CI: 44-261) increased risk of PC compared with the general population
Lynch syndrome	8.6-fold (95%CI: 4.7-15.7) increased risk for developing PC compared with the general population. An estimated 3.68% (95%CI: 1.45%-45.88%) lifetime (age 70 yr) risk of PC
Hereditary breast and ovarian cancer	BRCA2 germline mutation carriers have a 5% lifetime risk of PC in comparison with 1.78% for controls. BRCA1 mutation is 2.26-times that of the normal population

PC : Pancreatic Cancer.

D. La biologie du cancer du pancréas

1. La carcinogénèse

La pathologie cancéreuse résulte d'une accumulation successive de mutations géniques bien caractérisée. Les cellules cancéreuses à l'origine localisées au niveau de l'épithélium ductal vont évoluer et devenir des cellules cancéreuses invasives.

Les lésions néoplasiques intra-épithéliales pancréatiques sont les précurseurs du cancer du pancréas, les mieux caractérisés. La progression d'un épithélium faiblement dysplasique, correspondant à un néoplasie intraépithéliale de stade IA et IB, vers une dysplasie plus sévère, néoplasie intraépithéliale

de stade II et III, puis vers un carcinome invasif s'accompagne d'une accumulation successive de mutations. Il en résulte une activation de l'oncogène *kras2* et une inactivation des gènes suppresseurs de tumeur *cdkn2a* (codant pour l'inhibiteur de la CDK4 (Cyclin-Dependent Kinase 4)) et *tp53*. Ces séquences d'événements décrits ci-dessus et qui semblent à l'origine de la carcinogenèse sont appuyées par des études réalisées dans des modèles murins modifiés génétiquement. Dans ces modèles, on peut voir que l'activation de *kras* concomitante avec l'inactivation de *tp53* ou *cdkn2A/Ink4a* induit le développement d'un cancer pancréatique identique à la pathologie humaine (Hingorani SR *et al.*, 2005 ; Guerra C *et al.*, 2007 ; Bardeesy N *et al.*, 2006).

D'autres lésions pré malignes du cancer du pancréas moins bien caractérisés impliquent des néoplasies mucineuses pancréatiques.

L'ensemble des patients atteints de cancer du pancréas présente une ou plus des mutations génétiques rapportées (*kras*, *cdkn2a*, *tp53*, *smad4*). 90% des tumeurs présentent des mutations activatrices de l'oncogène *kras2*. La transcription de ce mutant du gène *kras* produit une protéine constitutivement activée, ce qui conduit à une activation aberrante des voies de signalisations cellulaires de prolifération et de survie. Par ailleurs, 95% des tumeurs présentent une activation du gène *cdkn2a* avec pour conséquence la perte de la protéine 16S (un régulateur de la transition G1/S du cycle cellulaire). Le gène *tp53* est muté pour 50 à 75% des tumeurs. Cette mutation permet aux cellules tumorales un « bypass » des points de contrôle des dommages à l'ADN ainsi que de l'apoptose, contribuant ainsi au phénomène d'instabilité génétique. DPC4 est perdu dans environ 50% des cancers du pancréas, résultant une aberration dans la transduction du signal du TGF- β Rc.

Même si ce processus de carcinogenèse semble bien établi, les mutations répertoriées dans des échantillons de patients sont plus complexes. Des analyses récentes du génome tumoral de 24 cancers ont été réalisées, et mettent en évidence une grande variabilité et une hétérogénéité entre les échantillons (Jones S *et al.*, 2008). Dans cette étude, une moyenne de 63 anomalies génétiques par tumeur, principalement des mutations ponctuelles, ont été définies comme relativement pertinentes. Ces mutations ont été structurées en 12 voies de signalisation impactées pour ce cancer. Sur les 24 tumeurs évaluées, ces 12 voies de signalisation ne sont pas toujours altérées et il existe une variabilité d'altération de ces voies de signalisation critiques entre échantillons.

2. Marqueur sérologique

Le marqueur sérologique CA19.9 est le seul marqueur approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) dans le cadre du suivi thérapeutique du cancer du pancréas, il est le biomarqueur le plus couramment utilisé et ce en dépit :

- de sa non-spécificité : une expression élevée de CA19.9 est retrouvée lors de pathologies bénignes (pancréatite, cirrhose) ou malignes (cancer colorectal, gastrique ou utérin) ;
- 5 à 10% de la population caucasienne ne peut exprimer le biomarqueur CA19.9 ;
- Seuls 65% des patients présentant un cancer du pancréas résécable expriment un taux élevé de CA19.9 (Goggins, 2005).

Néanmoins ce marqueur a tout de même motivé des recherches, en particulier via l'utilisation d'anticorps anti-CA19.9.

3. Le micro-environnement tumoral

Chaque tumeur possède un micro-environnement qui lui est propre. L'intérêt porté à ces micro-environnements est fondamental puisque celui-ci modifie les mécanismes cellulaires de réponses aux chimiothérapies utilisées.

La particularité du cancer du pancréas est la formation d'un stroma dense. Les cellules stellaires pancréatiques (aussi appelé myofibroblastes) joue un rôle critique dans la formation et le turnover de ce stroma. Après activation des facteurs de croissance tels que TGF β -1, PDGF (Platelet Derived Growth Factor), et FGF (Fibroblast Growth Factor) ces cellules sécrètent du collagène et d'autres composants de la matrice extra-cellulaire (Hidalgo *et al.*, 2012). Les cellules stellaires semblent également responsables de la faible vascularisation qui caractérise le cancer du pancréas. L'un des autres mécanismes de régulation de ce stroma implique la production des métalloprotéases. Ce stroma ne fonctionne pas seulement comme barrière mécanique mais constitue un compartiment dynamique impliqué de manière critique dans le processus de formation tumoral, de progression, d'invasion, et de génération de métastases. Ces cellules stromales expriment de nombreuses protéines comme Cox-2, PDGFR, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), SDF (Stromal Derived Factor), des chemokines, des intégrines, SPARC (Secreted Protein-Acid Rich in Cysteine), ainsi que les acteurs de la voie Hedgehog, entre autre qui ont été associés avec un mauvais pronostic et une résistance au traitement. La meilleure connaissance de ce micro-environnement tumoral et du stroma pancréatique commence

à donner des éléments de réponse pour expliquer les faibles réponses cliniques de ce type de cancer (Hidalgo *et al.*, 2012). En particulier, les études précliniques utilisant des modèles murins modifiés génétiquement ont permis de reproduire l'une des caractéristiques essentielles de ce cancer, à savoir sa faible vascularisation. De nombreuses voies de recherche sont engagées sur ces thématiques afin d'évaluer la relevance thérapeutique des molécules ciblant les acteurs du micro-environnement (Cf 2. Molécules ciblant le microenvironnement tumoral).

L'une des autres caractéristiques du stroma tumoral est de contribuer à créer un micro-environnement tumoral immunosuppresseur qui diminue l'immunité anti-tumorale. Il semble intéressant d'un point de vue clinique de tenter de reverser ce phénomène, par exemple en activant le CD40 pour stimuler la réponse anti-tumorale des cellules T.

4. Les cellules souches pancréatiques

Différentes études basées sur des xénogreffes issues de tumeurs primaires ont permis l'identification de cellules cancéreuses ayant des propriétés de cellules souches. Le phénotype de ces cellules est encore discuté, mais elles possèdent différentes caractéristiques biologiques importantes telles que les capacités d'auto-renouvellement et de différenciation. Des études précoces ont par ailleurs montré que la présence de ces cellules souches au sein de la tumeur est associée à une faible survie globale, une résistance aux agents cytotoxiques standards tels que le gemcitabine et une augmentation du potentiel métastatique de la tumeur (Li *et al.*, 2007 ; Rasheed *et al.*, 2010). Comme pour chaque cancer, ces cellules souches font parties d'un groupe hétérogène de cellules, rendant l'identification formelle difficile. Une observation récente importante a mis en évidence la plasticité de ces cellules, qui seraient ainsi capables de passer d'une cellule épithéliale vers une cellule mésenchymateuse ce qui pourrait être impliqué dans la transformation métastatique. Ces connaissances concernant les cellules souches tumorales permettent d'explorer de nouvelles voies thérapeutiques.

E. La prise en charge thérapeutique du cancer du pancréas

1. Chimiothérapie curative, adjuvante, néo-adjuvante et palliative : généralités

La chimiothérapie curative :

Ce type de chimiothérapie permet la guérison du patient. En pratique, elle est surtout utilisée dans les pathologies tumorales hématologiques comme les leucémies ou les lymphomes de Hodgkin, guéries grâce au recours aux cytotoxiques. Pour les tumeurs solides, il y a qu'un seul cas de chimiothérapie curative : le cancer du testicule.

La chimiothérapie adjuvante :

Dans ce cadre, la chimiothérapie joue un rôle essentiel mais se fait en complément d'une intervention locale ou loco-régionale par radiothérapie ou chirurgie. Elle est pratiquée après l'intervention. Elle permet l'éradication des éventuelles cellules tumorales résiduelles qui auraient migré en petit nombre vers un autre tissu. La chimiothérapie adjuvante a donc pour but de réduire les récives à distance.

La chimiothérapie néo-adjuvante :

Cette chimiothérapie intervient avant l'intervention locale ou loco-régionale. On peut citer pour exemple le cancer du sein inflammatoire pour lequel il existe un risque important de micro-embolies tumorales lors de la chirurgie. Le recours à une chimiothérapie à base de cytotoxiques avant l'intervention permet alors de nécroser la tumeur et ainsi de limiter les métastases lors de la chirurgie. Cette stratégie thérapeutique est également utilisée lors de la prise en charge de l'ostéosarcome.

La chimiothérapie palliative :

Cette chimiothérapie est utilisée dans le cas de tumeurs avancées, qui ont métastasées, pour lesquelles il n'y a plus d'espoir de guérison. Le recours à la chimiothérapie vise à diminuer la taille de la masse tumorale ou à moindre mesure à stabiliser la maladie, afin d'atténuer les symptômes liés au cancer et en particulier la douleur.

Les chimiothérapies utilisées dans le cadre du cancer du pancréas sont donc adjuvante et palliative, elles sont décrites dans le paragraphe suivant. Des essais cliniques de phase III sont actuellement en cours afin d'évaluer la pertinence d'une chimiothérapie néo-adjuvante à base de gemcitabine et d'oxaliplatine, avant intervention chirurgicale, dans le cadre de cancers de la tête du pancréas résecables.

2. La thérapie du cancer du pancréas

Il est couramment rapporté dans la littérature que la prise en charge du cancer du pancréas localisé par résection chirurgicale constitue le traitement conférant le plus de chance de réussite (Moss *et al.*, 2010). Malheureusement, 85% des patients diagnostiqués présentent une forme avancée voire

métastatique de la pathologie et la résection n'est envisageable que dans 13% des cas. Pour les patients présentant la forme la plus favorable de la pathologie pour lesquels une résection tumorale est réalisée, il existe un fort taux de rechute avec des taux de récurrence locale supérieurs à 50% après chirurgie seule avec une survie globale à 5 ans inférieure à 5%. Ce fort taux de récurrence est probablement lié à la présence de « micrométastases » au moment de la chirurgie. Dans le cadre de tumeurs réécabables, ces présumées « micrométastases » peuvent motiver le recours à une chimiothérapie adjuvante ou à une radio-chimiothérapie. Ce protocole de radio-chimiothérapie sera abordé même s'il semble ne pas être un standard en Europe.

Lors de la mise en évidence, par imagerie, d'une masse tumorale bénigne ou maligne, une pancréatectomie sera effectuée. Dans le cas d'une masse située au niveau de la tête du pancréas, l'opération consiste en l'ablation soit de la tête du pancréas uniquement, soit de la totalité du duodénum ainsi que de la vésicule biliaire et de la voie biliaire. Il est parfois nécessaire d'enlever en plus le tiers distal de l'estomac. On parle de duodéno-pancréatectomie céphalique selon Whipple, la reconstitution de la continuité digestive se faisant par anastomoses. Lorsque la tumeur est située au niveau de la queue du pancréas, on procède à une pancréatectomie caudale. On peut également procéder, plus rarement, à l'enlèvement d'une partie intermédiaire du pancréas, l'opération est alors nommée pancréatectomie centrale.

Le développement de fistules pancréatiques suite à ces pancréatectomies constitue une grave complication post-opératoire.

Concernant la chimiothérapie du cancer du pancréas, il est couramment rapporté dans la littérature qu'en situation adjuvante, le traitement standard soit une chimiothérapie par acide folinique et fluorouracile ou gemcitabine pendant 6 mois. La place de la radiothérapie chez les patients atteints de cancer du pancréas opérable ou localement évolué est actuellement controversée. En association avec une chimiothérapie concomitante, la radiothérapie postopératoire pourrait améliorer la probabilité de survie des patients en situation de résection tumorale incomplète, ceci est actuellement en cours d'évaluation dans un essai clinique de phase III en combinaison avec la gemcitabine après chirurgie (NCT00064207).

Pour les tumeurs localement évoluées, il n'existe pas de standard thérapeutique. Deux options sont envisageables, la chimiothérapie par gemcitabine et la radio-chimiothérapie. Deux méta-analyses récentes sur données publiées ont conclu à la l'absence de supériorité de la radio-chimiothérapie sur la chimiothérapie (Sultana *et al.*, 2007; Yip *et al.*, 2007). Un essai clinique de phase III a également confirmé cette étude statistique (Chauffert B *et al.*, 2008).

Concernant les nombreux essais cliniques achevés ces dernières décades, une étude statistique par méta-analyse a mis en évidence que par rapport à la gemcitabine, seules les thérapies suivantes ont permis d'obtenir une augmentation significative de la survie (Gresham *et al.*, 2014) :

- le protocole FOLFIRINOX a montré un gain de survie globale de 4,2 mois par rapport à la gemcitabine seule ;
- le protocole PEFG (gemcitabine, cisplatine, epirubicin, 5-FU) a montré un gain de survie globale de 3 mois par rapport à la gemcitabine seule ;
- la combinaison gemcitabine / Nab-paclitaxel : a montré un gain de survie globale de 3,8 mois par rapport à la gemcitabine seule ;
- la combinaison gemcitabine / capécitabine : gemcitabine / erlotinib / bevacizumab : a montré un gain de survie globale de 4,3 mois par rapport à la gemcitabine seule ;
- gemcitabine / erlotinib / bevacizumab : a montré un gain de survie globale de 4,3 mois par rapport à la gemcitabine seule ;
- gemcitabine / erlotinib : a montré un gain de survie globale de 1,2 mois par rapport à la gemcitabine seule ;
- gemcitabine / oxaliplatine.

Ces résultats sont à la fois encourageants puisqu'ils ont apportés pour certains protocoles une alternative thérapeutique au traitement de référence par gemcitabine (par exemple le FOLFIRINOX), mais également décevants puisque les gains de survie restent relativement faibles (**Tableau 2**). Concernant le recours aux thérapies ciblées, il semble qu'à ce jour seul l'ajout d'erlotinib (petite molécule inhibitrice de l'EGFR tyrosine kinase (Epidermal Growth Factor Receptor) ait démontré un faible bénéfice significatif en comparaison avec la gemcitabine seule (Saif, 2014).

Le tableau suivant issu de la publication de Gresham met en évidence la supériorité du protocole FOLFIRINOX par rapport aux autres combinaisons de cytotoxiques (Gresham *et al.*, 2014).

Tableau 2 : Comparaison indirecte des traitements disponibles pour le cancer pancréatique avancé

Indirect comparison	Overall survival	Survival gain over OS**	Progression free survival**	Progression free survival gain
	HR (95% CI)	Months (95% CI)	HR (95% CI)	Months (95% CI)
FOLFIRINOX vs.				
Gemcitabine	0.57 (0.45-0.72)*	4.22 (2.12-6.92)*	0.59 (0.37-0.47)*	3.73 (0.98-6.48)*
Gemcitabine + NAB-P	0.79 (0.59-1.05)	1.46 (-0.27-3.81)	0.68 (0.51-0.91)*	1.54 (0.32-3.16)*
Gemcitabine + Oxaliplatine	0.66 (0.50-0.88)*	2.83 (0.76-5.59)*	0.60 (0.43-0.85)*	2.17 (0.58-4.43)*
Gemcitabine + Capecitabine	0.70 (0.53-0.92)*	2.42 (0.48-5.0)	0.58 (0.45-0.74)*	2.40 (1.14-4.01)*
Gemcitabine + Cisplatine	0.58 (0.43-0.78)*	4.06 (1.62-7.3)	0.46 (0.34-0.62)*	3.94 (2.03-6.53)*
Gemcitabine + 5FU	0.70 (0.49-0.97)*	2.45 (0.17-5.63)*	0.61 (0.44-0.84)*	2.11 (0.63-4.14)*
Gemcitabine + 5FU/FA	0.55 (0.40-0.74)*	4.62 (1.93-8.28)*	n/a	n/a
Gemcitabine + pemetrexed	0.58 (0.43-0.74)*	4.03 (1.51-7.41)*	n/a	n/a
Gemcitabine + irinotecan	0.55 (0.39-0.76)*	4.62 (1.76-8.54)*	n/a	n/a
PEFG	0.88 (0.54-1.43)	0.80 (-1.66-4.76)	0.92 (0.57-1.48)	0.28 (-1.07-2.47)
Gemcitabine + exatecan	0.58 (0.43-0.79)*	4.03 (1.44-7.53)*	n/a	n/a
Gemcitabine + erlotinib	0.70 (0.51-0.94)*	3.94 (1.47-3.94)*	0.61 (0.45-0.82)*	2.11 (0.72-3.96)*
Gemcitabine + erlotinib + bevacizumab	0.78 (0.55-1.11)	1.57 (-0.55-4.61)	0.63 (0.45-0.88)*	1.95 (0.44-4.08)*
Gemcitabine + axinitib	0.56 (0.40-0.80)*	4.36 (1.40-8.54)*	0.47 (0.33-0.66)*	3.76 (1.70-6.68)*
Gemcitabine + tipifarnib	0.59 (0.44-0.79)*	3.94 (1.47-7.27)*	0.64 (0.48-0.86)*	1.82 (0.54-3.54)*
Gemcitabine + marismastat	0.58 (0.40-0.83)*	4.13 (1.18-8.38)*	0.49 (0.35-0.70)*	3.37 (1.41-6.15)*
Gemcitabine + Sorafenib	0.45 (0.28-0.73)*	6.89 (2.11-14.6)*	0.45 (0.28-0.72)*	4.00 (1.30-8.32)*
Gemcitabine + Cetuximab	0.54 (0.40-0.71)*	4.82 (2.24-8.25)*	0.44 (0.33-0.58)*	4.21 (2.41-6.56)*
Capecitabine + erlotinib	0.68 (0.46-1.00)	1.08 (0.67-6.30)	0.60 (0.88-1.30)	0.76 (0.43-2.20)

*Statistically significant, n/a = comparison not available.

Hazard ratios for overall survival and progression free survival for FOLFIRINOX with relation to all included treatments in the network-meta-analysis are shown.

**Survival gain/PFS gain calculated from [(Gemcitabine median OS/HR)-Gemcitabine median OS] (Gemcitabine median PFS/HR)-Gemcitabine median PFS].

De nombreuses publications ont mis en évidence que la faible perfusion des agents cytotoxiques au sein de la tumeur pancréatique soit causée par la réaction desmoplastique qui caractérise ce cancer (Schober *et al.*, 2014). De plus, il a été rapporté une différence d'expression des protéines de la famille MRP (Multidrug Resistance Proteins), qui pourrait également jouer un rôle dans la chimiorésistance.

Au sein du CHU de Toulouse, les protocoles de prise en charge du cancer du pancréas sont les suivants :

- FOLFIRINOX (fluorouracile associé à l'acide folinique, irinotécan et oxaliplatine) pour les patients en bon état général ;
- Gemcitabine pour les autres patients ;

Le recours au protocole FOLFIRINOX a été motivé par une étude randomisée de phase III à grande échelle menée sur des formes avancées du cancer du pancréas, où ce traitement a démontré un avantage de survie par rapport au traitement standard à la gemcitabine. Les résultats de l'étude

indiquaient que les chances d'être en vie à 1 an sont 2,4 fois supérieures avec le protocole FOLFIRINOX (48% des patients traités au FOLFIRINOX étaient toujours vivants après une année, comparativement à 21% de ceux traités à la gemcitabine) (Vaccaro *et al.*, 2011). De plus, pour la première fois dans une étude sur des patients atteints d'un cancer du pancréas métastatique, une médiane globale de survie de 11,1 mois était atteinte. Ce protocole thérapeutique est actuellement en cours d'essai clinique de phase III (étude PRODIGE 24) pour des cancers opérables, en comparaison du traitement standard, la gemcitabine.

Par ailleurs, ce protocole de polychimiothérapie a obtenu l'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) au Japon pour le traitement des formes métastatiques. Il semble que ce soit la première fois au monde qu'un protocole entier reçoive l'AMM.

a) Le protocole FOLFIRINOX

- o Le fluorouracile ou 5-FU

Il fait partie de la famille des antagonistes pyrimidiques. Il s'agit d'un uracile portant un fluor en position 5.

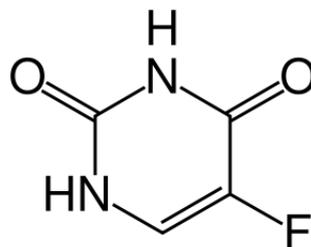


Figure 2: Structure chimique du fluorouracile

Mécanisme d'action:

Le 5-FU perfusé se retrouve au niveau plasmatique, cette molécule peu lipophile gagne alors le cytoplasme de la cellule par transport facilité. Au niveau cellulaire, les systèmes enzymatiques de l'uracile vont transformer le 5-FU en métabolite actif : le FdUMP qui possède une action cytotoxique en inhibant de façon compétitive la Thymidilate Synthase (TS). Cette enzyme catalyse la formation de TMP par méthylation du dUMP. Elle est donc essentielle à la synthèse de l'ADN à laquelle elle fournit un précurseur. L'action inhibitrice de la TS par le 5-FU est renforcée en présence d'une forte

concentration en folates réduits, c'est pour cette raison que l'acide folinique est administré conjointement au 5-FU.

Métabolisme, administration et effet indésirable majeur:

Le 5-FU est surtout éliminé par métabolisme hépatique, par la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD), 90% est métabolisé en 5-FUH₂. Ce métabolisme du 5-FU par la DPD est de nature saturable, on peut donc augmenter la dose pour diminuer le phénomène d'élimination, lors des chimiothérapies.

L'administration de 5-FU se fait exclusivement par voie IV.

La toxicité majeure est digestive, sous forme de mucite. Cela correspond à une inflammation de la muqueuse digestive. La zone particulièrement concernée par ces mucites inhérentes aux cytotoxiques est la zone bucco-pharyngée. Elles résultent directement de l'action des cytotoxiques contre les cellules à fort taux de renouvellement. En plus de cette action directe, il y a souvent une composante infectieuse avec sur-prolifération d'une flore commensale bactérienne ou fongique (du type *Candida albicans*), favorisée par une neutropénie, fréquente pour les patients sous chimiothérapie. Ces mucites pourront motiver le recours à une nutrition parentérale, ainsi qu'à des traitements locaux à base d'antalgiques ou d'anesthésiques.

○ Acide folinique

Mécanisme d'action:

L'inhibition compétitive de la TS par le 5-FU entraîne une augmentation de la concentration de dUMP et donc une diminution de l'action du 5-FU. Pour remédier à cette diminution d'activité, on apporte aux cellules tumorales des folates réduits qui vont stabiliser la liaison du FdUMP à la TS. On limite donc la compétition en faveur du dUMP.

○ Irinotécan

Il fait partie de la famille des intercalants de l'ADN et plus précisément des inhibiteurs de la topoisomérase I. Cette molécule produite par hémisynthèse dérive de la molécule naturelle camptothécine, qui a rapidement été abandonnée car trop toxique.

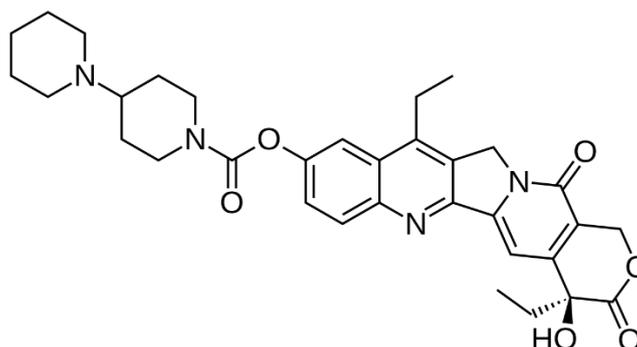


Figure 3 : Structure chimique de l'irinotécan

Mécanisme d'action:

L'irinotécan est métabolisé par la carboxylesterase en un métabolite actif jusqu'à 100 fois plus actif, le SN-38. Il agit comme un inhibiteur de la topoisomérase I avec formation d'un complexe ternaire. Cette action va induire des lésions simple-brin sur l'ADN et ainsi bloquer la fourche de réplication de l'ADN. La cassure simple-brin initiale pourra engendrer une cassure double brin, plus délétère pour la cellule, au niveau du complexe ternaire formé par le SN-38 lors de la réplication de l'ADN. L'action cytotoxique de l'irinotécan est donc spécifique de la phase S.

Métabolisme, administration et effet indésirable majeur

L'élimination se fait par métabolisation (glucurocojugaison).

L'administration se fait par voie IV, en perfusion courte.

Les toxicités majeures et limitantes sont des troubles digestifs du type diarrhées (très fréquent) ainsi qu'une hématotoxicité (très fréquente et sévère). Cette hématotoxicité consiste en la diminution des éléments figurés du sang, cette toxicité représente la toxicité dose limitante de la quasi-totalité des cytotoxiques. Dans le cas de l'irinotécan, la lignée hématopoïétique la plus touchée est la lignée blanche et en particulier les polynucléaires neutrophiles, il s'agit donc d'une neutropénie qui est réversible et non cumulative. Sa profondeur peut motiver le recours à une administration parentérale de GCSF (Cf 3. Les soins de support).

○ Oxaliplatine

Il fait partie de la famille des alkylants et plus précisément du groupe des agents dérivés du platine. Il s'agit d'un complexe du platine II neutre consistant en un ion Pt^{2+} complexé d'une part par un dianion oxalate et d'autre part par une molécule de 1,2-diaminocyclohexane.

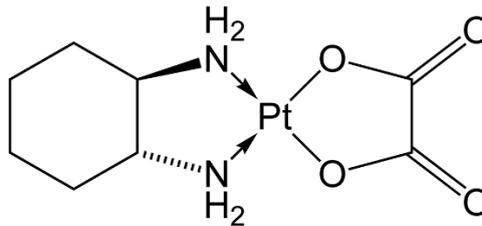


Figure 4 : Structure chimique de l'oxaliplatine

Mécanisme d'action:

Une fois dans le plasma, l'oxaliplatine subit une hydrolyse spontanée, compte tenu de sa faible stabilité en milieu aqueux, s'accompagnant de la libération d'oxalate et de la formation du métabolite actif : le DACH Platine (diaminocyclohexane). Celui-ci provoquera une attaque électrophile au niveau de l'ADN par formation de ponts intrabrins entre 2 guanines adjacentes, et à moindre mesure à un résidu adénine adjacent à une guanine. Ce cytotoxique va ainsi perturber la synthèse de l'ADN ainsi que sa transcription.

Métabolisme, administration et effet indésirable majeur :

Pour le métabolisme : A rechercher mais contribution du rein + fixation aux protéines.

Administration par voie IV.

Les effets indésirables de l'oxaliplatine sont la neurotoxicité immédiate et à distance, l'hématotoxicité, en particulier la neutropénie ainsi que les nausées / vomissements.

La neurotoxicité immédiate se manifeste par des sensations d'étouffement lors d'exposition au froid, alors que la neurotoxicité à distance se manifeste par des troubles de la sensibilité difficilement réversible.

Concernant les nausées, vomissements, ils sont la conséquence directe de l'effet des cytotoxiques au niveau central ainsi qu'au niveau digestif. Leurs intensités pourront motiver la prescription de médicaments antiémétiques (Cf 3. Les soins de support).

b) La gemcitabine

Elle reste l'une des chimiothérapies couramment utilisée, puisque les alternatives thérapeutique à la gemcitabine n'offrent des gains de survie que de quelques mois supplémentaires (4,2 mois pour le protocole FOLFIRINOX).

Mécanisme d'action :

La gemcitabine (dFdC : 2'-déoxy-2', 2'-difluorocytidine) appartient à la famille des analogues de la pyrimidine. Elle est métabolisée en intracellulaire par une nucléoside kinase en nucléoside diphosphate (dFdCDP) et triphosphate (dFdCTP) actifs. Le dFdCDP inhibe la ribonucléotide réductase, qui est uniquement responsable de la catalyse des réactions produisant des désoxynucléosides triphosphates (dCTP) destinés à la synthèse de l'ADN, entraînant une réduction des concentrations de désoxynucléosides en général et du dCTP en particulier. Le dFdCTP va ensuite entrer en compétition avec le dCTP pour son incorporation dans l'ADN (auto-potentialisation).

De la même manière, une faible quantité de gemcitabine peut aussi être incorporée dans l'ARN. Ainsi, la concentration intracellulaire réduite du dCTP potentialise l'incorporation du dFdCTP dans l'ADN. Après incorporation de la gemcitabine dans l'ADN, un nucléotide supplémentaire s'ajoute aux chaînes d'ADN en cours d'élongation, induisant une inhibition complète de la synthèse de l'ADN.

Métabolisme, administration et effet indésirable majeur :

La gemcitabine est rapidement métabolisée par la cytidine déaminase dans le foie, les reins, le sang et les autres tissus. Le métabolisme intracellulaire de la gemcitabine produit des mono, di et triphosphates de gemcitabine (dFdCMP, dFdCDP et dFdCTP) parmi lesquels les dFdCDP et dFdCTP sont considérés actifs. Le métabolite principal, le 2'-déoxy-2', 2'-difluorouridine (dFdU) retrouvé dans le plasma et l'urine est quant à lui inactif.

Voie d'administration IV.

Les effets indésirables de la gemcitabine sont l'hématotoxicité, avec principalement des leucopénies, thrombopénies et anémies, des troubles digestifs à type de nausées et vomissements, des éruptions cutanées allergiques fréquemment associé à un prurit, ainsi qu'une alopecie (Cf 3. Les soins de support). Les risques encourus de la thrombopénie sont les saignements voire les hémorragies. Concernant l'anémie, il s'agit d'une toxicité qui se retrouve généralement après plusieurs cycles de chimiothérapie (les globules rouges ayant une durée de vie plus longue que les autres cellules hématopoïétiques). En cas d'anémie profonde, de l'EPO peut être utilisé ainsi que des transfusions de globules rouges (ainsi que de plaquettes).

3. Les soins de support

Les soins de support en oncologie visent à soulager et prendre en charge les effets indésirables induits par la chimiothérapie. Dans le cas du cancer du pancréas, rapporté dans la partie précédente, les soins de support vont donc concerner :

- La douleur
- Les mucites
- L'hématotoxicité
- Les troubles digestifs
- L'alopecie

a) La douleur

La prise en charge de la douleur cancéreuse fait classiquement appel à des dérivés morphiniques (antalgique de palier 3) mais également à des anti-épileptiques (prégabaline et gabapentine) et antidépresseurs (inhibiteur de la recapture de sérotonine et de noradrénaline dont le seul à posséder l'AMM est le duloxetine ou antidépresseur tricyclique : imiproanine, amitriptyline), afin de soulager les douleurs neuropathiques. Les recommandations de la prise en charge de la douleur sont : de privilégier la voie orale, l'administration du traitement doit se faire à un intervalle régulier sans attendre le retour de la douleur, adapter le traitement antalgique en fonction de l'intensité et du type de douleur, et enfin prévenir les effets indésirables des antalgiques en particulier pour la morphine (constipation et nausées/vomissements).

b) Les mucites

Les mucites induites par les chimiothérapies nécessitent une bonne hygiène dentaire, idéalement avant (consultation dentaire) et pendant les cures (brossage des dents, bains de bouche, maintien de la salivation), afin de réduire le risque de porte d'entrée infectieuse et fongique chez ces patients fragilisés.

c) L'hématotoxicité

La neutropénie :

A partir d'un grade 3 (< 1000/mm³), la neutropénie commence à être inquiétante en particulier à cause du risque infectieux. Cela peut motiver le recours à des facteurs de croissance hématopoïétique (FCH), le but étant de réduire la profondeur et la longueur de la neutropénie. Ces facteurs peuvent également être utilisés en prophylaxie primaire ou secondaire.

En cas de neutropénie fébrile (2 fois 38°C dans la même journée), ce qui correspond à une suspicion d'infection, il y aura recours à une antibiothérapie (IV ou orale) voire à un isolement des patients.

L'anémie :

Le traitement sera une transfusion de culots globulaires, qui pourra être évitée en utilisant des agents stimulants de l'érythropoïèse (EPO).

La thrombopénie :

La prise en charge sera une transfusion plaquettaire.

d) Les troubles digestifs : nausées vomissements, diarrhées

Il existe différents types de nausées/vomissements : aigus (jusqu'à 24h post-chimiothérapie), retardés (de 2 à 5 jours post-chimiothérapie) et anticipés (avant la chimiothérapie), qui pourront motiver une prise en charge anti-émétique par des sétrons (antagonistes des récepteurs 5HT₃), des antagonistes dopaminergiques (dompéridone, métoclopramide..), des corticoïdes (dexaméthasone) ainsi que de l'aprépitant (antagoniste des récepteurs NK₁).

e) L'alopecie

Elle est toujours réversible, le port d'un casque réfrigérant entraînant une vasoconstriction locale pourra être éventuellement proposé.

F. Mise en évidence de la nécessité de poursuivre les recherches dans ce cancer

Etant donné qu'il n'existe à ce jour aucun test de dépistage robuste, le diagnostic du cancer du pancréas est généralement posé chez des patients présentant des symptômes témoignant une pathologie avancée : perte de poids, douleur abdominale, jaunisse, et donc, d'autant plus difficile à prendre en charge. Dans une étude publiée en 2012, les auteurs rapportés que 74% des patients atteints de cancer du pancréas meurent dans l'année qui suit le diagnostic et environ 94% meurent dans les 5 années suivant le diagnostic (Kaur *et al.*, 2012). Ces données de survie sont les plus sombres parmi l'ensemble des cancers, et ce en dépit des progrès réalisés ces dernières années en chirurgie, chimio et radiothérapie (Moss *et al.*, 2010). Enfin, si l'on compare ce cancer avec d'autres tumeurs solides (cancers de l'estomac, des poumons, du colon et de la prostate), leurs taux de décès ont diminué ces 40 dernières années, alors que celui du cancer du pancréas est resté inchangé, il a même progressé chez les sujets âgés (Kaur *et al.*, 2012).

Compte tenu de l'ensemble de ces considérations, de multiples voies de recherche visant une amélioration de la prise en charge de ce cancer sont en cours : mise au point de modèles pré-cliniques plus proches de la pathologie humaine, évaluations pré-cliniques et cliniques de nombreuses molécules impactant sur la physiopathologie de ce cancer (micro-environnement, voies de signalisation dérégulées, mécanismes immunologiques...).

III – Les modèles précliniques développés en recherche pour l'évaluation de nouvelles molécules thérapeutiques dans le cancer du pancréas

Le recours aux modèles pré-cliniques de cancer du pancréas est une approche essentielle pour la caractérisation de la tumorigenèse, des dérégulations cellulaires et moléculaires, la recherche de nouvelles thérapies, la compréhension des phénomènes de résistance tumorale... Ces modèles peuvent être des modèles *in vitro*, c'est-à-dire cultivés en dehors d'un organisme, ou *in vivo*, et donc cultivés dans un organisme, très souvent la souris. Compte tenu du rôle majeur du micro-environnement tumoral et des interactions cellules-cellules, les études sont généralement menées *in vitro* dans un premier temps, par exemple pour réaliser des cribles de molécules chimiques, avant de passer à des modèle *in vivo*, qui seront plus proches de la réalité clinique et de l'environnement tumoral.

A. L'approche *in vitro*

1. Les lignées cellulaires de cancer du pancréas

L'utilisation de lignées cellulaires du cancer du pancréas tient toujours une place importante dans la caractérisation du cancer et dans la recherche de nouveaux anti-cancéreux, et cela malgré les limites évidentes et bien documentées de cette approche. Sur un site officiel de vente de produits biologiques (ATCC), 22 lignées cellulaires issues de cancers du pancréas humain sont commercialisées. Leur origine est variée puisque l'on trouve à la fois des cellules cancéreuses issues d'adénome, de carcinome du pancréas ou encore provenant de sites métastatiques. Le profil des mutations d'oncogènes et de gènes suppresseur de tumeur peut varier d'une lignée à l'autre, permettant ainsi de faire un rationnel quant à leur implication dans les multiples mécanismes intracellulaires.

Compte tenu de la variabilité des altérations génétiques mises en évidence par biologie moléculaire sur biopsie de la masse tumorale chez les patients, il est indispensable d'étudier plusieurs lignées cellulaires en même temps (Rozenblum *et al.*, 1997). Ces études de recherche non-clinique permettent une évaluation rapide et reproductible de l'impact d'un anti-cancéreux sur la croissance ou la cytotoxicité cellulaire. D'autre part, l'étude de plusieurs lignées simultanément, proficientes ou

déficientes pour certains gènes, peut permettre d'élucider les mécanismes d'action des agents anti-cancéreux utilisés.

En plus de l'absence du micro-environnement tumoral, l'une des principales limites de ces lignées cellulaires est qu'au cours de leur prolifération *in vitro* elles accumulent des mutations additionnelles et des changements épigénétiques qui les éloignent probablement de plus en plus de la réalité clinique initiale. On peut citer comme exemple une étude portant sur l'analyse des profils de méthylation de divers promoteurs entre des lignées cellulaires et des cellules primaires tumorales (Hennessey *et al.*, 2011). Les résultats de cette étude mettent en évidence lors de la comparaison des deux modèles des hauts niveaux de méthylation de l'ADN pour les lignées, ce phénomène s'accompagnant d'une atténuation de l'expression de certains gènes.

Les études de co-culture sont également informatives puisqu'elles permettent d'évaluer les interactions cellules-cellules dans un environnement maîtrisé. Ainsi, des études de co-culture indirectes ont permis de mettre en évidence que les cellules stellaires pancréatiques stimulent la mobilité des cellules tumorales à travers la sécrétion de facteurs solubles (Hwang *et al.*, 2008 ; Vonlanfen *et al.*, 2008). D'autre part, des études de co-culture directes avec des cellules tumorales et des cellules stellaires ont permis de mettre en évidence une augmentation de la prolifération pour les deux types cellulaires et une augmentation de la synthèse de matrice de la part des cellules stellaires, en comparaison aux mono-cultures ou aux co-cultures indirectes (Fujita *et al.*, 2009).

Ainsi, par leur accessibilité, le modèle de lignée cellulaire tumorale constitue la base des études non-cliniques mais le recours à des modèles plus proches de la réalité clinique reste bien entendu très souvent nécessaire.

2. Les échantillons tumoraux de cancer du pancréas

La culture primaire quant à elle se rapproche de la clinique, au moins au départ, puisque les cellules présentent leurs propres anomalies génétiques vraisemblablement à l'origine de la pathologie cancéreuse. La difficulté est alors de maintenir le phénotype de ces cellules en culture *in vitro*, en évitant leur dérive qui peut être par exemple une différenciation avec acquisition de nouvelles molécules de surface.

Les échantillons tumoraux permettent la réalisation de vastes analyses génétiques et moléculaires comparatives, permettant l'élucidation des mécanismes de carcinogenèse, la mise en évidence des mutations récurrentes pour le cancer du pancréas et donc l'altération des voies de signalisation

intracellulaires. Les conséquences cliniques sont directes puisque ces études permettent d'apporter des pistes thérapeutiques en agissant sur ces acteurs clés dérégulés.

3. Les modèles *in vitro* 3D de cancer du pancréas

Ces modèles 3D, encore appelés sphéroïdes, vont présenter au fur et à mesure que la structure grossit, des degrés de prolifération variable avec des cellules en prolifération vers l'extérieur de la structure et des cellules quiescentes au centre de la structure (Laurent J *et al.*, 2013). Cette hétérogénéité est similaire à celle retrouvée au niveau de la tumeur, en cela, ces modèles sphéroïdes se rapprochent de la tumeur solide et constitue l'intermédiaire entre les cellules, formant une mono-couche en culture *in vitro*, et les modèles *in vivo* plus complexes. D'autre part, ces modèles semblent également plus pertinents que les modèles 2D lors du criblage de molécules pharmacologiques puisque l'organisation en sphéroïde réduit la pénétration des molécules, et la présence des cellules quiescentes au niveau du cœur hypoxique de la structure reflète davantage de ce qui se passe en clinique. Ainsi, la croissance cellulaire en 3D est différente de même que les réponses aux agents chimio-thérapeutiques, en comparaison des cellules en culture 2D. En effet, il a été rapporté par exemple une sensibilité différente à la gemcitabine entre des modèles 2D et 3D (Friedrich *et al.*, 2009). Cette sensibilité variable est également décrite pour de nombreux agents cytotoxiques, comme le montre la **Figure 5** où la viabilité des cellules PANC-1 cultivées en 2D et 3D est rapportée. On peut voir par exemple que 70% des cellules cultivées en 2D restent viables à une dose de gemcitabine de 1 μ M, contre 90% pour la culture 3D. Cela illustre bien l'importance l'organisation cellulaire et des interactions cellules-cellules lors de réponse aux agents cytotoxiques.

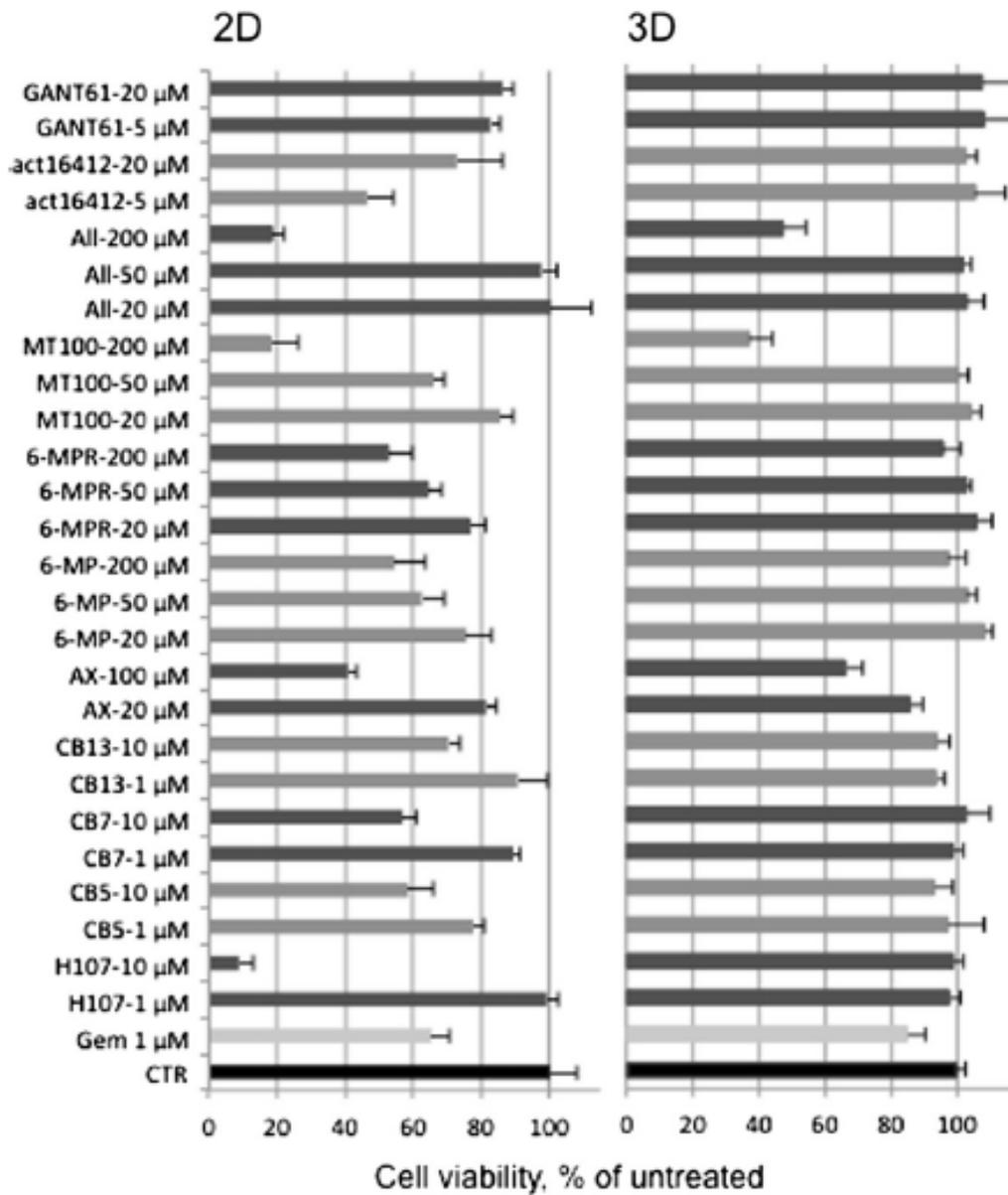


Figure 5: Comparaison de chimiorésistance entre des cultures en 2D et 3D pour de multiples agents cytotoxiques. Les histogrammes indiquent les résultats des essais de viabilité réalisés à partir de cellules PANC-1 cultivées en 2D et 3D. Les concentrations des agents cytotoxiques sont rapportées. Les données de viabilité correspondent à des pourcentages par rapport au control (non traité), chaque cytotoxique a été évalué 3 fois de manière indépendante. Gem : gemcitabine, All : allicin, AX : AXP-107-11. (Longati et al., 2013).

Différents types de modèles 3D existent et sont couramment utilisés :

- La culture à partir de tissu explanté ;
- La culture 3D à partir de cellules isolées ou de lignées cellulaires généralement mises en culture dans une matrice 3D souvent à base de collagène de type 1 ou de matériaux synthétiques. D'autre classe de matrices 3D existent, générées par des cellules stimulées

cultivées *in vitro* : par exemple des fibroblastes stimulés avec de l'acide ascorbique pour augmenter la production de collagène.

L'un des travaux pionnier en matière de culture 3D a été mené pour le cancer du sein où des cellules épithéliales mammaires ont été cultivées dans du matrigel (Debnath *et al.*, 2003 ; Petersen *et al.*, 1992). Cette approche a permis de mettre en évidence les différences de réponses cellulaires entre une culture 2D et une culture 3D ainsi que l'importance de la composition et de la rigidité de la matrice extracellulaire. En effet, les interactions avec le micro-environnement dont la matrice extra-cellulaire ont des conséquences sur la polarité cellulaire, l'organisation nucléaire et l'expression des gènes (Lelièvre, 2010).

Il existe également des co-cultures 3D développées à partir de plusieurs types cellulaires afin de se rapprocher davantage du micro-environnement tumoral. Ces co-cultures dites organotypiques ont d'abord été développées pour les cancers de la peau puis récemment étendues à d'autres types de cancers comme l'ovaire, le sein, la prostate, ou l'œsophage.

Un groupe anglais travaille beaucoup sur le développement de modèles organotypiques du cancer du pancréas, ces modèles permettant de caractériser les propriétés invasives des cellules cancéreuses et l'influence des cellules stellaires sur ces cellules invasives (Froeling *et al.*, 2010). De manière comparative avec les travaux menés sur le cancer du sein, la morphologie cellulaire diffère selon la lignée cellulaire utilisée, la composition de la matrice, la présence de cellule stromale, cependant la croissance des cellules dans ces modèles 3D présente des caractéristiques importantes des cellules épithéliales glandulaires retrouvées *in vivo*. L'un de ces modèles développés à partir de cellules tumorales du pancréas et intégrant des cellules stellaires a permis de mettre en évidence la perte de polarité des cellules épithéliales, qui forment une lumière à l'intérieure de la structure. Ce modèle a mis en évidence une translocation de la protéine Ezrin du pôle apical vers le pôle basal, lors des stades précoces de l'envahissement tumorale. Cette protéine appartient à la famille ERM, impliquées dans l'adhésion, la migration et l'organisation cellulaire.

Dans de nombreux cancers, et c'est également le cas pour le cancer du pancréas, ces modèles 3D permettent une meilleure connaissance de l'impact des mutations récurrentes, et de la dérégulation des voies de signalisation. Cela peut également conduire au développement de nouvelles thérapies ciblées, même si des résultats encourageant dans ces modèles 3D ne s'accompagnent pas toujours d'une réussite lors des phases cliniques. Des modèles de cultures organotypiques semblent également en cours d'étude en ajoutant des cellules immunitaires compte tenu de leur rôle dans la réaction de desmoplastie et l'inflammation à travers l'activation des cellules stellaires (Mews *et al.*, 2002).

B. L'approche *in vivo*

Les modèles *in vivo* sont essentiels pour permettre une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'initiation et la progression du cancer du pancréas. Ils permettent également la recherche et le développement de biomarqueurs et de molécules pharmacologiques.

1. Les modèles de greffes sous-cutanées

Ces modèles sont très largement utilisés compte tenu de la simplicité expérimentale requise et de la facilité de suivi de croissance tumorale. Ces modèles ont l'avantage de permettre une confirmation visuelle de la présence de la tumeur avant de recourir à une thérapie.

Néanmoins, la corrélation entre les résultats de telles études et ceux obtenus en clinique est faible. De nombreux facteurs peuvent expliquer cela:

- les lignées tumorales utilisées sont souvent cultivées depuis longtemps et présentent alors des génotypes et phénotypes qui s'éloignent peu à peu de la réalité clinique initiale ;
- seules quelques lignées cellulaires sont capables de donner une masse tumorale en greffes sous-cutanées, ce qui signifie que la localisation sous-cutanée n'est pas favorable à la majorité des lignées cellulaires. Une alternative consiste à greffer des fragments de tumeurs primaires, ou à greffer les lignées cellulaires en localisation orthotopique ;
- les cellules greffées pour lesquelles un suivi de la croissance tumorale est réalisé, poussent indépendamment de leur micro-environnement. Ainsi des agents thérapeutiques peuvent induire des régressions tumorales dans des modèles sous-cutanés et ne pas induire de réponse significative chez l'homme, le micro-environnement n'étant pas suffisamment relevant.

Pour l'ensemble de ces raisons, les modèles *in vivo* de xéno greffes orthotopiques semblent beaucoup plus pertinents, mais plus complexe à mettre en place.

2. Les modèles de greffes orthotopiques

Dans ces modèles, les cellules tumorales (ou le tissu tumoral primaire) sont implantées directement au niveau de l'organe dans lequel se développe la pathologie humaine, intégrant ainsi pleinement le micro-environnement naturel qui joue à la fois sur la croissance tumorale mais également sur la réponse tumorale aux agents thérapeutiques. En effet, le microenvironnement tumoral des carcinomes ductaux pancréatiques est complexe puisqu'il comprend des cellules épithéliales, des cellules immunitaires, des fibroblastes, des cellules endocriniennes, et des cellules stellaires pancréatiques.

L'une des preuves de l'efficacité de telles greffes est qu'elles soient capables d'induire des métastases de manière beaucoup plus fréquente que les greffes sous-cutanées (Talmadge *et al.*, 2007). La difficulté de ces modèles est qu'ils soient plus difficiles à mettre en place expérimentalement, mais cela va dépendre du site d'implantation et donc de l'accessibilité de l'organe, et que la masse tumorale ne soit pas directement appréhendable, contrairement aux greffes sous-cutanées. La croissance tumorale pourra alors être détectée par exemple par imagerie en implantant des cellules transfectées permettant l'expression d'une protéine fluorescente ou de la luciférase (Cf 4. Construction de lignées stables bioluminescentes pour l'élaboration de nouveaux modèles *in vivo* de cancer du pancréas). Néanmoins, malgré les difficultés de mise en œuvre, ces modèles sont préférés compte tenu de leur relevance clinique.

Ces modèles orthotopiques offrent la possibilité d'étudier :

- le profil génétique des cellules implantées initialement et son impact sur la croissance tumorale, la génération de métastases, la réponse aux agents génotoxiques ;
- l'efficacité anti-tumorale de différents agents thérapeutiques : régression tumorale, réduction des métastases ;
- le processus métastatique ;
- l'infiltrat immunitaire pour les modèles syngéniques orthotopiques.

3. Les modèles transgéniques

Pour créer les modèles transgéniques, une multitude d'approches est utilisée afin de cibler l'expression de mutant ou de gènes endogènes spécifiques, il en résulte un large spectre de changements pathologiques. Certains modèles sont semblables à la pathologie humaine alors que d'autres ne le sont pas. Selon le modèle de carcinogenèse précédemment décrit (Cf 1. La carcinogenèse), 4 à 5

événements génétiques sont requis pour permettre le passage d'un épithélium normal vers un carcinome. La néoplasie intraépithéliale pancréatique (PanIN pour Pancreatic Intraepithelial Neoplasia) est la forme précurseur non invasive du cancer du pancréas. Parmi les modèles murins disponibles, certains reproduisent seulement cette forme précurseur PanIN et d'autres progressent vers un carcinome pancréatique invasif.

Etant donné que la mutation activatrice de l'oncogène *kras* constitue l'altération génétique la plus fréquente des cancers du pancréas, avec plus de 90% pour les adénocarcinomes pancréatiques, la plupart des modèles murins transgéniques présentent cette activation de l'oncogène. Néanmoins, cette mutation seule n'étant pas suffisante pour induire la progression jusqu'au stade invasif de l'adénocarcinome pancréatique, différents transgènes ont été utilisés pour générer des modèles combinés allant jusqu'à la pathologie invasive et métastatique.

Le modèle transgénique classique est basé sur la mutation *kras* (PDX-1-Cre/Lox-Stop-Lox (LSL)-Kras ou p48/LSL-Kras) avec des délétions ou mutations de *Ink4*, *tp53*, *Mist*, *Smad4* ou *TGFβ* (Herreros-Villanueva *et al.*, 2012). Le **Tableau 3** dresse les modèles de souris transgéniques de cancer du pancréas les plus couramment utilisés pour évaluer le rôle des gènes et des voies de signalisation, de l'impact de l'environnement, des co-morbidités et les réponses à diverses thérapies (adjuvante, néo-adjuvante et anti-métastatique).

Tableau 3 : Modèles murins de cancer du pancréas

Genotype (reference)	Time of expression	Time to tumor development (mo)	Pancreatic cancer phenotype	Survival (mo)
PDX-1-Cre; LSL-Kras ^{G12D} [39]	E8.5	6	PDAC; penetrant PanIN; age dependent increase severity; occasionally PDAC with long latency	16
P48 ^{Cre} ; LSL-Kras ^{G12D} [40]	E9.5	8	PDAC; penetrant PanIN; age dependent increase severity; occasionally PDAC with long latency	16
PDX-1-Cre; LSL-Kras ^{G12D} ; LSL-Trp53 ^{R172H/-} [24]	E8.5	2-3	PDAC	5-6
Mist1 ^{KrasG12D/+} [25]	E10.5	2	Accelerated PanIN; well differentiated PDCA Accelerated development of acinar-derived PanIN; mixed subtypes pancreatic cancer	10.8
KPCB ^{w1/w1} [42]	E8.5	2-3	PDAC	5.6
KPCB ^{w2/w2} [42]	E8.5	3	PDAC	4.8
KPCB ^{w3/w3} [42]	E8.5	1.5	PDAC; mixed	2.8
CKB ^{w4/w4} [41]	E8.5	6	PDAC	12
CKB ^{w5/w5} [41]	E8.5	6	PDAC	13.5
CPB ^{w6/w6} [41]	E8.5	3-5	PDAC; mixed	10
Pdx1-Cre; Kras ^{G12D} ; Ink4a/Air ^{lox/lox} [23]	E8.5	2	PDAC; accelerated development of PanIN; poorly differentiated PDAC	2-3
Pdx1-Cre; Kras ^{G12D} ; Smad4 ^{lox/lox} [25]	E8.5	2-3	IPMN; PDAC	2-6
Ptfla ^{Cre} ; LSL-Kras ^{G12D/+} ; Tgfr2 ^{lox/lox} [27]	E9.5	1	PDAC; accelerated PanIN; PDAC development	2

PDAC : Ductal Adenocarcinoma of the Pancreas ; PanIN : Pancreatic Intraepithelial Neoplasia; IPMN: Intraductal Papillary Mucinous Neoplasia.

4. Construction de lignées stables bioluminescentes pour l'élaboration de nouveaux modèles *in vivo* de cancer du pancréas

Le stage que j'ai réalisé au sein du Centre de Recherche en Oncologie Expérimentale (CROE) des Laboratoires Pierre Fabre avait pour but de mettre au point des lignées cellulaires de cancer du pancréas (les cellules MIA PaCa-2) exprimant de manière stable la luciférase afin de les implanter chez la souris. Dans un premier temps, seules des greffes sous-cutanées ont été réalisées pour une première évaluation de ces lignées stables *in vivo*, mais l'idée initiale était de réaliser des greffes orthotopiques au niveau du pancréas des souris. Ces modèles élaborés au sein du CROE pourraient servir d'outil pour l'évaluation de molécules pharmacologiques.



Université
de Toulouse



Rapport de stage d'application
Filière industrie



Centre de recherche et développement Pierre Fabre,
Toulouse

*Établissement de modèles cellulaires par
intégration ciblée et application à la
pharmacologie préclinique en oncologie*

Par Cindy Cavelier

Maîtres de stage : Dr. B. Gomes et Dr. L. Créancier

Faculté de Pharmacie de Toulouse

SOMMAIRE

RESUME.....	p47
I - INTRODUCTION.....	p48
II – MATERIEL ET METHODES.....	p50
III – RESULTATS.....	p53
A – Etablissement d'une lignée bioluminescente stable de carcinome du pancréas.....	p53
1) Construction des vecteurs pZDSV40-Luc 2, pZDEF1a-Luc 2 et pZDCMV-Luc 2.....	p53
2) Génération et sélection des clones MIA Paca-2 pZDSV40-Luc2 et MIA PaCa-2 pZDEF1a-Luc 2 bioluminescents.....	p54
3) Caractérisation <i>in vitro</i> des lignées bioluminescentes MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc2 et MIA PaCa-2 pZDEF1a-Luc 2.....	p56
4) Stabilité de la bioluminescence <i>in vitro</i> à long terme des clones MIA Paca-2 pZDSV40-Luc2.....	p58
B - Etablissement d'une lignée bioluminescente stable de cancer de la prostate.....	p60
1) Génération de clones DU145 bioluminescents.....	p60
2) Caractérisation <i>in vitro</i> des lignées bioluminescentes DU145 pZDSV40-Luc2.....	p61
3) Stabilité de la bioluminescence <i>in vitro</i> à long terme des clones DU145 pZDSV40-Luc 2.....	p62
C - Caractérisation <i>in vivo</i> de la lignée MIA PaCa-2 bioluminescente : pertinence de l'outil de pharmacologie.....	p64
1) Greffe de la lignée bioluminescente MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2 chez la souris immunodéficente Swiss Nude.....	p64
2) Caractérisation <i>in vivo</i> des clones bioluminescents MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2.....	p65
D – Caractérisation <i>in vivo</i> de la lignée DU145 bioluminescente : pertinence de l'outil de pharmacologie.....	p67
1) Greffe de la lignée bioluminescente DU145 pZDSV40-Luc 2 chez la souris immunodéficente Scid.....	p67
2) Caractérisation <i>in vivo</i> des clones bioluminescents DU145 pZDSV40-Luc 2.....	p68
IV - DISCUSSION.....	p70
V - BIBLIOGRAPHIE.....	p72
VI - ANNEXES.....	p73

RESUME

Dans le domaine de la recherche de nouveaux médicaments en oncologie, nous avons très souvent recours à des lignées cancéreuses bioluminescentes puisqu'elles permettent une analyse simple, rapide et peu onéreuse de la progression tumorale et de la présence éventuelle de sites métastatiques secondaires grâce à des techniques d'imagerie. L'utilisation de ces lignées bioluminescentes nécessite de modifier le patrimoine génétique des cellules initiales en ajoutant un gène de la *luciférase* sous le contrôle d'un promoteur choisi. Une réaction enzyme (luciférase) / substrat (luciférine ajoutée) va induire une libération de photons qui seront analysés par un système d'imagerie. Cela permet d'appréhender le volume tumoral. De manière traditionnelle, la construction de ces lignées se fait par insertion génomique aléatoire du gène de la *luciférase* où le site ainsi que le nombre de copies insérées du gène dans le génome ne sont pas des éléments maîtrisés. Pour pallier ces problèmes, nous avons testé un système permettant une insertion du gène de la *luciférase* au niveau d'un locus de choix, le locus *aavs1* du chromosome 19. L'interruption de ce gène est décrite comme sans conséquence pour la cellule.

Ce système d'intégration ciblée nous a permis d'obtenir des clones présentant des niveaux de bioluminescence *in vitro* satisfaisants pour une des lignées cellulaires de carcinome du pancréas (lignée MIA Paca-2) et de cancer de la prostate (lignée DU145). Des études de stabilité *in vitro* ont été menées en présence et en absence de pression de sélection, le signal de bioluminescence étant uniquement maintenu en présence d'antibiotique.

D'autre part, une étude *in vivo* a également été réalisée pour les clones MIA PaCa-2 et DU145, permettant une première évaluation *in vivo* des performances de ce nouveau système par intégration ciblée.

Pour conclure sur les études menées lors de ce stage, on peut dire que des résultats encourageants ont été obtenus à la fois *in vivo* et *in vitro*, toutefois de meilleures performances *in vivo* étaient attendues compte tenu des forts niveaux de bioluminescence obtenus lors de la sélection des clones.

I - INTRODUCTION

Dans le domaine de la recherche médicale en oncologie, il est très souvent nécessaire d'avoir recours à des modèles animaux tels que les rongeurs afin d'effectuer des recherches les plus pertinentes possibles dans un organisme vivant afin de se rapprocher de la pathologie cancéreuse rencontrée chez l'homme. En effet, chez les rongeurs il est possible de réaliser des greffes orthotopiques pour implanter des cellules cancéreuses issues de patients ou de lignées cancéreuses directement sur le site anatomique qui a contracté la tumeur, permettant de recréer un microenvironnement proche de la réalité pathologique. D'autre part, et c'est tout l'intérêt de travailler également chez l'animal vivant, les tumeurs initiales greffées peuvent développer des métastases donc des foyers tumoraux secondaires qui pourront présenter des nouvelles caractéristiques en terme par exemple de migration cellulaire ou de résistance aux traitements anti-tumoraux. Travailler chez le rongeur va nécessiter d'avoir recours à des systèmes d'imagerie pour appréhender la tumeur qui n'est pas toujours palpable, comme c'est le cas chez l'homme. De nombreuses techniques d'imagerie utilisées chez l'homme ont été transposées aux rongeurs : IRM, scanner, TEP-SCAN (qui fait appel à des radionucléides) (O'Farrell et al., 2013)... Parmi ces techniques d'imagerie, il existe également une méthode de choix bien qu'elle ne soit pas transposable en clinique, appelée bioluminescence. Celle-ci est très utilisée en recherche médicale car elle est beaucoup moins onéreuse que les autres, et permet également la visualisation de la tumeur et/ou de ses métastases de façon rapide et non invasive (Kelkar and De, 2012). Par cette méthode, la tumeur devient donc détectable en imagerie, pour cela il est nécessaire de modifier le patrimoine génétique des cellules tumorales greffées en ajoutant, par des techniques de biologie moléculaire, le gène de la *luciférase*. L'enzyme luciférase, obtenue après traduction, va catalyser l'oxydation de son substrat, la luciférine, qui sera injectée avant l'imagerie. Cette réaction enzyme / substrat est à l'origine d'une libération de photons. Ces photons émis au sein de la tumeur vont traverser la peau du rongeur pour être détectés par des systèmes d'imagerie qui permettront la visualisation de la tumeur et/ou de ses sites métastatiques. Cette visualisation de la bioluminescence par imagerie permet d'appréhender la masse tumorale, cet outil est donc très utilisé pour des évaluations de l'efficacité de nouvelles molécules anti-cancéreuses. On peut citer par exemple des évaluations par bioluminescence *in vivo* de l'efficacité de nouvelles molécules anti-cancéreuses (Kruczynski et al., 2013) ou bien encore d'anticorps monoclonaux (Mittra et al., 2013).

L'une des techniques de biologie moléculaire les plus utilisées pour permettre l'ajout du gène de la luciférase au niveau cellulaire est une intégration génomique aléatoire par transfection cellulaire. Malgré les grands avantages que représente ce système d'intégration aléatoire en terme d'imagerie de la tumeur, un certain nombre de limites existent et sont largement décrites dans la littérature (Ellis, 2005, Li et al., 2013). En effet, le site d'insertion du gène de la *luciférase* ainsi que le nombre de copies intégrées au niveau du génome sont difficilement déterminables, donc très souvent méconnus. Les lignées bioluminescentes obtenues par ce système d'intégration aléatoire ne peuvent pas être reproductibles et ne sont donc pas comparables d'une lignée construite à l'autre, l'insertion génomique se faisant aléatoirement. D'autre part, lorsque l'insertion a lieu au niveau de sites moins favorables du

génomique, il peut y avoir des effets délétères pour la cellule appelés effets *off-target* qui ne sont pas toujours maîtrisés. Pour finir, ce type de construction peut également être sujet à des régulations épigénétiques ou à des événements de répression génique à long terme. Ces événements pourront avoir pour conséquence une atténuation des signaux de bioluminescence au cours du temps, rendant l'utilisation des lignées bioluminescentes ainsi construites impossible. Pour pallier ces phénomènes, nous proposons d'évaluer un autre système d'intégration du gène de la *luciférase*, cette fois par intégration ciblée. La particularité et le grand intérêt de ce système est qu'il permet une maîtrise du site d'intégration du gène au niveau d'un locus génomique de choix, le locus *aavs1* du chromosome 19 (Linden et al., 1996, Lombardo et al., 2003). L'intégration au niveau de ce site a été retenue puisqu'elle ne semble pas avoir d'effet délétère au niveau de la cellule, ce site codant une protéine p84 dont la fonction n'est actuellement pas connue (Lombardo et al., 2011). Techniquement, les séquences que l'on souhaite insérer (gène de résistance à un antibiotique pour la sélection clonale – *promoteur* – *luciférase*) vont être insérées dans un vecteur commercialisé par Sigma-Aldrich. Celui-ci présente de part et d'autre du site de clonage des séquences d'homologie au locus *aavs1*. L'insertion ciblée au niveau du locus nécessite en premier lieu une coupure double brin de l'ADN qui sera réalisée par une endonucléase FokI (apportée sous forme d'ARNm lors de la transfection cellulaire). Celle-ci a été fabriquée par bio-ingénierie de manière à permettre la reconnaissance spécifique de 24 acides aminés du gène *aavs1* par l'intermédiaire de structure en triple hélice accolées au domaine nucléase de FokI. La coupure génomique ne sera possible que lorsque FokI sera sous sa forme dimérisée adhérant alors à 24 acides aminés complémentaires situés sur le gène *aavs1*. En théorie, la coupure n'est donc spécifique que de cette séquence sur l'ensemble du génome. Une fois que la coupure double brin de l'ADN a eu lieu à cet endroit précis, les séquences d'homologie du gène *aavs1* situées sur le vecteur transfecté, et qui encadrent les gènes à insérer, vont servir de matrice à une polymérase venant réparer la cassure par un mécanisme de recombinaison homologue. L'utilisation d'antibiotique permettra ensuite la sélection des clones susceptibles d'avoir intégré une partie ou la totalité des gènes souhaités.

Les objectifs de mon stage d'application au sein des laboratoires de l'Institut de Recherche Pierre Fabre ont été de : i) mettre au point techniquement ce nouveau système, ii) évaluer la bioluminescence des lignées établies *in vitro* et *in vivo* (niveau de bioluminescence, stabilité au cours du temps), iii) créer des lignées stables bioluminescentes de carcinomes de pancréas et de la prostate par intégration ciblée avec le système précédemment décrit, iv) comparer les signaux de bioluminescence obtenu en fonction du promoteur choisi pour contrôler l'expression de la luciférase.

II - MATERIEL ET METHODES

Construction des vecteurs pZDSV40-Luc 2, pZDCMV-Luc 2 et pZDEF1a-Luc 2

Au vecteur de départ commercialisé pZDonor-AAVS1 Puromycin (Sigma-Aldrich) est ajouté le gène de la *luciférase* sous le contrôle du promoteur SV40 (Simian Virus 40) après digestion enzymatique du vecteur pGL4.13 SV40-Luc 2.

Les deux autres constructions sont ensuite obtenues à partir du vecteur précédent pZDSV40-Luc 2 en remplaçant le promoteur SV40 (ôté par digestion enzymatique) par les promoteurs EF1a (Eucaryotic Elongation factor 1 alpha) et CMV (cytomégalovirus) issus respectivement des vecteurs pEF1 HisA et hSHC pRLuc. Les promoteurs d'intérêt sont amplifiés par PCR en utilisant respectivement les oligonucléotides 1158 et 1159 pour CMV, et 1225 et 1226 pour EF1a, en suivant le protocole de la polymérase Phusion® High-Fidelity (Thermo Scientific). Ces PCR ainsi que les suivantes sont réalisées sur l'appareil T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD). Après purification de l'ADN correspondant aux promoteurs contenu dans un gel BET-agarose 1% grâce au kit d'extraction d'ADN PureLink® (Invitrogen), les fragments promoteurs sont insérés en bord franc dans un vecteur de sous-clonage appelé pJET1.2® (CloneJET™ PCR Cloning Kit, Thermo Scientific) pour être ensuite insérés après digestions enzymatiques EcoRI/HindIII dans le vecteur pZDSV40-Luc 2, lui-même préalablement digéré par les enzymes de restriction EcoRI et HindIII pour ôter le promoteur SV40 et ainsi créer des extrémités cohésives. L'insertion se fait par ligation en utilisant la T4DNA ligase® (Promega) en respectant le protocole du fournisseur. Les vecteurs pZDEF1a-Luc 2 et pZDCMV-Luc 2 sont obtenus après transformation de bactéries chimio-compétentes Top 10® (Invitrogen) mises en culture sur boîte de pétri dans du milieu en présence d'ampicilline (InvivoGen). Seules les bactéries ayant reçu le vecteur seront capables de pousser sur ce milieu puisqu'elles seront devenues résistantes à l'ampicilline. Les vecteurs ainsi amplifiés sont ensuite purifiés sur colonnes selon le protocole fourni par Qiagen (QIAprep® Spin Miniprep). L'ADN des vecteurs est dosé par mesure de l'absorbance à 260 nm sur l'appareil BioPhotometer (Eppendorf®).

Les trois constructions, pZDSV40-Luc 2, pZDEF1a-Luc 2 et pZDCMV-Luc 2 sont validées par digestions enzymatiques en comparant les profils établis par cartographies des vecteurs et les profils obtenus révélés sur gel d'agarose 1% (cf annexes).

Co-Transfection pZDSV40-Luc 2 / pZDEF1a-Luc 2 / ARNm ZFN des cellules MIA PaCa-2 et DU145

Les cellules sontensemencées en plaque 6 puits à 600 000 cellules par puits pour les MIA PaCa-2 et 300 000 pour les DU145 la veille du protocole de co-transfection dans leur milieu de culture habituel (DMEM 10% SVF pour les MIA PaCa-2 et MEM 5% SVF pour les DU145, complété par des antibiotiques et des antifongiques). Au moment de la co-transfection, le milieu est remplacé par du milieu sans antibiotique. La co-transfection vecteur pZDSV40-Luc 2 ou pZDEF1a-Luc 2 + ARNm ZFN (Zing Finger Nuclease) est réalisée selon le protocole du kit fourni par Sigma-Aldrich (TransIT®-mRNA Transfection

Kit). L'utilisation d'ARNm ZFN a nécessité un nettoyage préalable des vecteurs pZDSV40-Luc 2 et pZDEF1a-Luc 2 au phénol-chloroforme afin d'éliminer la présence éventuelle de RNase. La concentration du vecteur utilisé est de 2µg / Kb, selon les recommandations du fournisseur du kit Compozr® pZDonor-AAVS1 Puromycin Vector Kit (Sigma-Aldrich).

Etablissement des lignées stables bioluminescentes

1) sélection des clones résistants

48 heures après co-transfection, 1/4 des cellules est utilisé pour réaliser une extraction d'ADN sur culot sec grâce au protocole du kit Smart D-N-Adem® (Ademtech), les 3/4 restants sont ensemencés sur 4 boîtes de pétri de diamètre 100mm en présence de 10 mL de milieu de culture habituel. 5 jours après la co- transfection, l'antibiotique de sélection, la puromycine, est ajouté à une concentration de 0.4 µg / mL. L'apparition des clones résistants est repérée au microscope ainsi qu'à l'œil nu. Après 3 semaines, la récupération des clones pour individualisation en plaque 24 puits est réalisée lorsque que les clones ont atteint une taille d'au moins 3 mm, en essayant qu'ils soient le plus individualisés possible. Cette taille leur permettra une bonne reprise lors de la remise en culture.

2) Sélection des clones bioluminescents

Les clones proliférants sur boîte de pétri (100 mm) dans 10 mL de milieu complet avec puromycine 0.4 µg/mL, sont repris dans du PBS en présence de luciférine (150 µg/mL) 10 minutes avant l'imagerie. Ces boîtes sont ensuite placées une par une dans une chambre noire où un système d'acquisition par caméra CCD refroidie permet la détection de la bioluminescence, qui correspond à une émission de photons par réaction enzymatique entre l'enzyme luciférase et le substrat luciférine en présence d'oxygène (caméra CCD refroidie de type NightOWL (LB 983 NC100), Berthold Technologies). Les clones bioluminescents sont alors repérés par superposition d'une photo prise dans le visible ainsi que l'image correspondant à l'émission de photons détectés par la caméra. On peut ainsi les repérer sur la boîte de pétri et donc les isoler spécifiquement pour les remettre en culture dans une plaque 24 puits.

3) Détermination de la bioluminescence *in vitro*

La bioluminescence *in vitro* individuelle est établie pour chaque clone en prélevant 600 000 cellules après comptage cellulaire, un culot sec est ensuite réalisé. Ce culot est alors repris dans 100 µL de Passive Lysis Buffer® (Promega) puis congelé à -20°C au moins 24h. 20 µL sont ensuite prélevés et déposés dans une plaque 96 puits, 200 µL de luciférine sont ajoutés (Luciferase Assay Substrate®, Promega). La lecture de la bioluminescence est effectuée sur l'appareil Topcount™ (PerkinElmer ®).

4) Evaluation de l'intégration ciblée au niveau du locus *aavs1*

300 000 cellules de chaque clone sont prélevées après comptage cellulaire, un culot sec est préparé, l'ADN de celui-ci peut être extrait directement sur culot frais ou sur culot congelé à -20°C. L'extraction d'ADN est réalisée avec le kit Smart D-N-Adem® (Ademtech) en suivant précisément les recommandations du fournisseur. L'ADN extrait se conserve plusieurs mois à -20°C. L'intégration au

niveau du locus *aavs1* est ensuite évaluée par PCR selon le protocole de la polymérase Phusion® High-Fidelity (Thermo Scientific) en utilisant les amorces *AAVS1 Forward Primer* (5' cggactctgcccttaacg 3') et *Puro Reverse Primer* (5' tgaggaagagttcttcagct 3'), ainsi que des oligonucléotides témoins 965-966 disponibles au laboratoire, permettant l'amplification d'une séquence humaine spécifique du chromosome 17. La température d'hybridation des amorces utilisée est de 58°C, les oligonucléotides sont utilisés à une concentration de 500 nM.

Grefe sous-cutanée des cellules bioluminescentes MIA PaCa-2 et DU145 chez la souris

Les greffes des cellules bioluminescentes sont réalisées en sous-cutanée chez des souris immunodéficiente de souche Swiss nude pour les clones MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2 et de souche Scid pour les clones DU145 pZDSV40-Luc 2 (Charles River Laboratories). Les cellules à administrer sont cultivées en milieu sans antibiotique lors de leur dernier passage. Avant la réalisation de l'injection sous-cutanée, les cellules sont comptées et reprises à 50 millions par mL dans du PBS. 10 millions de cellules sont injectées par souris. Le poids ainsi que la croissance tumorale de chaque souris, mesurée au pied à coulisse, sont évalués chaque semaine. Pour évaluer la bioluminescence provenant de la tumeur sous-cutanée, une injection intra-péritonéale de 300 µL de luciférine à 10 mg/mL est pratiquée. Un délai d'incubation de 6 minutes environ est réalisé où la souris est laissée libre dans sa cage pour permettre une bonne diffusion du substrat à l'ensemble des tissus. La souris est ensuite anesthésiée avec de l'isoflurane à 4% (1L/min d'air, 0,4L/mL O₂) dans une chambre prévue à cet effet pendant 1 à 2 minutes, puis placée en chambre noire où l'anesthésie est maintenue grâce à l'utilisation de masques individuels pour chaque souris (isoflurane 2%). L'acquisition du signal de bioluminescence peut alors débuter, 10 minutes environ après administration du substrat. Les paramètres sélectionnés pour la caméra CCD refroidie sont de 30 secondes avec un binning de 1*1 pour les clones MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2, et de 1 minute avec un binning de 4*4 pour les clones DU145 pZDSV40-Luc 2 (NightOWL (LB 983 NC100), Berthold Technologies).

III – RESULTATS

A - Etablissement d'une lignée bioluminescente stable de carcinome du pancréas

1) Construction des vecteurs pZDSV40-Luc 2, pZDEF1a-Luc 2 et pZDCMV-Luc 2

Chacune des constructions effectuées à partir du vecteur pZDonor-AAVS1 Puromycin commercialisé diffère seulement par le choix du promoteur qui va contrôler le gène de la *luciférase*. L'intérêt est donc de voir s'il existe des niveaux d'expression variables du gène de la *luciférase in vitro* et/ou *in vivo* au cours du temps. Ces variabilités pourraient dépendre de différents types de régulation survenant au niveau du promoteur de la *luciférase* au cours du temps. En effet, il est par exemple rapporté dans la littérature que le promoteur EF1a, qui est un promoteur cellulaire donc plus long que les promoteurs viraux CMV ou SV40, est de configuration ouverte. À ce titre, il semble être moins sujet aux différents événements épigénétiques, ou bien encore à la répression transcriptionnelle et serait ainsi transcrit de manière constante (Lombardo et al., 2011).

Les constructions finales pZDSV40-Luc 2, pZDEF1a-Luc 2, pZDCMV-Luc 2, comprenant les trois promoteurs différents devant le gène de la *luciférase*, ont été validées par digestions enzymatiques en comparant le profil attendu décrit dans les cartographies établies et les profils obtenus révélés sur gel BET-agarose 1% (Fig 1, Annexes). La digestion du vecteur pZDSV40-Luc 2 par les enzymes EcoRI et NotI permet d'obtenir 3 fragments à 5595 pb, 2389 pb et 12 pb (ce dernier n'est pas visualisable sur le gel d'agarose) (Fig 1a). La digestion des vecteurs pZDCMV-Luc 2 et pZDEF1a-Luc 2 par les enzymes XhoI, XmnI et NdeI permet d'obtenir respectivement des fragments de 5068 bp, 1807 pb et 1281 pb, ainsi que 4926 pb, 1807 bp, 1347 pb et 666 bp (Fig 1 b). En plus de ces profils de digestion qui semblent corrects, une vérification des séquences de chacun des vecteurs sera également nécessaire pour permettre leur validation définitive.

Ces trois vecteurs que nous venons de construire, pZDSV40-Luc 2, pZDEF1a-Luc 2 et pZDCMV-Luc 2 à partir du vecteur pZDonor-AAVS1 Puromycin, présentent comme le vecteur initial, 2 séquences d'homologie HAL et HAR avec le gène *aavs1* du chromosome 19 (HAR/L : Homology Arm Right / Left). Celles-ci vont permettre l'intégration ciblée de la partie située entre HAL et HAR (HAL – *puromycine* – promoteur – *luciférase* – HAR). Ces séquences HAL et HAR serviront de matrice pour la polymérase lors de la réparation de l'ADN par recombinaison homologue.

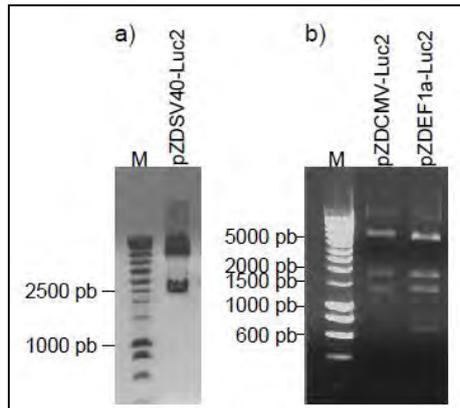


Fig 1 : Profils de digestions enzymatiques des vecteurs pZDSV40-Luc 2, pZDCMV-Luc 2 et pZDEF1a-Luc 2 sur gel BET - agarose 1%

a) La digestion du vecteur pZDSV40-Luc 2 par les enzymes EcoRI et NotI donnent après migration 3 fragments de 5595 pb, 2389 pb et 12 pb (ce dernier n'est pas visualisable). b) La digestion des vecteurs pZDCMV-Luc 2 et pZDEF1a-Luc 2 par les enzymes XhoI, XmnI et NdeI permet d'obtenir respectivement des fragments de 5068 pb, 1807 pb et 1281 pb, ainsi que 4926 pb, 1807 pb, 1347 pb et 666 pb.

2) Génération et sélection des clones MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2 et MIA PaCa-2 pZDEF1a-Luc 2 bioluminescents

Dans un premier temps, nous avons choisi d'établir une lignée bioluminescente à partir des cellules MIA Paca-2 par co-transfection du vecteur pZDSV40-Luc 2 construit précédemment et de l'ARNm ZFN. Cette co-transfection se fait en utilisant le kit TransIT-mRNA Transfection (Mirus ®) qui va créer une enveloppe lipophile autour du vecteur et de l'ARNm pour permettre son passage au travers de la membrane cellulaire.

Comme décrit dans l'introduction, la particularité de ce kit est qu'il permet une insertion génomique ciblée au niveau du locus *aavs1* grâce à l'utilisation de l'endonucléase FokI (apportée sous forme d'ARNm). Celle-ci, fabriquée par bio-ingénierie, est spécifique du gène *aavs1*, et ne pourra donc cliver le génome qu'à cet endroit précis. D'autre part, la présence des séquences d'homologie HAL et HAR du gène *aavs1* situées sur le vecteur pZDSV40-Luc 2 permet, après cassure double brin, une intégration des gènes d'intérêt par un mécanisme de réparation de l'ADN par recombinaison homologue (cf Annexes).

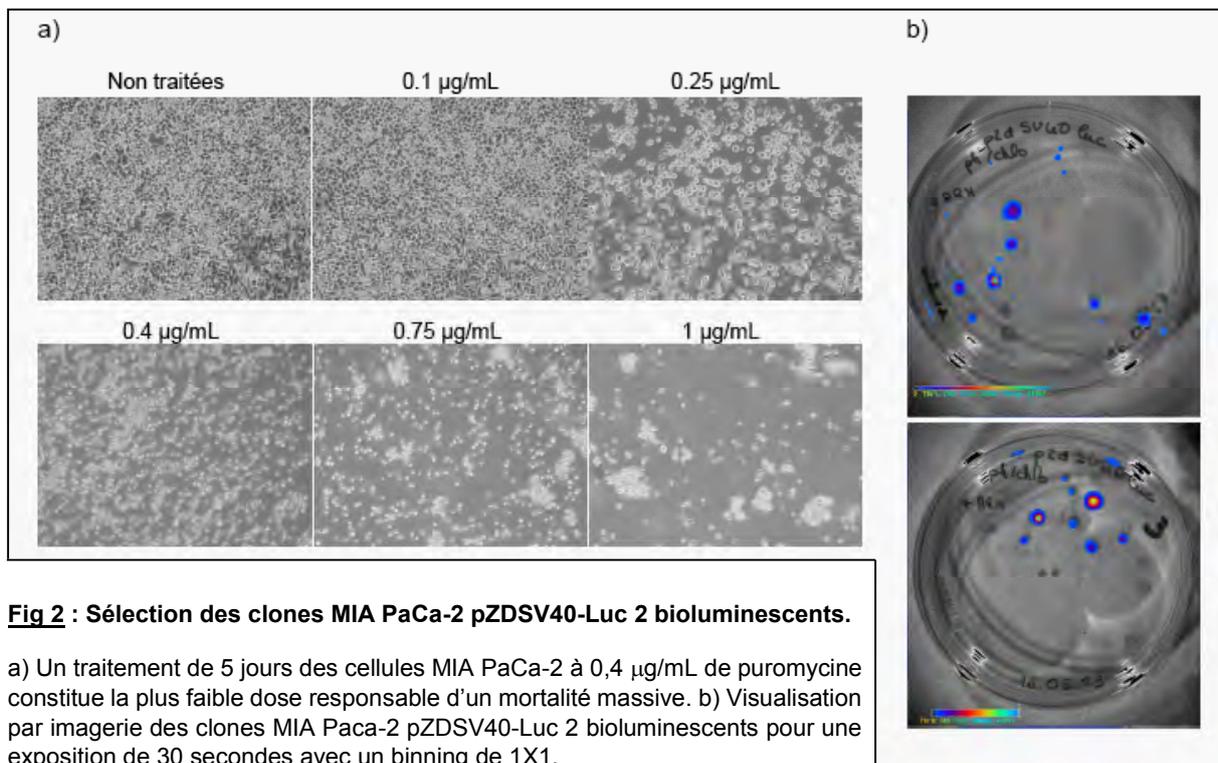
La sélection des clones MIA PaCa-2 susceptibles d'avoir intégré une partie ou l'ensemble du fragment d'intérêt se fait par utilisation de l'antibiotique puromycine, puisque le fragment intégré va conférer la résistance à la puromycine. La dose d'antibiotique utilisée a été établie par traitement à la puromycine des cellules MIA PaCa-2 non transfectées à des doses croissantes pendant 5 jours. La dose de 0.4 µg / mL retenue pour la sélection constitue la plus petite dose à partir de laquelle les cellules meurent massivement à 5 jours (Fig 2 a)). La sélection puromycine des clones résistants est effectuée pendant 3 semaines avant individualisation pour leur permettre ainsi de proliférer et d'atteindre une taille de 5 mm requise pour une bonne reprise lors de leur remise en culture.

Une pré-sélection des clones est effectuée par imagerie à l'aide d'une caméra CCD capable de capter l'émission de photons et ainsi mettre en évidence les clones bioluminescents parmi l'ensemble des clones résistants à la puromycine proliférant sur la boîte de pétri. Le milieu de culture des clones est

transitoirement remplacé par du PBS auquel on ajoute la luciférine, qui en présence de son enzyme luciférase, va permettre l'émission de photons, et donc l'analyse de bioluminescence.

Le repérage des clones bioluminescents se fait alors grâce à la superposition d'une image prise dans le visible (photo en noir et blanc, Fig 2b)) et d'une image correspondant à la détection de la bioluminescence captée par la caméra. Initialement, ce signal apparaît en nuance de gris, on peut le rendre plus visuel grâce à une échelle de fausses couleurs, c'est ce que l'on peut voir sous forme de spot de couleur dans la figure 2 b). 41 clones ainsi mis en évidence ont été récupérés de manière individuelle et remis en culture pour amplification. De manière quantitative, environ 50% des clones résistants à la puromycine sont bioluminescents. Cela signifie que parmi les 50% restants, pour certains clones l'expression de la luciférase n'est probablement pas suffisante pour permettre une détection de bioluminescence, et pour d'autres l'intégration du gène de la luciférase et/ou de son promoteur n'a pas ou partiellement pas eu lieu. Une nouvelle évaluation de la bioluminescence *in vitro* a été ensuite réalisée pour chacun des 41 clones sélectionnés après amplification. Cette fois la mesure a été réalisée dans des conditions plus standardisées afin de retenir 12 clones seulement pour poursuivre l'étude.

De la même manière, l'établissement des clones MIA PaCa-2 pZDEF1a-Luc 2 a été réalisé selon le même protocole de co-transfection et de pré-sélection en imagerie que les clones MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2. Nous avons cette fois retenu, individualisé et amplifié 15 clones seulement sur la base de leur niveau de bioluminescence en imagerie.



3) Caractérisation *in vitro* des lignées bioluminescentes MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2 et MIA PaCa-2 pZDEF1a-Luc 2

Nous avons procédé à une évaluation *in vitro* des niveaux de bioluminescence pour l'ensemble des 41 clones MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2 et des 15 clones MIA PaCa-2 pZDEF1a-Luc 2 sélectionnés puis isolés après imagerie. La lecture du signal de bioluminescence, c'est-à-dire des photons émis par 120 000 cellules issues de chaque clone, est effectuée par l'appareil TopCount (Perkin Elmer®). Ce signal est ensuite rapporté à 10 000 cellules (Fig 3). Si l'ensemble des 41 clones présente un signal de bioluminescence, on peut noter toutefois une grande variabilité de celui-ci, allant de quelques milliers à plus de 2,5 millions photons/pixel/seconde pour les signaux les plus forts. À partir de ces résultats, nous avons retenu 6 clones de différents niveaux de bioluminescence pour poursuivre l'étude. D'autre part, la bioluminescence obtenu pour les 15 clones MIA PaCa-2 pZDEF1a-Luc 2 est beaucoup plus homogène et d'un niveau relativement élevé (> à 1 million de photons/pixel/seconde). De la même manière, nous avons sélectionné 6 clones pour poursuivre l'étude et l'analyse de ce système permettant l'intégration ciblée du gène de la *luciférase*. Pour conclure sur ces niveaux de bioluminescence obtenus *in vitro* par ce système, on peut dire qu'ils sont tout à fait satisfaisants et proches de ceux obtenus au laboratoire lors de précédentes constructions de lignées stables bioluminescentes obtenues par intégration génomique aléatoire (résultats non montrés).

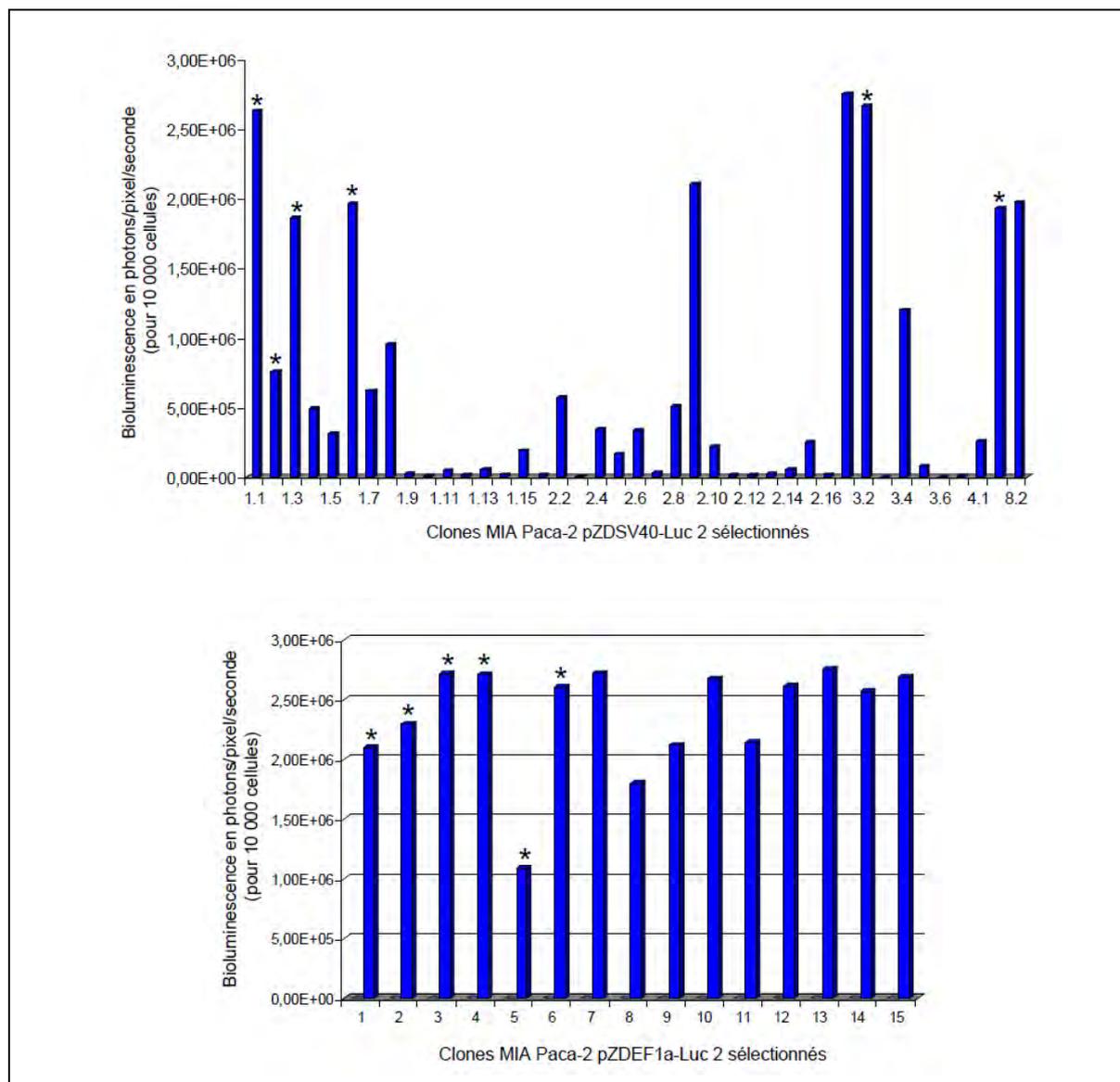


Fig 3 : Mesure de la bioluminescence *in vitro* des clones MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2 et MIA PaCa-2 PZDEF1a-Luc 2 sélectionnés.

La mesure est effectuée sur un lysat de 120 000 cellules puis rapportée à 10 000 cellules. Les 6 clones marqués d'une étoile (*) sont les clones sélectionnés pour poursuivre l'étude du système d'intégration ciblée.

Pour poursuivre cette étude des clones MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2 et MIA PaCa-2 pZDEF1a, nous avons réalisé une PCR conformément aux recommandations du fournisseur du vecteur initial pZDonor-AAVS1 Puromycin. Le but est de savoir quels sont les clones sélectionnés qui présentent une intégration génomique ciblée au niveau du locus *aavs1*. En effet, un maintien du vecteur transfécté sous forme épisomique ou bien une intégration génomique aléatoire du gène de la *luciférase* et de son promoteur pourraient également induire un signal de bioluminescence.

Concernant la PCR, l'utilisation des amorces AAVS1 Forward Primer et Puro Reverse Primer fournies dans le kit permet de mettre en évidence l'intégration au niveau du locus *aavs1*. En effet, ces amorces permettent une amplification génomique d'un fragment situé d'une part au niveau du gène *aavs1* (ce fragment n'étant pas présent sur le vecteur) et d'autre part au niveau du gène de résistance à la

puromycine (ce fragment étant situé sur le vecteur). Ainsi l'amplicon de 1100 pb obtenu après amplification par PCR ne peut être mis en évidence que s'il existe une intégration ciblée au niveau du locus *aavs1* (Fig 4 a)).

Les résultats obtenus pour les clones MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2 et MIA PaCa-2 pZDEF1a sélectionnés sont rapportés respectivement dans les figures 4 b) et 4 c). On peut voir que l'amplicon de 1100 pb est détecté pour l'ensemble d'entre eux à l'exception du clone 3.2. D'autre part, l'ADN extrait de ces 12 clones est bien présent en quantité satisfaisante, comme peut en rendre compte le gène de référence utilisé, qui correspond à une séquence humaine spécifique du chromosome 17.

Pour conclure sur l'efficacité d'intégration génomique grâce à ce système, on peut dire qu'elle semble satisfaisante puisque sur l'ensemble des clones bioluminescents sélectionnés qui ont été testés par PCR, soit 30 au total, 28 d'entre eux sont positifs et présentent donc une intégration ciblée au niveau du locus *aavs1*.

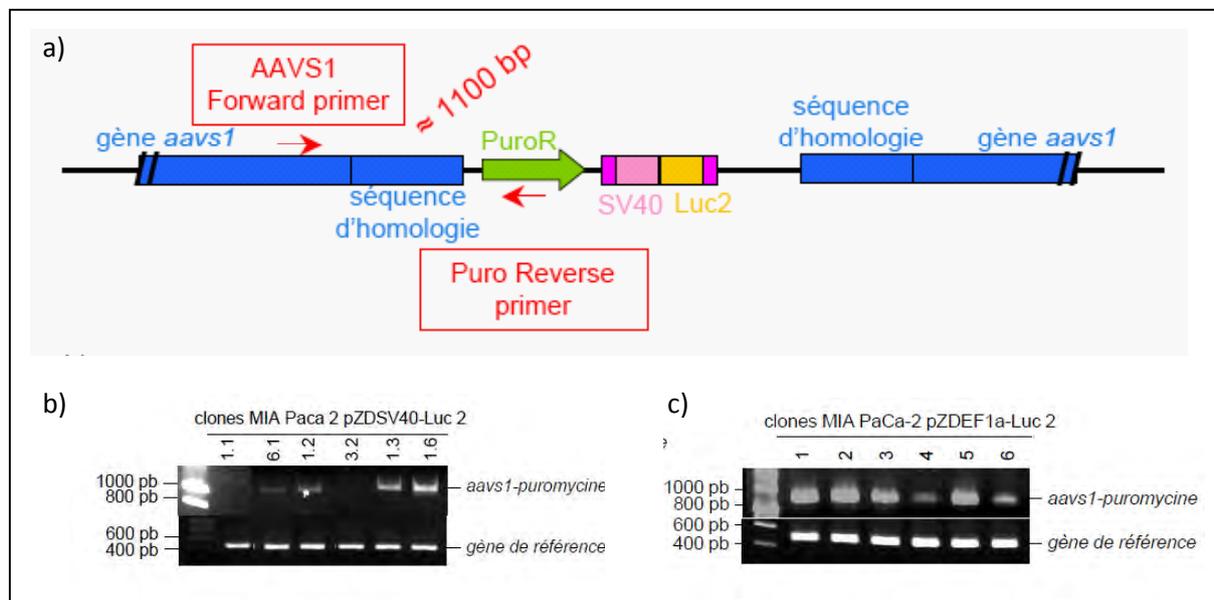


Fig 4 : Intégration génomique au niveau du locus *aavs1*.

a) Les amorces AAVS1 Forward primer et Puro Reverse primer utilisées pour la PCR permettent une amplification génique uniquement lorsque le gène de la puromycine est inséré au niveau du locus *aavs1*. b) 5 des 6 clones MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2 rapportés présentent une intégration génomique au niveau du locus *aavs1*. L'amplification du gène de référence est présente pour l'ensemble des clones. c) L'ensemble des 6 clones MIA PaCa-2 pZDEF1a-Luc 2 testés en PCR présentent une intégration ciblée.

4) Stabilité de la bioluminescence *in vitro* à long terme des clones MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc

2

Une étude de stabilité à long terme des 6 clones MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2 est indispensable pour évaluer la persistance du signal de bioluminescence. En effet, une baisse de signal peut rendre compte

d'une mauvaise stabilité au niveau génomique des gènes intégrés ou bien de régulation épigénétique au niveau du promoteur aboutissant à une atténuation de l'expression de la luciférase.

Les résultats présentés dans la figure 5 a) rapportent le signal de bioluminescence obtenu au cours des passages cellulaires (passages 19, 25, 31 et 41) pour les 6 clones MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2 sélectionnés. Cela correspond à une évaluation du signal à 8, 11, 14 et 18 semaines de culture des clones après leur sélection et amplification, soit une évaluation à long terme. On peut voir que globalement le signal est assez difficile à appréhender d'une mesure à l'autre, néanmoins, il semble relativement stable pour les clones 1.1, 1.6 et 6.1 qui maintiennent des niveaux corrects de bioluminescence après plus de 4 mois de culture.

En parallèle de cette étude de stabilité menée en présence d'antibiotique, la même étude a été initiée en l'absence d'antibiotique afin de tester si l'absence de pression de sélection ne risquait pas d'aboutir à l'émergence de clones non bioluminescents. Les résultats sont présentés dans la figure 5 b) où l'on peut voir qu'après une absence de puromycine, le signal obtenu diminue nettement pour l'ensemble des clones. Cela semble signifier qu'il y ait une dérive de ces clones en l'absence de pression de sélection. Si tel était le cas, il serait nécessaire de les maintenir en culture en conservant l'antibiotique.

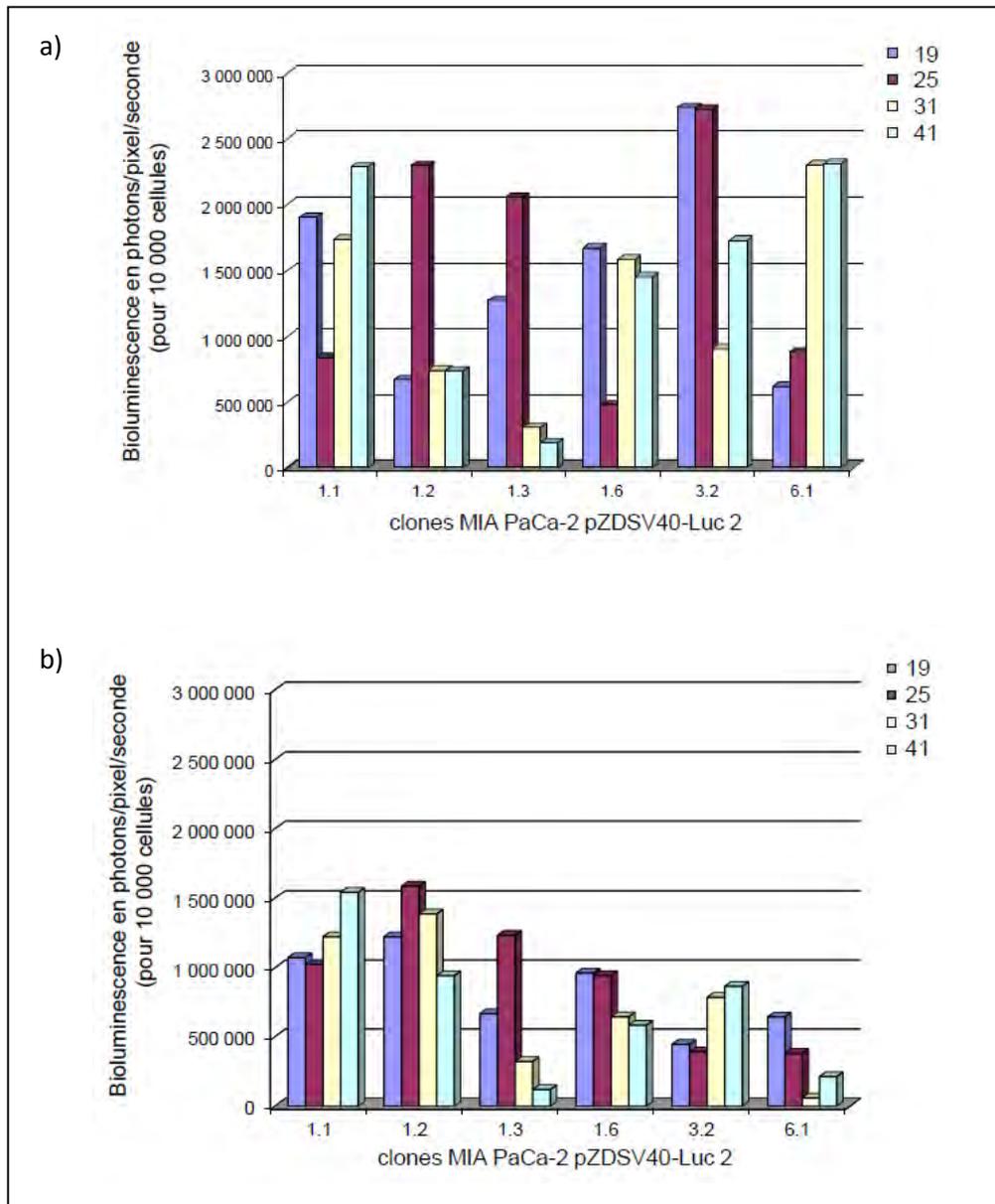


Fig 5 : Stabilité de la bioluminescence *in vitro* au cours des passages cellulaires pour 6 clones MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2 en présence et en l'absence d'antibiotique.

a) La mesure de la bioluminescence (en photons/pixel/seconde) est effectuée sur un lysat de 120 000 cellules puis rapportée à 10 000 cellules. Le signal est évalué pour 6 clones MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2 en présence de puromycine au 19^{ème}, 25^{ème}, 31^{ème} et 41^{ème} passage cellulaire. b) Le signal de bioluminescence (en photons/pixel/seconde) est évalué pour 6 clones MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2 en absence de puromycine 0,4 µg/mL au 19^{ème}, 25^{ème}, 31^{ème} et 41^{ème} passage cellulaire.

B - Etablissement d'une lignée bioluminescente stable de cancer de la prostate

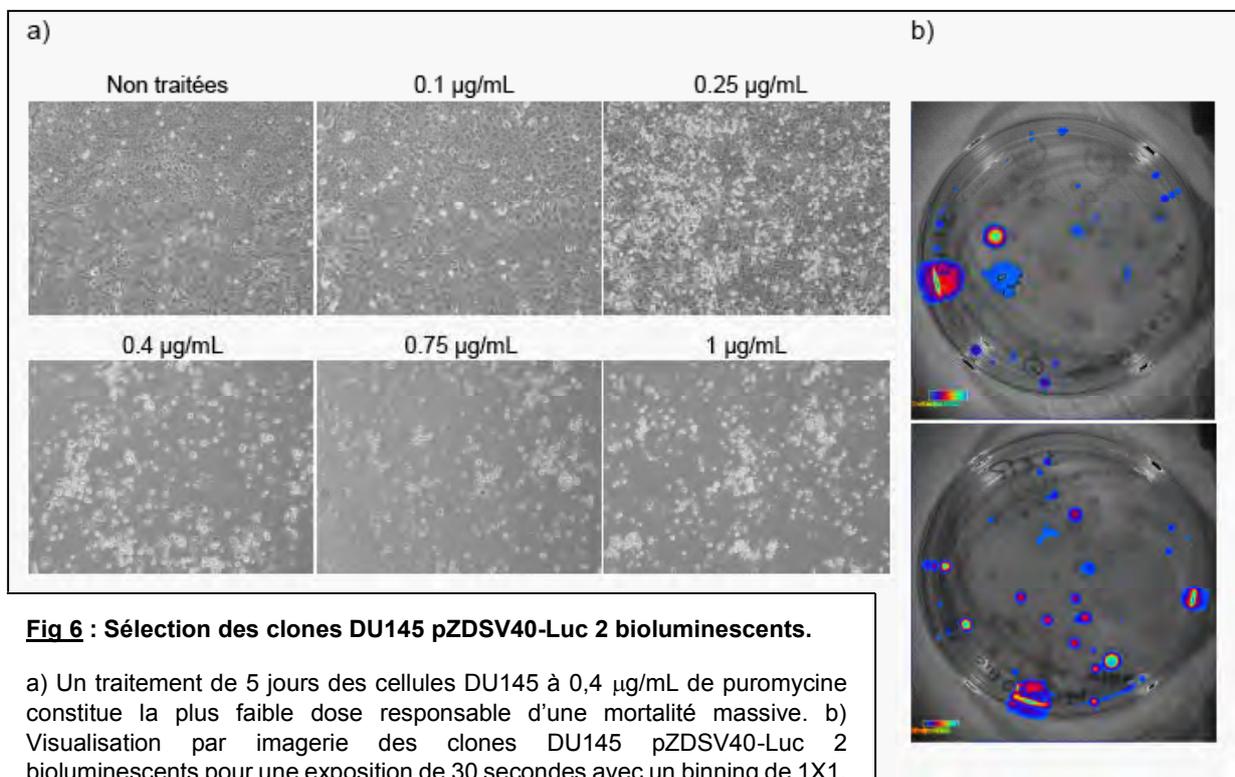
1) Génération de clones DU145 bioluminescents

En plus des cellules de carcinome du pancréas, nous avons eu pour objectif d'établir une lignée bioluminescente stable de cancer de la prostate par intégration ciblée puisque le laboratoire souhaite débiter des études de pharmacologie *in vivo* sur ce modèle tumoral et qu'il ne dispose pas encore de cet outil.

Les clones des cellules DU145 ont été obtenus de la même manière que les clones MIA PaCa-2, c'est-à-dire par co-transfection du vecteur pZDSV40-Luc2 et de l'ARNm ZFN, en utilisant le même kit de transfection TransIT-mRNA Transfection (Mirus®). La dose de puromycine retenue pour la sélection des clones a été de 0.4 µg/mL, sur la base d'un traitement de 5 jours des cellules DU145 à doses croissantes (Fig 6 a)).

Une pré-sélection des clones bioluminescents a également été réalisée par imagerie à l'aide de la caméra CCD (Fig 6b)). En terme de quantification, les clones bioluminescents semblent minoritaires et sont de taille plus petite que les non bioluminescents : l'utilisation de l'imagerie est donc ici très intéressante puisque grâce à ce système nous avons récupéré uniquement des clones bioluminescents.

Huit clones seulement ont été récupérés à l'issue de l'imagerie et remis en culture de manière individuelle. En effet, la principale difficulté avec ce type de cellules est qu'elles poussent sous forme de monocouche cellulaire, rendant la récupération des clones difficile et la reprise en culture également compte tenu du nombre limité de cellules dans chaque clone.



2) Caractérisation *in vitro* des lignées bioluminescentes DU145 pZDSV40-Luc 2

Les niveaux de bioluminescence *in vitro* ont été évalués pour l'ensemble des 8 clones sélectionnés (Fig 7 a)). De manière comparable avec les clones MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2, les niveaux obtenus sont relativement forts et similaires aux niveaux obtenus pour des lignées bioluminescentes précédemment construites au laboratoire. Les clones DU145 pZDSV40-Luc 2 1, 3, 5, 6 et 8 ont été sélectionnés pour débiter des études de stabilité à long terme en présence ou en absence d'antibiotique afin de tester la persistance du signal de bioluminescence au court du temps.

Nous avons ensuite réalisé une PCR avec le couple d'amorces *AAVS1 Forward Primer* et *Puro Reverse Primer* afin de mettre en évidence l'intégration génomique ciblée au niveau du locus *aavs1*. L'amplicon de 1100 pb n'est détectable que pour 5 des 8 clones DU145 pZDSV40-Luc 2 isolés (Fig 7 b)). Sur la base de l'ensemble de ces résultats, nous avons sélectionnés 6 clones DU145 pZDSV40-Luc 2 pour débiter une étude de stabilité *in vitro* à long terme avec ou sans pression de sélection.

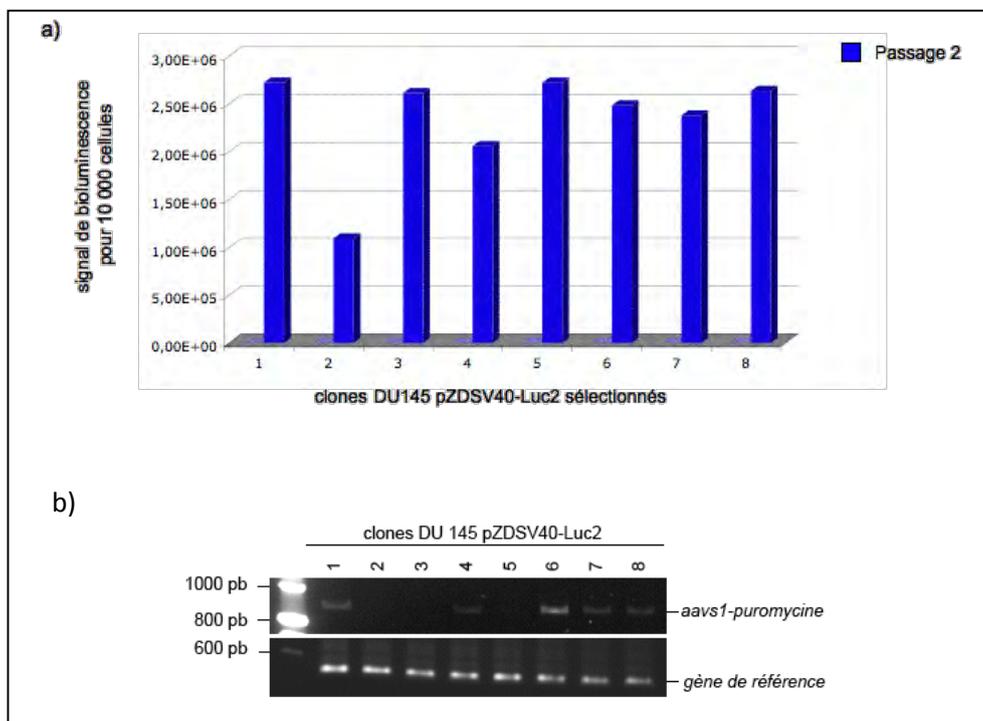


Fig 7 : Mesure de la bioluminescence *in vitro* des 8 clones DU145 pZDSV40-Luc 2 et intégration ciblée au niveau du locus *aavs1*.

a) La mesure en photons/pixel/seconde est effectuée sur un lysat de 120 000 cellules puis rapportée à 10 000 cellules. b) 5 des 8 clones DU145 pZDSV40-Luc 2 rapportés présentent une intégration génomique au niveau du locus *aavs1*. L'amplification du gène de référence est présente pour l'ensemble des clones.

3) Stabilité de la bioluminescence *in vitro* à long terme des clones DU145 pZDSV40-Luc 2

Une étude de stabilité à long terme de 6 clones DU145 pZDSV40-Luc 2 est indispensable pour évaluer la persistance du signal de bioluminescence. En effet, une baisse de signal peut rendre compte d'une

mauvaise stabilité au niveau génomique des gènes intégrés ou bien de régulation épigénétique au niveau du promoteur aboutissant à une atténuation de l'expression de la luciférase.

Les résultats présentés dans la figure 8 a) rapportent le signal de bioluminescence obtenu au cours des passages cellulaires (passages 17, 24 et 33) pour les 6 clones DU145 pZDSV40-Luc 2 sélectionnés. On peut voir que le signal est relativement bien maintenu pour les clones 3, 5, 7 et 8, proche du signal initial. En revanche, de manière comparative aux clones MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2, en l'absence de pression de sélection, les niveaux de bioluminescence diminuent considérablement (Fig 8 b)).

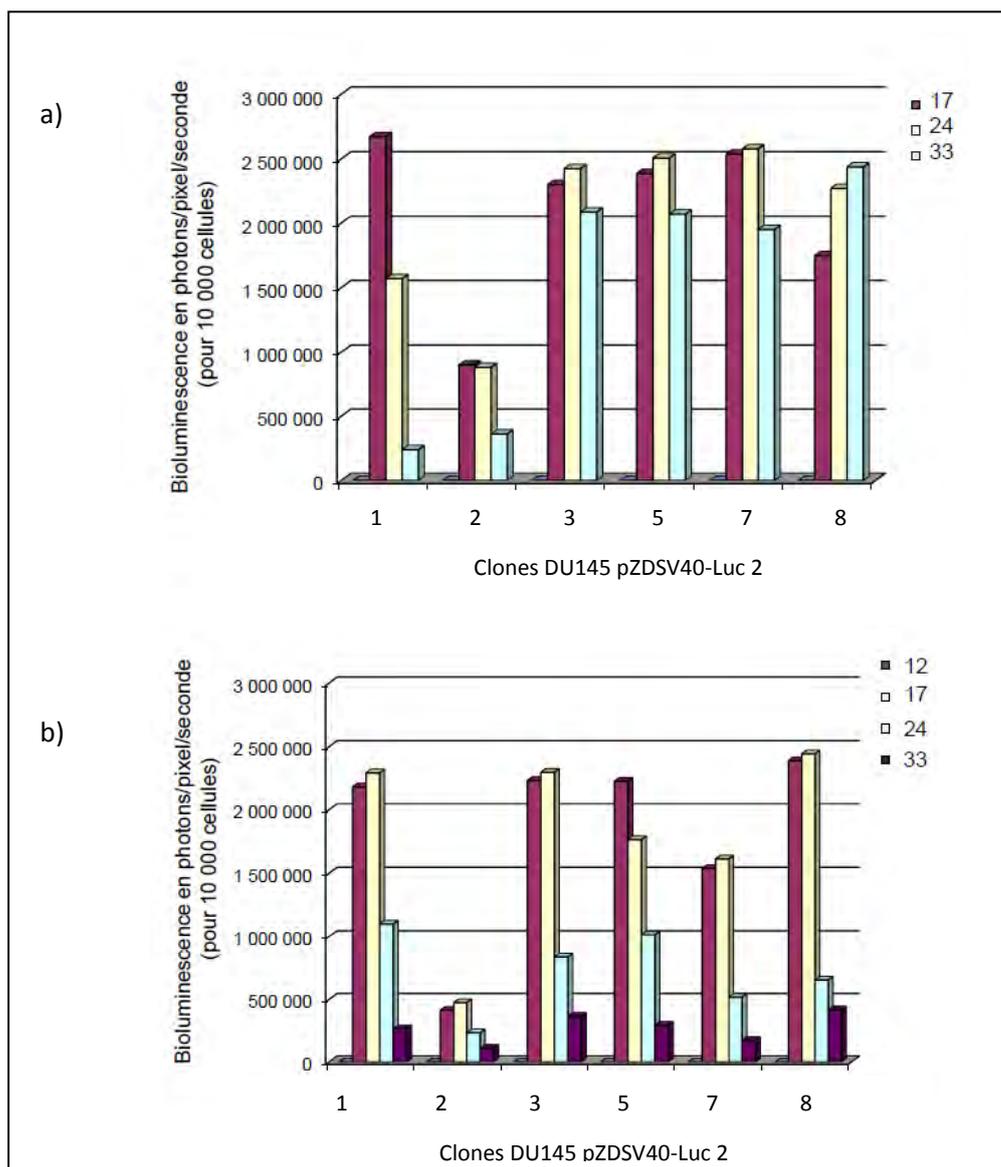


Fig 8 : Stabilité de la bioluminescence *in vitro* au cours des passages cellulaires pour 6 clones MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2 en présence et en l'absence d'antibiotique.

a) La mesure de la bioluminescence (en photons/pixel/seconde) est effectuée sur un lysat de 120 000 cellules puis rapportée à 10 000 cellules. Le signal est évalué pour 6 clones DU145 pZDSV40-Luc 2 en présence de puromycine au 17^{ème}, 24^{ème} et 33^{ème} passage cellulaire. b) Le signal de bioluminescence (en photons/pixel/seconde) est évalué pour 6 clones DU145 pZDSV40-Luc 2 en absence de puromycine 0,4 µg/mL au 12^{ème}, 17^{ème}, 24^{ème} et 33^{ème} passage cellulaire.

C – Caractérisation *in vivo* de la lignée MIA PaCa-2 bioluminescente : pertinence de l'outil de pharmacologie

1) Greffe de la lignée bioluminescente MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2 chez la souris immunodéficiente Swiss nude

Compte tenu de l'intérêt potentiel des clones MIA PaCa-2 PZDSV40-Luc 2 sélectionnés, nous avons ensuite évalué ce modèle *in vivo* chez la souris Swiss nude afin de voir s'il serait envisageable de l'utiliser comme modèle d'évaluation de molécules pharmacologiques à activité anti-tumorale. Pour cela, nous avons procédé à la greffe sous-cutanée de 10 millions de cellules MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2 issues des clones présentant des niveaux différents de bioluminescence lors des études de stabilité (en présence de puromycine) : c'est-à-dire les clones 1.1, 1.2 et 3.2, où nous avons greffé 5 souris par clone, ainsi que les MIA PaCa-2 de phénotype sauvage. Afin d'évaluer la viabilité cellulaire post-greffe et la détection du signal de bioluminescence *in vivo*, nous avons réalisé une 1^{ère} détection de la bioluminescence sur chaque souris 8 jours après la greffe. Les 5 souris de chaque groupe ont reçu au même moment une administration intra-péritonéale de 300 μ L de luciférine à la concentration de 10 mg/mL, elles ont ensuite été anesthésiées avec de l'isoflurane puis placées dans la chambre noire afin de débiter l'acquisition de la bioluminescence. Les images rapportées dans la figure 9 ont été obtenues par superposition d'une photo prise dans le visible (souris en noir et blanc) et de l'image correspondant au signal de bioluminescence converti en fausses couleurs pour les rendre plus visuelles (points de couleurs).

Comme on peut le voir, la bioluminescence est présente pour quasiment l'ensemble des souris tout au long du suivi, ce qui signifie qu'en majorité les cellules greffées sont toujours vivantes et permettent l'expression de la luciférase. D'autre part, on peut également dire que le 1^{er} signal analysé à J8 semble puissant, par comparaison avec d'autres signaux obtenus à partir de lignées tumorales bioluminescentes disponibles au laboratoire (résultats non montrés). En revanche, il existe une hétérogénéité au sein des groupes : c'est pour s'affranchir de cette variabilité inter-individuelle que l'on greffe plusieurs souris.

Le suivi et la quantification de la croissance tumorale et de la bioluminescence, a été poursuivi sur plusieurs semaines afin d'évaluer la capacité des cellules greffées à former une tumeur ainsi qu'à émettre un signal de bioluminescence.

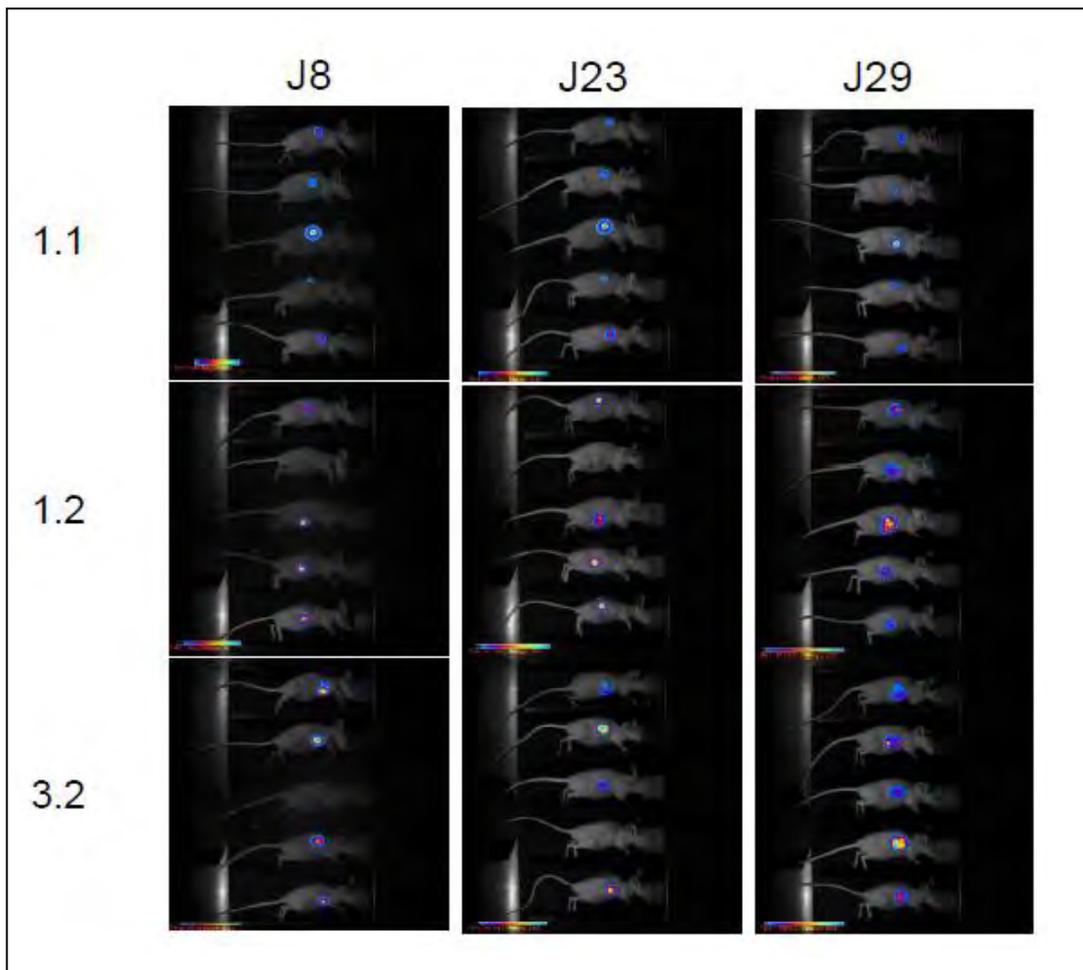


Fig 9 : Bioluminescence des cellules MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2, 8, 23 et 29 jours après la greffe sous-cutanée sur souris Swiss nude.

Le signal de bioluminescence est présent pour quasiment l'ensemble des clones greffés.

2) Caractérisation *in vivo* des clones bioluminescents MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2

Les cellules issues des clones MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2 greffées chez les souris Swiss nude ont été suivies pendant plusieurs semaines afin d'évaluer la capacité de chaque clone à former d'une part une tumeur et d'autre part à maintenir l'expression de la luciférase, ceci n'étant possible que si le gène de la *luciférase* inséré au niveau du locus *aavs1* se maintient au cours de la prolifération sans pression de sélection et n'est pas non plus réprimé. Comme on peut le voir dans la figure 10 a), la croissance tumorale semble progresser pour l'ensemble des clones jusqu'au 18^{ème} jour environ puis elle diminue pour quasiment l'ensemble de clones également. D'autre part, la croissance tumorale semble plus importante pour les clones 1.2 et 3.2 en comparaison des MIA PaCa-2 wt, cela pourrait signifier que l'insertion des séquences au niveau du locus *aavs1* ait un impact sur la croissance tumorale des cellules MIA PaCa-2. Concernant l'analyse du signal de bioluminescence *in vivo* au cours du temps, on peut voir dans la figure 10 b) que seule les souris du clone 3.2 présentent une augmentation significative du signal au cours du temps ainsi qu'un signal significatif à J29.

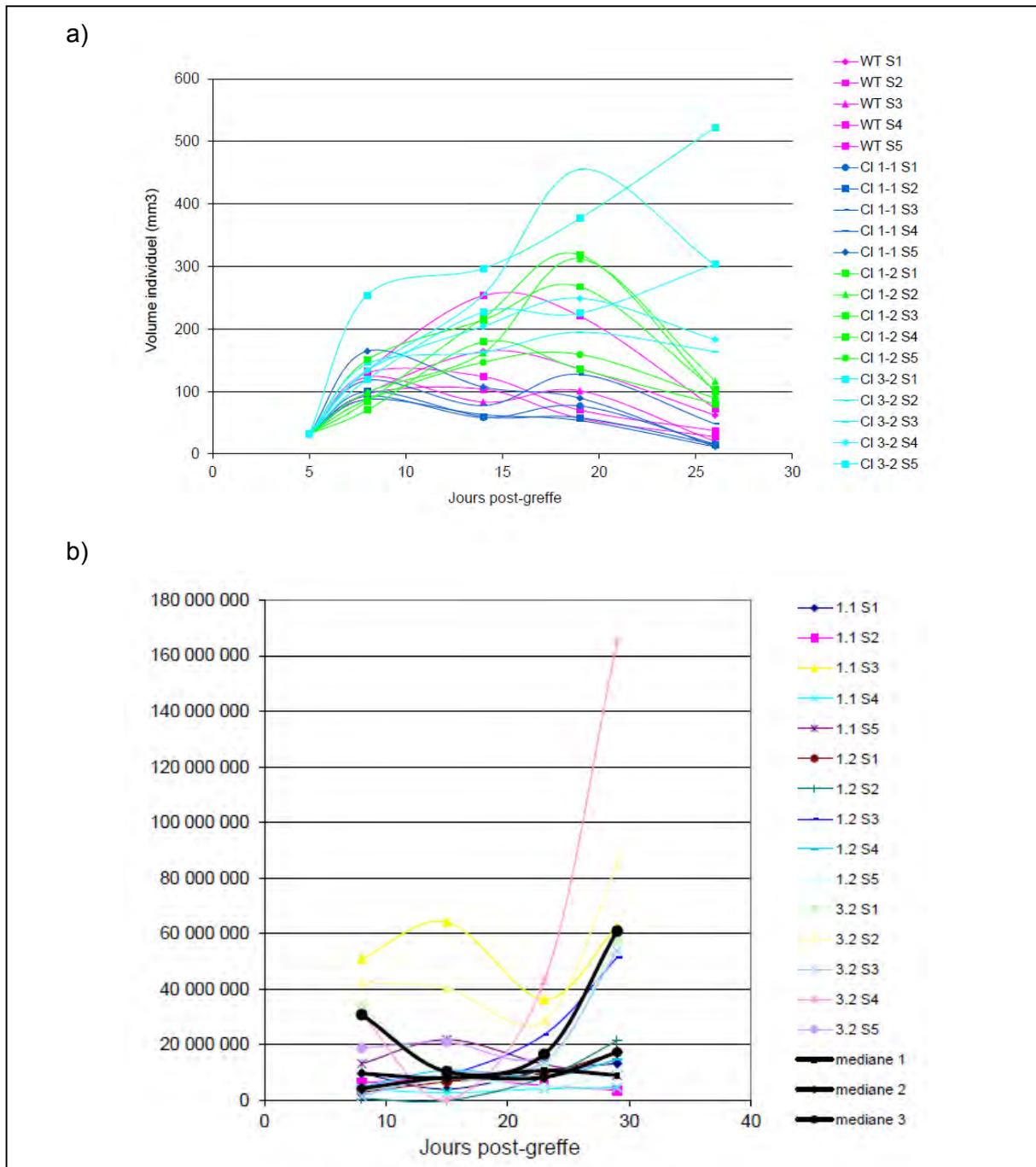


Fig 10 : Croissance tumorale et mesure de la bioluminescence des cellules MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2 greffées chez la souris Swiss nude au cours du temps.

a) Evaluation de la croissance tumorale des cellules MIA PaCa-2 non transfectées (contrôle) et des clones MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2 1.1, 1.2 et 3.2 greffés en sous-cutanée au cours du temps. b) Evaluation du signal de bioluminescence (en millions de pixels/seconde) des clones MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2 1.1, 1.2 et 3.2 greffés en sous-cutanée au cours du temps. La médiane 1 correspond au clone 1.1, la médiane 2 au clone 1.2 et la médiane 3 au clone 3.2.

D – Caractérisation *in vivo* de la lignée DU145 bioluminescente : pertinence de l'outil de pharmacologie

1) Greffe de la lignée bioluminescente DU145 pZDSV40-Luc 2 chez la souris immunodéficiente Scid

De manière comparable à ce qui a été réalisé pour les clones stables MIA PaCa-2, trois clones DU145 pZDSV40-Luc 2 ont été évalué *in vivo* chez la souris Scid afin d'évaluer leurs pertinences en tant qu'outil pharmacologique. Dix millions de cellules DU145 pZDSV40-Luc 2 issues des clones de niveaux élevés de bioluminescence (3 et 8), et d'un clone de faible taux (le clone 1), ont été greffés en sous-cutanée chez 5 souris, ainsi que les DU145 de phénotype sauvage. Le protocole d'administration des cellules, d'anesthésie et d'imagerie est identique à celui réalisé pour les clones MIA PaCa-2.

Comme on peut le voir dans la figure 11, la bioluminescence est majoritairement présente pour l'ensemble des souris, les cellules greffées sont donc toujours vivantes et permettent l'expression de la luciférase. Le 1^{er} signal analysé pour les clones DU145 à J8 semble également puissant, en comparaison des lignées tumorales bioluminescentes disponibles au laboratoire (résultats non montrés). Il existe toujours une hétérogénéité liée à la variabilité inter-individuelle au sein des groupes, avec un signal qui a la particularité d'être très étalé sur le flanc de l'animal.

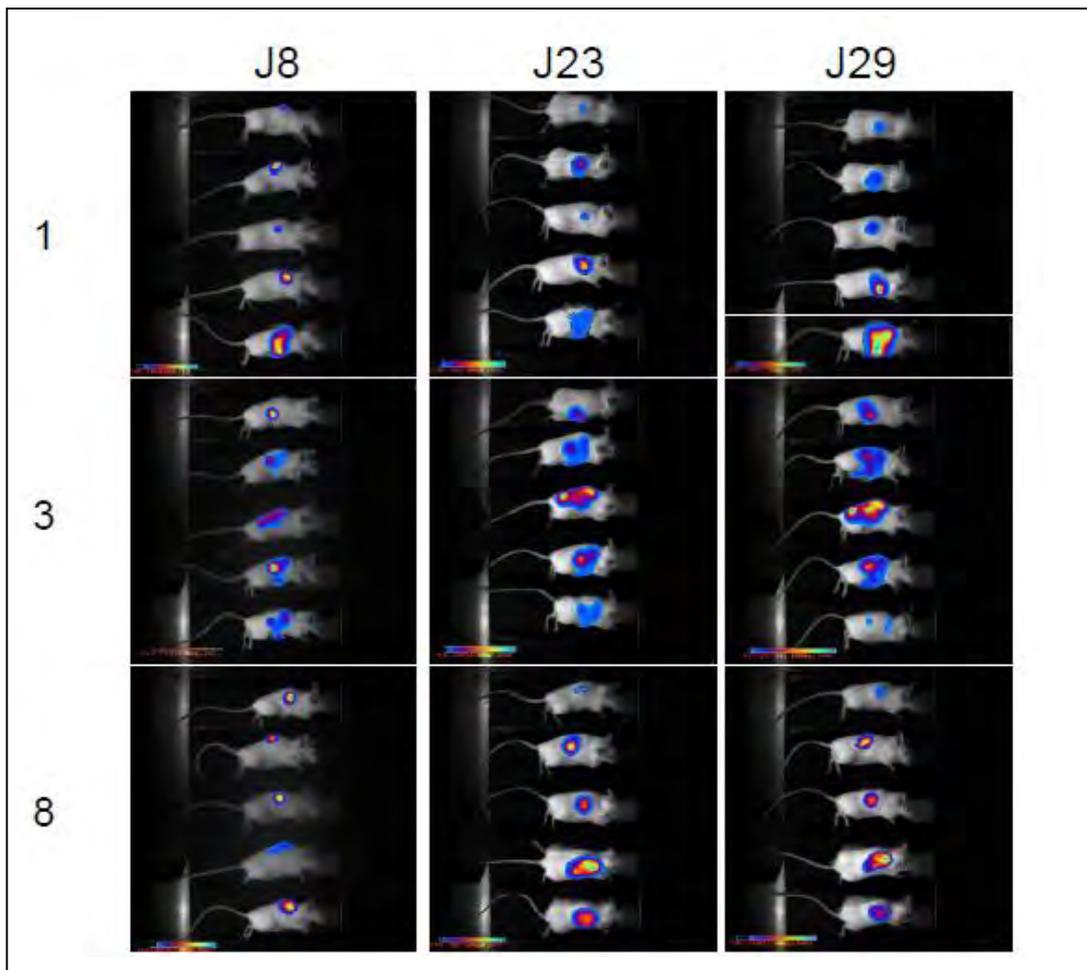


Fig 11 : Bioluminescence des cellules DU145 pZDSV40-Luc 2, 8, 23 et 29 jours après la greffe sous-cutanée sur souris Scid.

Le signal de bioluminescence est présent pour l'ensemble des clones greffés.

2) Caractérisation *in vivo* des clones bioluminescents DU145 pZDSV40-Luc 2

Concernant l'analyse du signal de bioluminescence *in vivo* des clones DU145 pZDSV40-Luc 2 greffés en sous-cutanée chez la souris Scid, on peut voir dans la figure 12 que les clones 3 et 8 présentent une augmentation du signal au cours du temps ainsi qu'un signal significatif à J29.

Par ailleurs, l'évaluation de la croissance tumorale par mesure au pied à coulisse n'a pu être réalisée car les cellules DU145 ainsi que les clones DU145 pZDSV40-Luc 2 forment un tapis cellulaire et non une masse tumorale palpable. Dans ce cas de figure, l'établissement de lignée bioluminescence est d'autant plus intéressante.

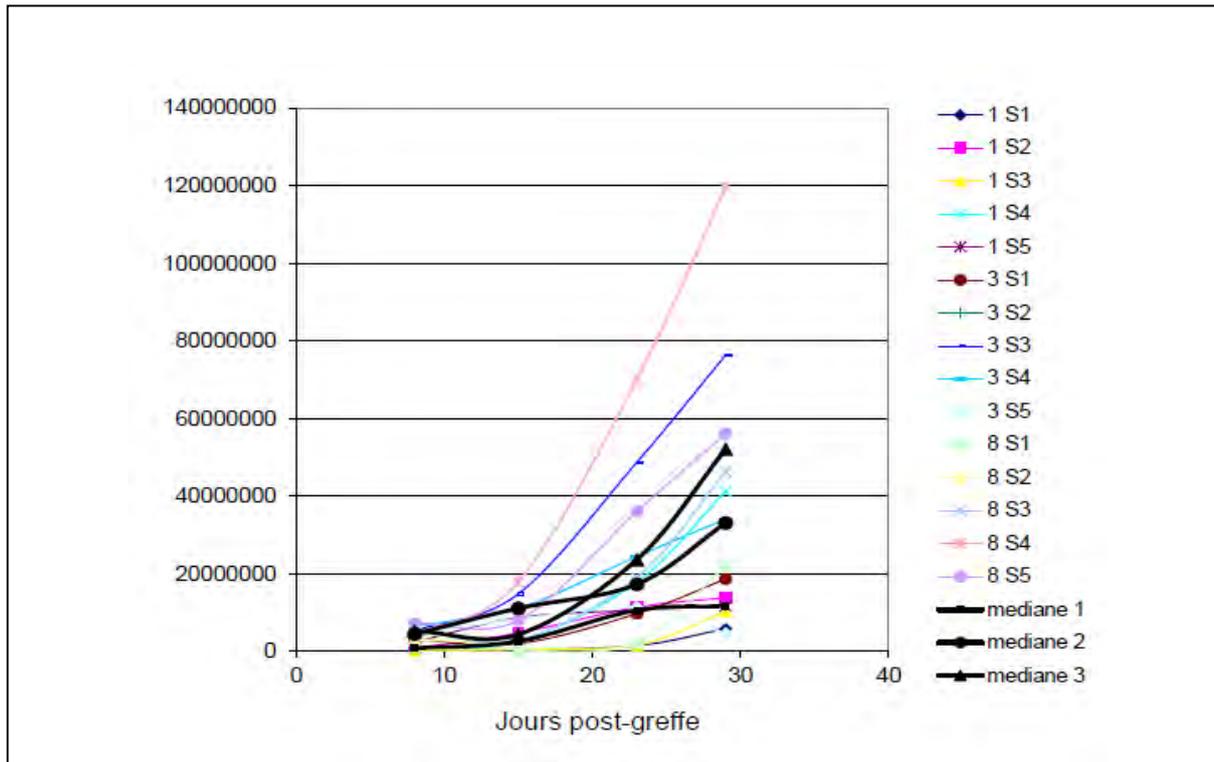


Fig 12 : Mesure de la bioluminescence des cellules DU145 pZDSV40-Luc 2 greffées chez la souris Scid au cours du temps.

Evaluation du signal de bioluminescence (en millions de pixels/photon/seconde) des clones DU145 pZDSV40-Luc 2 1, 3 et 8 greffés en sous-cutanée au cours du temps. La médiane 1 correspond au clone 1, la médiane 2 au clone 3 et la médiane 3 au clone 8.

IV - DISCUSSION

Pour conclure sur la première partie de cette étude visant à construire des lignées cellulaires de cancer du pancréas, les cellules MIA PaCa-2, et de cancer de la prostate, les cellules DU145, par intégration ciblée, nous pouvons dire que ce système semble fonctionner. En effet, dans nos modèles, l'intégration ciblée au niveau du locus *aavs1* a lieu avec une efficacité tout à fait satisfaisante puisque 14 des 15 clones MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2 bioluminescents testés par PCR sont positifs ainsi que 14 des 15 clones MIA PaCa-2 pZDEF1a et que 5 des 8 clones DU145 pZDSV40-Luc 2. Cela signifie donc que lorsque les clones sont bioluminescents (puisque sélectionnés sur ce critère en imagerie), ils présentent majoritairement une intégration du gène de la *luciférase* au niveau du locus *aavs1*. On ne peut toutefois pas exclure qu'à cela s'ajoute une intégration aléatoire du gène. En ce sens, l'endonucléase FokI, à laquelle a été ajoutée par bio-ingénierie des structures en triple hélice spécifiques au total de 24 acides aminés du gène *aavs1*, permet bien une coupure spécifique sur ce site du génome, favorisant ensuite l'insertion des gènes d'intérêt lors de la réparation de l'ADN par recombinaison homologue.

Une fois le gène de la *luciférase* inséré dans le génome des cellules cancéreuses, son niveau d'expression va dépendre de la régulation de son promoteur ainsi que des événements épigénétiques tels que des méthylations (ADN, histones), acétylation (histones)... avec pour conséquence possible une répression transcriptionnelle qui peut avoir lieu au niveau du site d'insertion. Concernant les différents événements géniques, le locus *aavs1* a été évalué et retenu pour la réalisation des insertions de séquences puisqu'il semble que ce gène soit peu sujet à ces événements de régulation génique (Lombardo et al., 2011, Rensburg et al., 2013). D'autre part, la perte de ce gène codant pour la protéine p84, dont la fonction n'est actuellement pas connue, est décrite comme non délétère sur un certain nombre de lignées cellulaires (Lombardo et al., 2011).

On peut alors dire que grâce à ce système d'intégration ciblée, la régulation du gène de la *luciférase* ne dépendrait en grande majorité que de la régulation de son promoteur. Pour cette raison, nous avons réalisé la construction de 3 vecteurs contrôlant l'expression de la luciférase : 2 promoteurs viraux SV40 et CMV et 1 promoteur cellulaire EF1a, qui est donc plus long que les autres. EF1a est un promoteur qui est décrit comme ouvert dans la littérature et donc moins sujet aux régulations géniques que les promoteurs courts viraux (Qin et al., 2010). Ainsi, il serait très intéressant de pouvoir comparer l'expression du gène de la *luciférase*, grâce à l'analyse des niveaux de bioluminescence *in vitro*, en fonction du promoteur utilisé.

Pour cela, il serait nécessaire de sélectionner de nouveaux clones MIA PaCa-2 et/ou DU145 transfectés avec la construction pZDEF1a-Luc 2. Une étude a été débutée avec la sélection de 6 clones MIA PaCa-2 pZDEF1a-Luc 2. Ces clones présentés, pour 5 d'entre eux, des niveaux de bioluminescence corrects et tout à fait comparables aux clones MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2, ce qui signifie que l'expression de la luciférase contrôlée par le promoteur EF1a semble aussi satisfaisante que sous le contrôle d'un promoteur viral. Le suivi des signaux de bioluminescence a été poursuivi jusqu'à 1 mois après sélection et il se maintenait pour 4 des 6 clones. Ce suivi était insuffisant pour conclure quant à la supériorité du

signal de bioluminescence induit par ce promoteur humain, on ne sait donc toujours pas si ce système permet de s'affranchir des régulations géniques. D'autre part, le suivi de la bioluminescence en l'absence d'antibiotique n'a pas été réalisé, ni les greffes sous-cutanée. Ces manipulations seraient requises pour mener une analyse comparative des constructions en fonction des promoteurs utilisés.

Concernant la stabilité du signal de bioluminescence dans le temps, nos études menées sur les clones MIA PaCa-2 et DU145 pZDSV40-Luc 2 en présence et en absence d'antibiotique montrent clairement une perte du signal en l'absence de pression de sélection. Cela semble signifier que le gène de la *Luciférase* alors sous le contrôle du promoteur SV40 pourrait être régulé de manière négative en subissant très probablement des événements de répression génique. D'où l'intérêt des lignées stables sous le contrôle du promoteur EF1a.

Enfin, nos études menées *in vivo* chez les souris Swiss nude pour les clones MIA PaCa-2 pZDSV40-Luc 2 montrent qu'ils ne permettent pas d'obtenir une croissance tumorale satisfaisante, la courbe de croissance augmente puis diminue au cours du temps. Le signal de bioluminescence associé est faible, seulement significatif pour un des trois clones greffés. Le signal de bioluminescence n'est pas concluant mais la croissance tumorale est limitée pour l'ensemble des animaux, même pour les souris WT. Une greffe supplémentaire serait nécessaire afin d'obtenir un niveau de croissance satisfaisant des cellules MIA PaCa-2, pour voir si lors d'une pousse tumorale satisfaisante, le signal ne serait pas meilleur.

En revanche, la bioluminescence des clones DU145 pZDSV40-Luc 2 est importante mais tardive. Cependant, la croissance cellulaire de ces cellules ne permet pas de former une masse tumorale palpable, les cellules formant un tapis diffus. De manière générale, des niveaux de bioluminescence plus importants étaient attendus étant donné les résultats encourageants qui avaient été obtenus lors de la sélection des clones et lors des premières mesures de signal post-greffe.

Pour conclure sur ce système de construction de lignées bioluminescentes par intégration ciblée, des résultats encourageants ont été obtenus à la fois *in vitro* et *in vivo*. Cependant ces premières études restent limitées surtout *in vivo* et mériteraient d'être reproduites avant de conclure quant à la performance de ce nouveau système d'intégration.

V - BIBLIOGRAPHIE

O'Farrell AC, Shnyder SD, Marston G, Coletta PL, Gill JH. Non-invasive molecular imaging for preclinical cancer therapeutic development. *Br J Pharmacol* 169 (4) (2013) 719-35.

Kelkar M, and De A. Bioluminescence based in vivo screening technologies. *Curr Opin Pharmacol* 12 (2012) 592-600.

Kruczynski A, Pillon A, Créancier L, Vanderberghe I, Gomes B, Brel V, Fournier E, Annereau JP, Currie E, Guminski Y, Bonnet D, Bailly C, Guilbaud N. F14512, a polyamine-vectorized anti-cancer drug, currently in clinical trials exhibits a marked preclinical anti-leukemic activity. *Leukemia* (2013) 1-10.

Mittra ES, Fan-Minogue H, Lin F, Karamchandani J, Sriram V, Han M, Gambhir SS. Preclinical efficacy of the anti-hepatocyte growth factor antibody ficlatuzumab in a mouse brain orthotopic glioma model evaluated by bioluminescence, PET, and MRI. *Clin Cancer Res* (Published OnlineFirst August 27, 2013).

Ellis J. Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors. *Hum. Gene Ther.* 16 (2005) 1241–1246.

Li S, Shi R, Bai Y, Hong D, Yang W, Wang X, Mo L, Zhang G. Targeted introduction of tissue plasminogen activator (TPA) at the AAVS1 locus in mesenchymal stem cells (MSCs) and its stable and effective expression. *Bioch and Bioph Res Comm* 437 (2013) 74-78.

Lombardo A, Genovese P, Beasejour CM, Colleoni S, Lee YL, Kim KA, Ando D, Urnov FD, Galli C, Gregory PD, Holmes MC, Naldini L. Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol* 25 (2007) 1298-1306.

Linden RM, Ward P, Giraud C, Winocour E, Berns KI. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 11288-94.

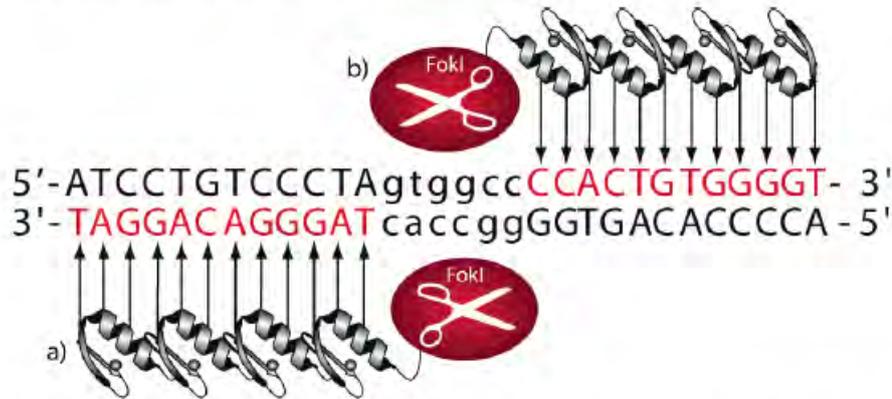
Lombardo A, Cesana D, Genovese P, Di Stefano B, Provasi E, Colombo DF, Neri M, Magnani Z, Cantore A, Lo Riso P, Damo M, Pello OM, Holmes MC, Gregory PD, Gritti A, Broccoli V, Bonini V, Bonini C, Naldini L. Site-specific integration and tailoring of cassette design for sustainable gene transfer. *Nature Methods* 8 (2011) 861-9

Rensburg RV, Beyer I, Yao XY, Wang H, Denisenko O, Li ZY, Russell DW, Miller DG, Gregory P, Holmes M, Bomsztyk K, Lieber A. Chromatin structure of two genomic sites for targeted transgene integration in induced pluripotent stem cells and hematopoietic stem cells. *Gene Ther* 20 (2013) 201-14.

Qin JY, Zhang L, Clift KL, Huler I, Xiang AP, Ren BZ, Lahn BT. Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS One* 5 (5) (2010) e10611.

VI - ANNEXES

Figure 2.
Schematic of a pair of four-finger ZFN binding to a target DNA



Each of the two ZFNs bind to a 12 bp sequence on the opposite strand flanking the cleavage site. The two binding sequences are 6 bp apart.

References

1. Lombardo, A., et al., Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat. Biotechnol.*, **25**, 1298-1306 (2007).
2. Porteus, M.H., and Baltimore, D., Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science*, **300**, 763 (2003).
3. Bibikova, M., et al., Enhancing Gene Targeting with Designed Zinc Finger Nucleases. *Science*, **300**, 764 (2003).
4. Chandrasegaran, S., and Smith, J., Chimeric restriction enzymes: what is next? *Biol. Chem.*, **380**, 841-848 (1999).
5. Linden, R.M., et al., Site-specific integration by adeno-associated virus. *PNAS, USA*, **93**, 11288-11294 (1996).

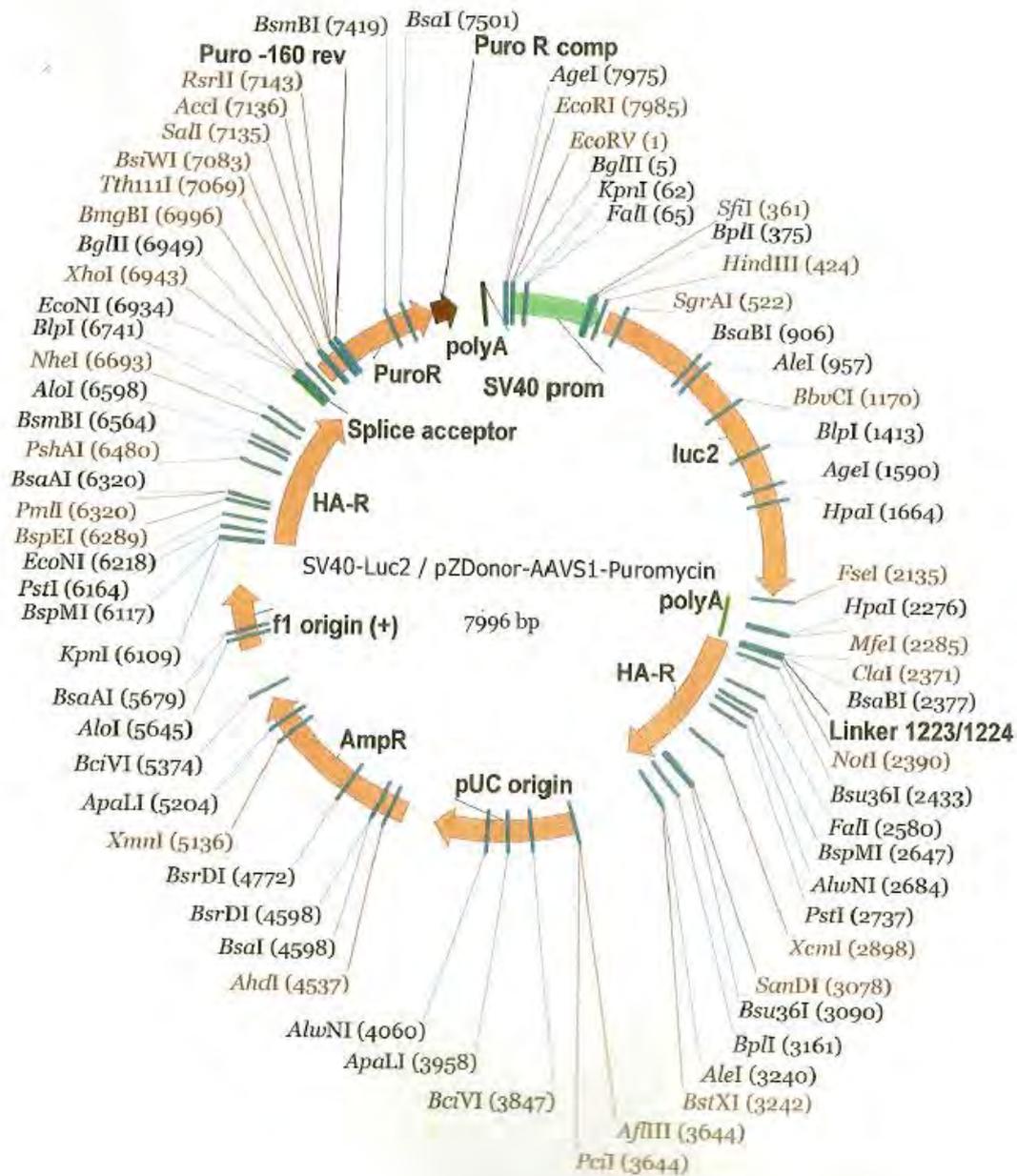
Precautions and Disclaimer

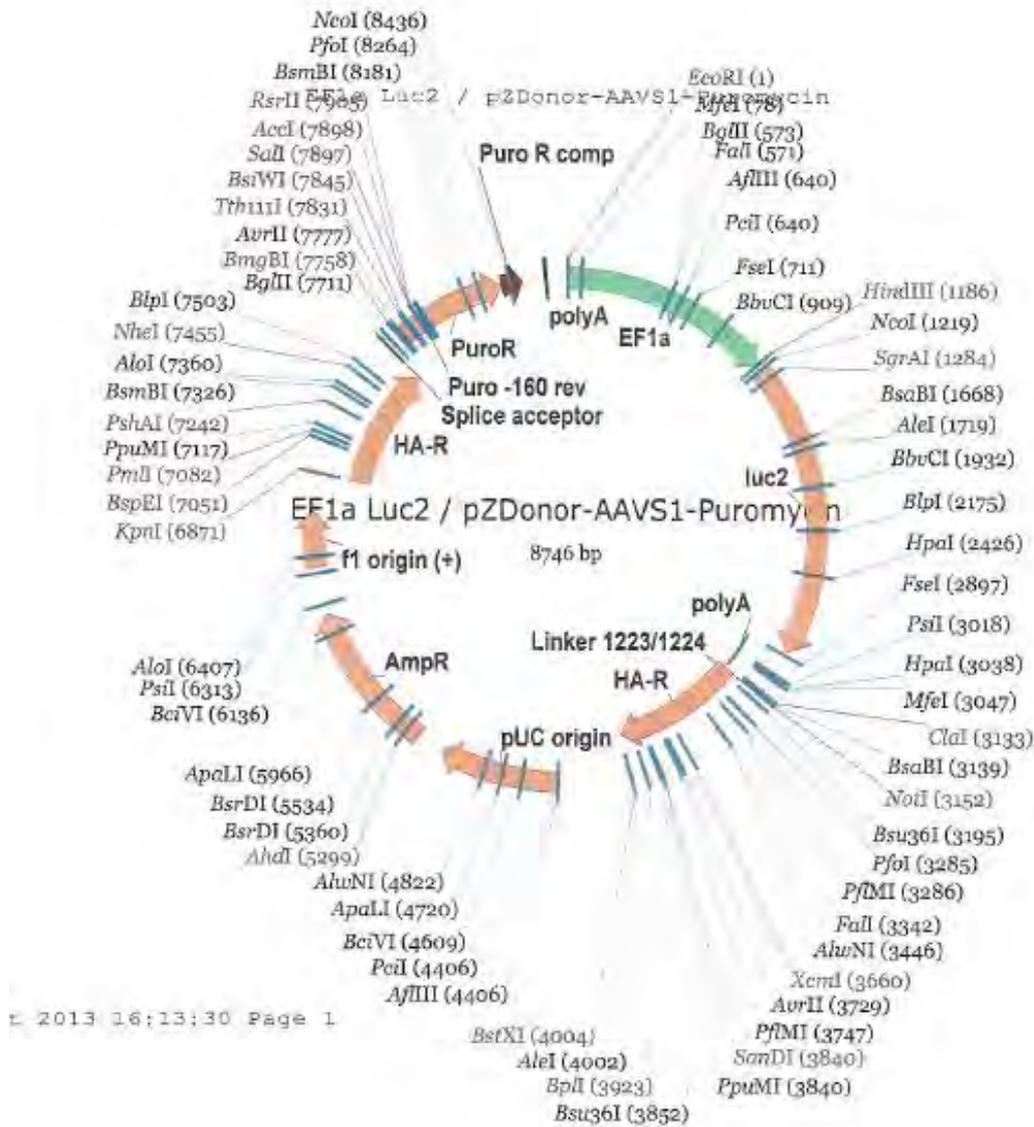
This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

Storage and Stability

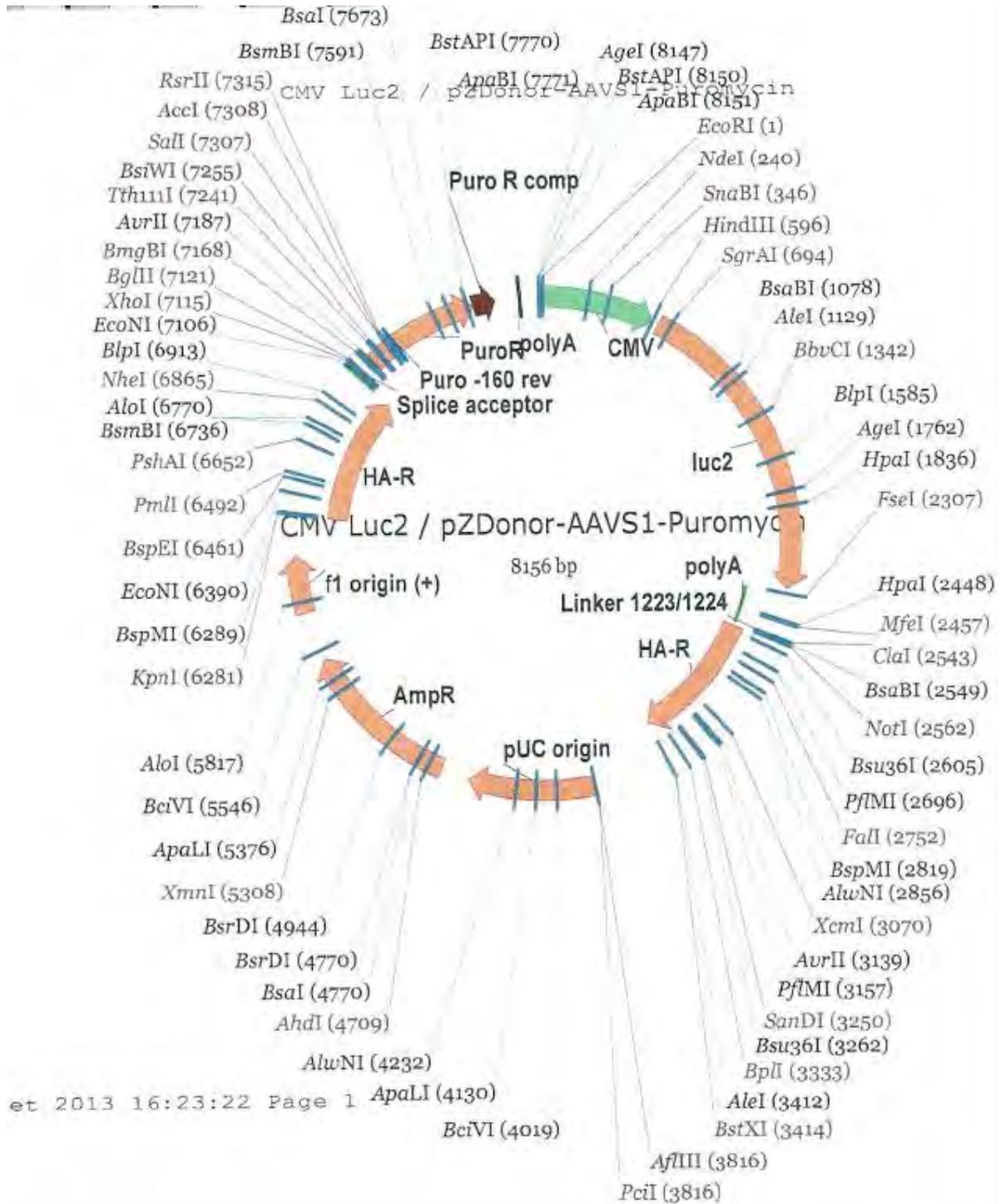
All components can be stored at -20 °C for up to 12 months. For better stability of the mRNA component, store at -80 °C.

RNases are ubiquitous and very stable proteins, which are a primary concern for any researcher attempting to manipulate RNA. Care must be taken not to introduce RNases. It is recommended to use RNase-free pipette tips, preferable those having an aerosol barrier, to wear latex gloves and change them frequently, and keep bottles and tubes closed when not in use.





2013 16:13:30 Page 1



et 2013 16:23:22 Page 1

III – Les modèles précliniques développés en recherche pour l'évaluation de nouvelles molécules thérapeutiques dans le cancer du pancréas (suite)

5. Bilan sur le projet d'établissement de modèles cellulaires par intégration ciblée et application à la pharmacologie préclinique en oncologie

Les mises au point concernant ce nouveau système d'intégration ciblée au niveau d'un locus défini, le locus *aavs1*, n'ont pas été poursuivies. En effet, les résultats de stabilité à long terme sans pression de sélection ont montré une perte très claire du signal de bioluminescence pour les clones MIA PaCa-2 et DU145. La question de la régulation génétique des promoteurs viraux se pose encore, puisque les études de stabilité n'ont pas été menées suffisamment longtemps avec le promoteur cellulaire EF1a. Cette question nécessiterait des investigations supplémentaires qui n'ont pas été menées compte tenu des niveaux de bioluminescence obtenus *in vivo*. En effet, les premiers signaux évalués en post-greffe étaient encourageants puisqu'ils étaient comparables avec des niveaux de bioluminescence obtenus pour des lignées stables construites par intégration aléatoire. Cependant, les niveaux de bioluminescence se sont montrés relativement faibles lors du suivi. Il faut rappeler que l'intérêt d'une telle construction est de réaliser des greffes orthotopiques, où seule la bioluminescence peut rendre compte de la croissance tumorale, le pancréas étant un organe profond. Ainsi, les niveaux de bioluminescence ont été jugés insuffisants pour traverser le foie ou l'estomac qui sont les organes qui recouvrent le pancréas dans la cavité abdominale.

Ce système d'intégration ciblée qui présente de nombreux avantages lors de l'élaboration de lignées stables : meilleure reproductibilité des lignées, absence d'effet off-target... n'a donc pas montré dans cette étude de supériorité par rapport au système par intégration aléatoire, et dont les limites sont largement décrites.

IV – Perspectives dans la prise en charge du cancer du pancréas

Des programmes d'études CAPS (Cancer of the Pancreas Screening) visant à évaluer la pertinence du dépistage du cancer du pancréas au sein de la population sont en cours (Okano *et al.*, 2014). L'intérêt de diagnostiquer des patients asymptomatiques est évident puisque cela permettrait d'obtenir des taux de survie à 5 ans supérieurs après chirurgie (Canto *et al.*, 2004). Cependant, aujourd'hui le dépistage est uniquement recommandé pour les individus à haut risque (Cf 4. Les populations à haut risque de cancer du pancréas) compte tenu du manque de données concernant la sensibilité des tests ainsi que le rapport coût/efficacité.

Les progrès technologiques et biologiques tendent d'apporter de nouvelles solutions pour le diagnostic précoce du cancer du pancréas, tant sur le plan des biomarqueurs que de l'imagerie. Tous les efforts de recherche convergent vers une meilleure connaissance de l'adénocarcinome ductal, qui se traduit en clinique par de nombreux protocoles d'essais cliniques actuellement en cours.

A. Les pistes de recherche pour un diagnostic précoce du cancer du pancréas

1. Recherche de nouveaux biomarqueurs du cancer pancréatique

a) Les marqueurs sériques

Comme rapporté dans la 2. Marqueur sérologique, le marqueur sérique CA19.9 est largement utilisé lors du diagnostic et du suivi thérapeutique, malgré ses limites. MUC-1 (Carbohydre antigens of mucin-1) a récemment été étudié pour savoir s'il serait plus performant que CA19.9. Malheureusement, aucun essai utilisant MUC-1 n'a montré de supériorité par rapport à CA19.9 (Okano *et al.*, 2014).

Dans une étude récente, le marqueur sérique MIC-1 (Macrophage Inhibitory Cytokine 1) s'est montré plus sensible que CA19.9 en tant que marqueur du cancer pancréatique. MIC-1 est sur-exprimé dans les cancers pancréatique, gastrique, du colon, du sein... et est déjà un marqueur d'intérêt pour le diagnostic de certains cancers (colorectal, prostate). MIC-1 est faiblement et relativement stablement exprimé dans les tissus sains, mais son expression augmente en conditions pathologiques telles qu'une

blessure, une inflammation ou un cancer. De nombreuses recherches ont montré que MIC-1 joue un rôle significatif dans la carcinogenèse et plus précisément au niveau de la prolifération, de la migration, de l'apoptose et de l'angiogenèse dans de nombreuses tumeurs solides y compris le cancer du pancréas. Une publication récente a mis en évidence l'intérêt du biomarqueur sérique MIC-1 dans les cancers du pancréas (Wang *et al.*, 2014). En effet, le taux de MIC-1 sérique est significativement plus élevé chez les patients atteints de cancer du pancréas que ceux atteints de tumeurs bénignes du pancréas ou de pancréatite chronique. Ce marqueur sérique est également plus élevé dans le cas de cancer du pancréas que dans le cas d'autres cancers dont l'adénocarcinome colorectal. L'augmentation du taux sérique de MIC-1 est indépendante du taux de CA19.9, ainsi chez des patients atteints de cancer du pancréas négatifs pour CA19.9, une augmentation de MIC-1 peut tout de même être détectée.

La valeur diagnostique de ce marqueur dans le cadre du cancer du pancréas est significativement meilleure que celle du marqueur CA19.9 même pour les stades précoces de cancer du pancréas (I et II) avec une sensibilité de 65.1% contre 43.0%. Pour les stades très précoces (IA) la sensibilité de MIC-1 est de 62.5% contre 25.0% pour CA19.9. D'autre part, la combinaison de MIC-1 et de CA19.9 augmente significativement le taux de détection en passant de 43.0% à 78.1% pour les cancer du pancréas très précoces, ces valeurs étant supérieures à la combinaison de CA19.9 avec deux autres marqueurs utilisés à la marge, CEA et CA242 (58.1%).

Ainsi, la combinaison de ces deux marqueurs CA19.9 et MIC-1 lors du diagnostic du cancer du pancréas pourrait s'avérer très performante, en s'affranchissant des limites de chaque biomarqueur évalué indépendamment.

b) Protéomique

Des approches en protéomique ont aussi été utilisées pour tenter d'identifier des marqueurs protéiques du cancer du pancréas (Okano *et al.*, 2014). Ces études ont permis d'identifier plusieurs protéines importantes associées à la tumorigenèse parmi lesquelles galectine-1, gelsoline, lumicine, protéine 14-3-3 sigma, cathepsine D, colifine, moesine et plectine-1 (Okano *et al.*, 2014). Des études supplémentaires concernant la gelsoline et la lumicine plasmatique ont permis de montrer une sensibilité de 80% et une spécificité de 95% pour les stades précoces du cancer du pancréas (stades I et II) par rapport aux patients sains et aux patients atteints de pancréatite chronique. Toutefois, les applications de la protéomique dans la recherche de nouveaux biomarqueurs tumoraux débutent mais

pourraient apportées dans les prochaines années de nouvelles pistes intéressantes à la fois dans la compréhension des mécanismes de tumorigénèse mais aussi dans la détection de la maladie précoce.

c) hENT1, marqueur prédictif de réponse à la gemcitabine

Dans une étude prospective randomisée (RTOG9704), l'expression de la protéine hENT1 (human Equilibrate Nucleoside Transporter), transporteur de la gemcitabine dans les cellules, a été associée à une augmentation de survie globale et de survie sans récurrence pour les patients atteints de cancer du pancréas traités par gemcitabine, mais pas ceux traités par le fluorouracile. La **Figure 6** illustre ces résultats, le pourcentage de survie sans récurrence étant plus important pour des niveaux élevés de hENT1 (Farrell *et al.*, 2009).

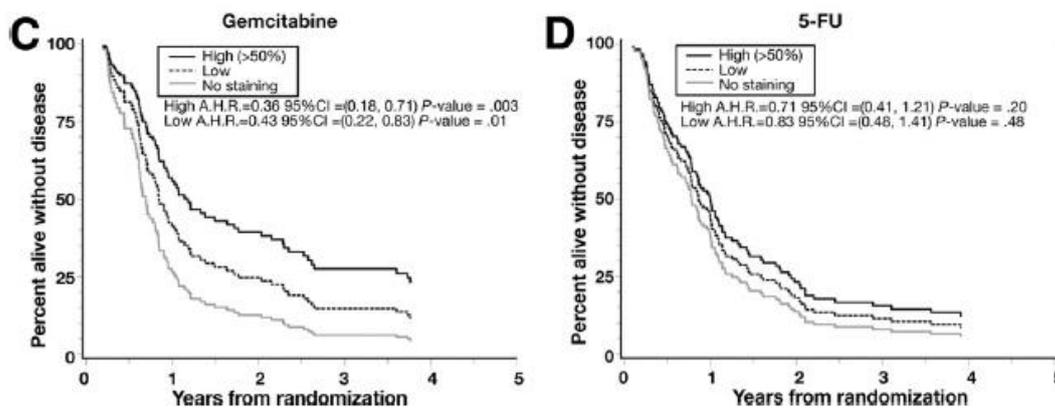


Figure 6 : Survie sans récurrence des patients atteints de cancer du pancréas recevant de la gemcitabine ou du 5-FU, par analyse multivariée. (C) Survie sans récurrence des patients traités par gemcitabine en fonction de leur taux d'expression d'hENT1. (D) Survie sans récurrence des patients traités par 5-FU en fonction de leur taux d'expression d'hENT1. (Farrell *et al.*, 2009).

Ce transporteur semble également un marqueur prédictif de la réponse à la gemcitabine pour les cancers résectables. Cependant, la régulation des niveaux d'expression de la protéine hENT1 est peu connue, de même que sa variabilité au sein des tumeurs pancréatiques. De nombreux facteurs semblent jouer sur son expression telle que l'hypoxie et le niveau de différenciation cellulaire.

Ainsi il semble que la seule perspective véritablement intéressante pour cette protéine hENT1 soit sa valeur prédictive dans le traitement par gemcitabine. Sa détection avant traitement pourrait permettre de mettre en évidence les patients pour qui la thérapie serait particulièrement efficace.

2. L'écho-endoscopie, vers un diagnostic personnalisé du cancer du pancréas

Cette technique, qui n'est pas récente, est de plus en plus utilisée dans le cadre de l'exploration pancréatique puisqu'elle permet de réaliser un prélèvement au niveau de la masse à caractériser. Il s'agit d'une exploration qui associe l'endoscopie, c'est-à-dire la visualisation de l'intérieur du tube digestif, à l'échographie, qui est une analyse par les ultrasons de la paroi et des organes situés au-delà de la paroi. Une sonde d'échographie est amenée à l'aide d'un endoscope à proximité de l'organe à étudier, elle permet de rechercher et d'explorer des lésions du tube digestif ou des organes de voisinage. En comparaison des techniques d'imagerie, l'écho-endoscopie permet de détecter des tumeurs de taille inférieure (< 1 cm), avec une plus grande sensibilité. Concernant les lésions < 2 cm, elles sont détectées avec une sensibilité et une performance de 100%, et une spécificité > 95% (Okano *et al.*, 2014). Ces excellents résultats montrent la performance de cette technique dans le diagnostic du cancer du pancréas de stade très précoce. De plus, les biopsies de tissus permettant l'analyse cytologique et anatomo-pathologique, il est envisageable qu'à l'avenir la délivrance d'une chimiothérapie se fasse sur la base de cette analyse histologique.

3. Vers une meilleure caractérisation de l'adénocarcinome ductal

Les récentes avancées en génétique et épigénétique dans la biologie du cancer du pancréas ont permis de mettre en évidence des mutations récurrentes comme pour les gènes *kras*, *smad4*, *tp53* et *cdkn2a/p16*, des dérégulations de voies de signalisation allant vers de nouvelles définitions de sous-types tumoraux avec des pronostics et prises en charge différentes. En 2008, l'une des premières analyses génomiques globales réalisées sur 24 échantillons de tumeurs (cancers avancés) avait conduit à l'identification globale de 12 voies de signalisation dérégulées. Parmi celles-ci, on pouvait trouver l'apoptose, le contrôle des dommages à l'ADN, les voies Hedgehog et Wnt/Notch (Jones *et al.*, 2008). Cette étude, ainsi que de nombreuses autres, a permis de comprendre d'une part que les mutations sont fréquentes dans ce type de cancer et d'autre part qu'elles ne sont pas uniquement restreintes aux gènes connus et impliqués dans la cancérogenèse. Cela a des conséquences importantes en terme de stratégie thérapeutique puisque il existe une réelle nécessité de cibler des protéines clés et/ou leurs voies de signalisation en aval plutôt que les oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeur. D'autre part, l'identification de voies de signalisation moins connues peut également apporter de nouvelles pistes thérapeutiques.

D'un point de vue clinique, ces avancées dans les connaissances génétiques et épigénétiques du cancer du pancréas ont permis de définir trois sous-types d'adénocarcinomes sur la base d'analyses des profils transcriptionnels d'échantillons primaires de tumeurs et de lignées cellulaires pancréatiques humaines et murines. Les sous-types ainsi définis étaient : classique, quasi-mésenchymateux et « exocrine-like » (Collisson *et al.*, 2011). Cette classification s'est avérée pertinente au niveau du pronostic avec une survie statistiquement meilleure pour les sous-types classiques en comparaison des quasi-mésenchymateux. D'autres analyses de lignées cellulaires humaines suggèrent également que la réponse thérapeutique diffère selon les sous-types : la thérapie ciblée à base d'erlotinib est plus efficace dans le sous-type classique alors que le sous-type quasi-mésenchymateux est plus sensible à la gemcitabine. Enfin, l'utilisation d'ARN interférent ciblant *kras* induit un effet antiprolifératif plus important pour les sous-types classique en comparaison des quasi-mésenchymateux.

Cependant, la répartition des mutations récurrentes du cancer du pancréas (*kras*, *smad4*, *tp53* et *cdkn2a/p16*) pour ces sous-types n'est pas connue, il serait intéressant de savoir s'il existe des corrélations entre la présence de mutations récurrentes, cette classification en sous-type tumoral et la réponse clinique.

Ainsi, l'ensemble des travaux de recherche fondamentale mené sur le cancer du pancréas permet de mettre en évidence de nombreuses cibles potentielles pour des candidats médicaments.

B. Quelques molécules innovantes en cours d'essai clinique dans le cancer du pancréas

Dans cette pathologie, de nombreuses pistes ont été explorées puisque de nombreux agents cytotoxiques ont été utilisés seuls ou en combinaison. Aujourd'hui, les thérapies ciblées continuent de susciter un grand intérêt clinique mais également d'autres approches ciblant par exemple le stroma tumoral, les mécanismes de résistance aux agents cytotoxiques ou encore les cellules immunitaires.

1. Essais cliniques en cours d'investigation pour le cancer du pancréas

Le **Tableau 4** répertorie l'ensemble des études cliniques en cours recensées par l'INCa (Institut National du Cancer) menés dans le cadre du cancer du pancréas.

Tableau 4 : Etudes cliniques en cours pour le cancer du pancréas, répertoriées par l'Institut National du Cancer

Nom de l'essai	Phase de l'essai	Cancer du pancréas	Phase 1 du traitement	Phase 2 du traitement
AFUGEM	Phase II randomisé	Cancer métastatique	ABI-007 (PACLITAXEL-albumine) + gemcitabine vs ABI-007 + acide folinique + 5-FU	
PRODIGE 24	Phase III randomisé	Cancer opérable	Oxaliplatine + 5-FU + acide folinique + irinotécan (FOLFIRINOX) vs gemcitabine	
H9H-MC-JBAJ	Phase Ib/II	Cancer métastatique (phase Ib) et cancer non opérable localement avancé ou métastatique	LY2157299 (inhibiteur des récepteurs à TGFβ) + gemcitabine	Gemcitabine + placebo Vs LY2157299 + gemcitabine
2009-011992-61	Phase II	Cancer métastatique	Gemcitabine + placebo vs gemcitabine + AS703026 (inhibiteur de MEK1/2)	
NEOPAC / IPC 2011-002	Phase III randomisé	Cancer de la tête du pancréas résécable	Gemcitabine + oxaliplatine puis opération vs opération + gemcitabine + oxaliplatine	Gemcitabine seule
GATE 1	Phase II	Adénocarcinome pancréatique métastatique Traitement de 1 ^{ère} ligne	Trastuzumab + erlotinib + gemcitabine	
RC48	Phase I-II	cancer	Cetuximab + fludarabine + cyclophosphamide + thérapie cellulaire (injection de cellules NK) + IL2	
CMEK162X2111	Phase 1b/2	Cancer avancé avec mutation de KRAS ou de BRAF (phase Ib) Adénocarcinome métastatique (phase 2)	MEK162 (inhibiteur de MEK) + ganitumab	MEK162 + ganitumab
CAOU6	Phase III	Adénocarcinome métastatique	ABI-007 + gemcitabine vs gemcitabine seule	
ESPAC-4	Phase III randomisé	Cancer résécable	Gemcitabine vs gemcitabine + capécitabine	
CO-101-001	Phase II randomisé	Cancer métastatique	CO-1.01 (conjugué d'acide élaïdique-Gemcitabine) vs gemcitabine	
ASTELLAS 2008002	Phase II randomisé	Cancer métastatique	Gemcitabine + AGS-1C4D4 (anticorps monoclonal anti-PSCA (cellule souche de prostate)) vs gemcitabine	
AB SCIENCES AB07012	Phase III randomisé	Cancer avancé ou métastatique	Gemcitabine + masitinib vs gemcitabine	
THERAPY	Phase I/II	Cancer métastatique	Cétuximab + trastuzumab	
Essai PANTER	Phase II	Cancer du pancréas, traitement de 2 ^{ème} ligne	efavirenz	
GERCOR LAP 07D07-1	Phase III randomisé	Adénocarcinome avancé	gemcitabine vs gemcitabine + erlotinib	gemcitabine (+/- erlotinib)

				vs radiothérapie + capécitabine (+/- erlotinib)
SciClone SCI-RP-Pan-P2-001	Phase II randomisé en double aveugle	Adénocarcinome non résécable, localement avancé ou métastatique Traitement de 1ère ligne	gemcitabine vs gemcitabine + RP101 (ou Brivudine, liaison à Hsp27)	
Hoffman-La Roche BO21129	Phase II randomisé	Cancer avancé	erlotinib	
Pharmexa PRIMOVAX	Phase III randomisé	Cancer avancé	Gemcitabine + GV001 (stimulateur des LT CD8) vs gemcitabine	
Hoffmann-La Roche BO21128	Phase II randomisé	Cancer métastatique	Gemcitabine + erlotinib vs gemcitabine	
Sanofi-Aventis EFC10203	Phase III randomisé	Cancer métastatique précédemment traité par gemcitabine	S-1 (5-FU modifié) vs 5-FU	
Pfizer A4061028	Phase III randomisé	Cancer avancé ou métastatique	Gemcitabine + AG-013736 (axitinib) vs gemcitabine	
Sanofi-Aventis EFC 10547	Phase III randomisé	Cancer métastatique	Gemcitabine + aflibercept vs gemcitabine	
CAPERGEM	Phase I	Cancer évolué	Gemcitabine + capécitabine + erlotinib	
ACCORD 11 PRODIGE 4	Phase II/III randomisé	Cancer métastatique	FOLFIRINOX vs gemcitabine	
ACCORD 09	Phase II randomisé	Cancer non résécable	Docétaxel + 5-FU vs radiothérapie + docétaxel + cisplatine Protocole révisé en radiothérapie + docétaxel + cisplatine	
	Phase I/II	Cancer avancé	Radiothérapie + irinotécan	
BAYPAN	Phase III randomisé	Cancer avancé	Gemcitabine + sorafénib vs gemcitabine	

Parmi l'ensemble des protocoles et molécules en cours d'évaluation, certaines d'entre elles, qui semblent prometteuses dans la thérapie du cancer du pancréas, sont documentées dans les parties suivantes.

2. Molécules ciblant le microenvironnement tumoral

a) Voie du VEGF : en cours d'essai clinique de phase III

C'est un anticorps anti-VEGF humanisé développé par Roche actuellement évalué dans de nombreux essais cliniques à la fois pour des tumeurs localisées, résécables mais également pour des tumeurs plus avancées, non résécables, et métastatiques. Le bevacizumab en se liant au VEGF, l'empêche de se lier à ses récepteurs, le VEGF-R1 et VEGF-R2, présents à la surface des cellules endothéliales. La liaison ligand / récepteur participe à la néoangiogenèse, phénomène critique de la croissance tumorale et de la formation de métastases. L'intérêt de l'utilisation du bevacizumab semble évident compte tenu de son mécanisme d'action. L'administration de bévacizumab ou de son anticorps murin parent dans des modèles précliniques de souris Nude porteuses de xénogreffes a induit une importante activité anti-tumorale sur des cancers humains, dont les cancers du côlon, du sein, du pancréas et de la prostate. La progression de la maladie métastatique a été inhibée et la perméabilité micro-vasculaire réduite. Toutefois, les études cliniques de phase III menées pour des cancers pancréatiques avancés n'ont pas mis en évidence d'augmentation de l'efficacité du traitement. Certains auteurs pensent qu'un biomarqueur prédictif de l'efficacité de cet anticorps serait nécessaire pour permettre un criblage des populations d'intérêt.

Une autre molécule en cours d'essai clinique de phase III pour le cancer du pancréas avancé est l'elpamotide, il s'agit d'un peptide antagoniste de VEGFR2. Le recrutement des patients est complet et un communiqué de la part d'un comité consultatif a recommandé la poursuite de l'essai compte tenu du bénéfice en terme de survie pour la combinaison gemcitabine / elpamotide.

b) Voie du TGF- β : en cours d'essai clinique de phase I et II

Le TGF- β est une autre voie de régulation impliquée dans la stimulation de la réaction stromale, l'invasion, les métastases et l'angiogenèse du cancer du pancréas. Un inhibiteur du récepteur 1 du TGF-

β , le LY2157299, est actuellement en cours d'étude pour des phases cliniques I et II dans des cancers avancés.

3. Molécules ciblant les voies de signalisation

a) Erlotinib : en cours d'essai clinique de phase III

L'erlotinib est un inhibiteur de la tyrosine kinase de EGFR (également appelé HER1). L'erlotinib est un puissant inhibiteur de la phosphorylation intracellulaire de l'EGFR. L'EGFR est exprimé à la surface de cellules normales et cancéreuses. Dans des modèles non cliniques, l'inhibition de la phosphotyrosine de l'EGFR induit un arrêt de la prolifération suivi ou non de l'apoptose.

Par conséquent, des mutations de l'EGFR peuvent conduire à une activation constitutive des voies de signalisation anti-apoptotique et de la prolifération. L'efficacité d'erlotinib sur le blocage de la signalisation induite par EGFR dépend des mutations activatrices au niveau tumoral. Erlotinib est donc indiqué dans le cadre des cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) présentant une mutation activatrice de l'EGFR en première ligne de traitement, mais pas uniquement. Toutefois, aucun bénéfice de survie ou autres effets cliniquement significatifs du traitement n'ont pas été démontrés chez les patients dont l'EGFR n'est pas activé.

Dans le cas du cancer du pancréas, la mutation *egfr* est très faiblement représentée (< 3%). L'utilisation de l'erlotinib découle donc d'une étude clinique de phase III canadienne comparant la gemcitabine seule ou en combinaison avec l'erlotinib pour des cancers avancés ou métastatiques (Thota *et al.*, 2014). La combinaison a induit une augmentation significative de la survie globale (6,2 vs 5,9), même si les modestes 2 semaines de survie supplémentaires peuvent faire l'objet de débats. Cette thérapie ciblée est l'une des seules à avoir induit un gain de survie dans le cadre de ce cancer. Concernant le mécanisme d'action de la molécule, indépendamment de la mutation activatrice du gène, il a récemment été montré que la combinaison gemcitabine / erlotinib aurait une action combinée au niveau de la voie de signalisation EGFR, la gemcitabine induirait l'expression des ligands de l'EGFR, erlotinib inhiberait consécutivement l'hétérodimérisation de l'EGFR (Miyabayashi *et al.*, 2013).

Des anticorps ciblant l'EGFR existent également, il s'agit du cetuximab (erbitux®), du panitumumab (Vectibix®) et du nimotuzumab, tous actuellement en cours d'essais cliniques notamment de phase 3 dans les cancers du pancréas.

b) Ruxolitinib : en cours d'essai clinique de phase III

Il s'agit d'un inhibiteur de JAK1 et JAK2 (Janus Kinase) développé par Incyte. Cette molécule avait obtenu une ATU (Autorisation Temporaire d'Utilisation) en France en 2012 dans le cadre de myélofibrose primitive ou secondaire à la maladie de Vaquez. Il ne semble pas qu'elle possède d'AMM en France, alors qu'elle en possède une dans de nombreux pays, dont les Etats-Unis. L'activation de la voie de signalisation JAK/STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) fait l'objet de nombreuses recherches puisque l'activation de celle-ci via l'activation puis la translocation des facteurs de transcription STAT3 et STAT5 induit la transcription de gènes régulant la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que l'apoptose (Quintas-Cardama *et al.*, 2013).

L'essai de phase III menée dans le cancer du pancréas consiste à évaluer l'efficacité du ruxolitinib en association avec la capécitabine pour les adénocarcinomes avancés et métastatiques, en seconde intention. Cette étude a été motivée par les résultats de l'étude de phase II où le ruxolitinib en combinaison avec la capécitabine pour des cancers métastatiques ont montré un bénéfice pour des patients présentant un fort taux de CRP (C-reactive protein), marqueur systémique de l'inflammation.

c) Autres molécules

La voie de signalisation Sonic Hedgehog joue un rôle important dans la stimulation du stroma tumoral. Des inhibiteurs de cette voie tels que le vismodegib sont actuellement en cours d'évaluation dans des essais clinique de phase III pour des cancers avancés et métastatiques.

4. La déplétion en nutriments : ERY-ASP/GRASPA® : en cours d'essai clinique de phase II

La molécule ERY-ASP/GRASPA®, qui est de l'asparaginase encapsulée à l'intérieur des globules rouges, vient d'obtenir une autorisation pour débiter une étude de phase II en 2^{ème} ligne de traitement. L'asparaginase encapsulée va permettre la dégradation de l'asparagine circulante, requise pour la croissance tumorale, affamant ainsi les cellules cancéreuses. Les effets secondaires liés aux fortes doses de traitement sont également réduits puisque la dose administrée au patient est 10 fois plus faible lorsque la molécule est encapsulée.

Cette idée de déléter la tumeur en asparagine est évaluée depuis plusieurs dizaines d'années. Au départ, la déplétion se faisait en utilisant de la L-asparaginase bactérienne (Agrawal *et al.*, 2013). Dans une étude multi-centrique randomisée menée chez des adultes et des enfants atteints de Leucémie Aiguë Lymphoblastique (LAL) en rechute (Capizzi *et al.*, 1988), les patients recevaient soit de la L-asparaginase encapsulée dans des globules rouges à différentes doses (GRASPA®) soit des perfusions intraveineuses de E. coli L-asparaginase. Pour les deux bras de traitement, la durée de déplétion de l'asparagine était proche, en revanche GRASPA® était à l'origine de moins de réactions allergiques, de thromboses.

Aujourd'hui, la société ERYTECH Pharma a terminé deux essais cliniques de phase I/II et de phase II, et conduit actuellement un essai de phase III en Europe pour les LAL. Elle a débuté un essai de phase IIb pour les LAM (Leucémie Aiguë Myéloïde) et vient de recevoir l'autorisation de démarrer son étude clinique de phase II dans le cancer du pancréas. L'étude va consister en une étude de 100 patients où ERY-ASP sera ajouté et comparé au traitement standard avec randomisation de 2 à 1. Les patients seront stratifiés en fonction de l'expression tumorale de l'asparagine synthétase (ASNS) de leur tumeur primaire. La faible expression de l'ASNS est considérée comme un indicateur de sensibilité de la tumeur à l'asparaginase. La société à l'origine des recherches estime que près de 70% des patients sont négatifs en ASNS et pourraient être répondeurs au traitement.

5. L'immunothérapie : Algenpantucel : en cours d'essai clinique de phase III

Algenpantucel-L est l'une des immunothérapies la plus avancée et la plus prometteuse pour le cancer du pancréas. Algenpantucel-L est une combinaison de lignées cellulaires pancréatiques humaines allogéniques exprimant l'enzyme murine α -1,3-galactosyl transférase (α -GT), qui induit la synthèse d'épitopes α -galactosyl (α -Gal) au niveau des protéines de surface membranaire et des glycolipides. L'Homme et les grands singes possèdent un gène α -GT non fonctionnel et n'exprime pas d'épitopes α -Gal. En revanche, ils expriment une quantité importante d'anticorps anti- α -Gal (Galili *et al.*, 1988). L'interaction *in vivo* entre les anticorps anti- α -Gal et les épitopes α -Gal d'Algenpantucel-L active la lyse dépendante du complément et la toxicité cellulaire dépendante des anticorps, à l'origine d'une réaction immunitaire hyper-aiguë de rejet envers les cellules allogéniques. Cette immunothérapie hyper-aiguë est basée sur l'hypothèse que la réactivité contre les épitopes α -Gal chez l'Homme pourrait être à l'origine d'une réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses. Ce mécanisme a été démontré chez des animaux modèles (Rossi *et al.*, 2008).

Des résultats d'une étude multi-centrique de phase II ont été présentés (NLG0205) [ClinicalTrials.gov identifier : NCT00569387] dans laquelle le recours à l'immunothérapie hyper-aiguë a été évaluée chez des patients présentant une tumeur du pancréas résécable (Hardacre *et al.*, 2012). Dans cette étude, les patients ont reçu 100 ou 300 millions de cellules injectées sous forme intra-dermique (jusqu'à 14 injections ont été pratiquées). Aucun événement indésirable sérieux n'a été mis en évidence, l'événement indésirable le plus fréquent étant une induration et un prurit au niveau du site d'injection. De manière intéressante, une infiltration d'éosinophiles a été mise en évidence pour l'ensemble des patients testés au niveau du site d'injection ainsi qu'en périphérie pour 70% d'entre eux. Pour ces patients, 30% ont montrés une éosinophilie persistante jusqu'à 10 ans. Le premier critère de cette étude était la survie sans maladie à 1 an, il a été atteint pour 62% des patients. Le second était la survie globale à un an, il a été atteint pour 86% des patients. Les résultats de cette étude ont été comparés à ceux de l'étude RTOG-9704 évaluant la radio-chimiothérapie dans le cadre du cancer du pancréas (Regine *et al.*, 2008), et en dépit d'un plus grand envahissement ganglionnaire pour l'étude NLG0205 (81% vs 68%), celle-ci a montré un pourcentage de survie global à 1 an supérieur (86% vs 69%). Pour conclure cette analyse comparative, il a donc été rapporté qu'Algenpantucel-L induisait un avantage de survie significatif pour les cancers du pancréas résécables, avec une toxicité minimale associée. Sur la base de ces résultats encourageants, une étude multi-centrique de phase III a été autorisée en 2010 aux USA. La fin de l'étude est programmée pour début 2015.

6. Molécules conjuguées à un anticorps

a) ⁹⁰Y-clivatuzumab tetraxetan

Ce candidat médicament est développé par Immunomedics, il s'agit de leur candidat médicament le plus avancé, actuellement en cours d'essai clinique de phase III pour des cancers pancréatiques métastatiques en 3^{ème} ligne de traitement, en complément de la gemcitabine. Il s'agit d'un anticorps humanisé anti-mucine, qui est un antigène spécifiquement exprimé par les cellules cancéreuses du pancréas. Cet anticorps est conjugué à un linker qui permet le complexe avec le radioélément. La mucine semble être exprimée par 85% des cancers pancréatiques, mais non exprimée par le tissu normal ou lors de pancréatites. Lorsque le complexe anticorps-linker est radiomarqué avec l'yttrium-90, la reconnaissance antigène / anticorps au niveau de la cellule cancéreuse permet une administration en profondeur du radioélément. L'ajout de gemcitabine agit comme un radio-sensibilisateur qui augmente l'activité anti-tumorale. ⁹⁰Y-clivatuzumab tetraxetan a reçu le statut de

médicament orphelin aux Etats-Unis et en Europe. Les premiers retours de l'essai clinique mettent en évidence des résultats encourageants avec le ⁹⁰Y-clivatuzumab tetraxan en combinaison avec la gemcitabine pour les patients atteints de cancers pancréatiques localisés ou seul pour les patients en rechute.

b) Isatuzumab Govitecan : en cours d'essai de phase I/II

L'EMA (European Medicines Agency) vient d'accorder le statut de médicament orphelin à la société Immunomedics pour sa molécule Isatuzumab Govitecan (IMMU-132) pour le traitement du cancer pancréatique. Il s'agit de la même société qui développe ⁹⁰Y-clivatuzumab tetraxan. L'IMMU-132 avait déjà obtenu le statut de médicament orphelin par la FDA pour le traitement du cancer du pancréas et du cancer du poumon à petites cellules. La thérapie à base d'IMMU-132 consiste en un anticorps (hRS7) couplé à un cytotoxique, le SN-38 (ADCs pour Antibody-drug conjugates). L'IMMU-132 est un anticorps humanisé (hRS7) anti-TROP-2 (antigène de la surface membranaire des trophoblastes aussi appelé EGP-1 pour Epithelial Glycoprotein-1 antigen). TROP-2 est exprimée dans de nombreux cancers, tels que le sein, le cerveau, le colon et le rectum, le rein, le foie, le poumon, l'ovaire, le pancréas et la prostate avec une expression limitée au niveau du tissu sain. Après la reconnaissance antigène / anticorps, hRS7 est alors internalisé au niveau cellulaire, ce qui fait de cet anticorps un bon vecteur de cytotoxiques. En couplant le SN-38, qui est le métabolite actif de l'irinotécan, à l'IMMU-132 lors d'essai précliniques, les chercheurs ont mis en évidence une administration de SN-38 augmentée de 120 fois au niveau de tumeurs pancréatiques xénogreffées. Ce système permet une augmentation de la survie et une régression tumorale dans de nombreux modèles animaux greffés avec différentes tumeurs humaines.

L'IMMU-132 est actuellement en cours d'essais cliniques de phase I/II pour le cancer du pancréas.

7. De nouveaux vecteurs pour les cytotoxiques

a) Le Nab-paclitaxel : en cours d'essai clinique de phase III

Comme décrit dans la partie micro-environnement tumoral, les cellules stellaires stimulent la production de substances à l'origine du phénotype invasif. Il existe une corrélation inverse entre le

taux de SPARC (Paracrine Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein) produit par les cellules stellaires et la survie des patients (Mantoni *et al.*, 2008). La molécule Nab-paclitaxel est une nanoparticule de paclitaxel coatée d'albumine, il s'agit d'un poison du fuseau mitotique qui inhibe la polymérisation des microtubules. Le mécanisme anti-tumoral de cette molécule n'est pas complètement élucidé. L'un des autres mécanismes d'action du Nab-paclitaxel se fait à travers la liaison au récepteur gp60 (récepteur de l'albumine endogène, qui est le transporteur endogène des molécules hydrophobes dans l'organisme) qui permet son passage trans-endothélial (Al-Batran *et al.*, 2014). Une déplétion du stroma tumoral a également été mise en évidence, par ciblage de l'albumine endogène, dont SPARC au niveau du tissu tumoral (Arslan *et al.*, 2014). Dans des modèles de souris xénogreffés, cette déplétion du stroma environnant la tumeur par le Nab-paclitaxel facilite la perfusion de la gemcitabine. Ainsi, la concentration intra-tumorale de gemcitabine était 3,7 fois supérieure pour le groupe Nab-paclitaxel.

Dans un essai clinique de phase III pour des cancers métastatiques en combinaison avec de la gemcitabine, la médiane de survie sans progression était supérieure pour le groupe recevant le Nab-paclitaxel, 6,2 mois versus 4,8 mois (Von Hoff *et al.*, 2009). Face à ces résultats prometteurs, le Nab-paclitaxel est actuellement en cours d'essai de phase III en combinaison avec la gemcitabine pour des cancers résecables, mais également pour des cancers plus avancés.

b) MM-398 : en cours d'essai clinique de phase III

La nanoparticule MM-398 consiste en une particule lipidique encapsulant l'irinotécan afin de protéger le cytotoxique notamment au niveau de la circulation sanguine, permettant ainsi une augmentation des concentrations administrées au niveau tumoral. L'encapsulation de l'irinotécan pourrait empêcher le métabolisme prématuré du cytotoxique, réduire l'exposition systémique au cytotoxique, et donc permettre une administration de concentration supérieure au niveau tumoral. Selon les résultats qui seront obtenus lors des essais cliniques avec le MM-398, cette nanoparticule vise à remplacer l'utilisation d'irinotécan, largement utilisé en monothérapie pour de nombreux cancers (pancréatique, colorectal, poumon, ovaire, estomac, sein, leucémie, lymphome et cerveau), en démontrant que l'efficacité et la sécurité du MM-398 est comparable à celle de l'irinotécan. L'essai clinique de phase III est réalisé pour des cancers métastatiques en situation d'échec lors de la prise en charge par la gemcitabine. L'essai vise à comparer l'efficacité du MM-398 par rapport à la combinaison 5-FU et leucovorin, qui est l'une des combinaisons utilisées pour la prise en charge des cancers métastatiques

après échec de la gemcitabine. Les critères de cet essai sont une différence significative au niveau de la survie globale et secondairement une survie sans progression.

c) Lipoplatine : en cours d'essai clinique de phase III

Cette forme encapsulée du cisplatine dans des liposomes permet de ne plus avoir la toxicité rénale liée à l'administration de cisplatine, tout en conservant une activité similaire (Stathopoulos *et al.*, 2006). Les études d'efficacité et de toxicité de phase I/II menées lors de l'administration de lipoplatine en combinaison avec la gemcitabine ont mis en évidence une réponse pour 8,33% des patients, une maladie stable pour 58,3%, et un soulagement de la douleur pour 33,3%. En considérant que l'ensemble des patients inclus était soit réfractaires au traitement soit en progression lors de leurs précédentes prises en charge qui incluaient la gemcitabine, les taux de réponse obtenus semblent pouvoir être attribués au lipoplatine. Le lipoplatine peut circuler plus longtemps et les biopsies tumorales montrent des concentrations 5 à 50 fois augmentées lors de l'administration de lipoplatine en comparaison du tissu sain.

Le lipoplatine est en cours d'essai clinique de phase III en combinaison avec la gemcitabine, le 5-FU et une radiothérapie versus la gemcitabine pour des cancers avancés mais non métastatiques.

Perspectives : vers une thérapie personnalisée

Le cancer du pancréas, en particulier l'adénocarcinome ductal très largement majoritaire (90% des tumeurs exocrines), et qui a fait l'objet de ce travail de thèse, est l'un des cancers au pronostic le plus sombre avec 74 % des patients décédés durant l'année qui suit le diagnostic. Il existe un réel besoin en nouvelles thérapies. En effet, les alternatives thérapeutiques à la gemcitabine, qui est la molécule de référence dans la prise en charge de ce cancer, n'ont apporté que des augmentations faibles de la survie globale, la meilleure augmentation revient au protocole FOLFIRINOX avec 4,2 mois supplémentaires, en comparaison à la gemcitabine. La recherche de nouveaux biomarqueurs et de nouvelles méthodes d'imagerie, par exemple de traceurs radioactifs en TEP, sont critiques et permettront un diagnostic précoce de ce cancer, afin d'offrir aux patients les meilleures chances de survie lors de leur prise en charge.

L'augmentation des connaissances de la biologie de ce cancer dans de nombreux domaines, et que nous avons abordée tout au long de ce travail, a permis de mettre sur la piste de nombreux traitements et nouvelles thérapies ciblées, actuellement en cours d'investigations cliniques. Ces agents incluent des petites molécules inhibitrices des oncogènes et voies de signalisation dérégulées (erlotinib, ruxolitinib), des anticorps monoclonaux couplés à des cytotoxiques (⁹⁰Y-clivatuzumab tetraxan, isatuzumab govitecan), ou encore de nouvelles nanoparticules contenant des cytotoxiques (Nab-paclitaxel). La meilleure connaissance du microenvironnement tumoral et des cellules souches cancéreuses est également un des points critiques qui aboutit à des agents en cours de développement tels que des inhibiteurs de la voie Hedgehog. La disponibilité des multiples modèles précliniques, abordés dans ce travail, sont indispensables pour mener ces recherches puisqu'ils recréent la complexité de la pathologie humaine.

Les recherches en cours permettront peut-être de mettre en évidence des sous-types tumoraux comme cela est déjà le cas pour certains cancers (du sein, du poumon...). En effet, il a été décrit sur la base d'analyses des profils transcriptionnels, des sous-types qui sont classiques, quasi-mésenchymateux et « exocrine-like » (Collisson *et al.*, 2011). Ce qui est particulièrement intéressant est que la thérapie ciblée à base d'erlotinib s'est montrée plus efficace dans les sous-types classiques que dans les quasi-mésenchymateux, ce dernier étant plus sensible à la gemcitabine. Enfin, l'utilisation d'ARN interférent ciblant *kras* induit un effet antiprolifératif plus important pour les sous-types classiques en comparaison des quasi-mésenchymateux. Cela semble indiquer que ce cancer est hétérogène et que de meilleures réponses thérapeutiques pourraient potentiellement être obtenues en réalisant d'une part une caractérisation tumorale, par exemple sur la base de biopsies, et une individualisation du traitement.

Bibliographie

Agrawal V, Woo JH, Borthakur G, Kantarjian H, Frankel AE. Red blood cell-encapsulated L-asparaginase: potential therapy of patients with asparagine synthetase deficient acute myeloid leukemia. *Protein Pept Lett.* 2013 Apr;20(4):392-402.

Al-Batran SE, Geissler M, Seufferlein T, Oettle H. **Nab-paclitaxel for metastatic pancreatic cancer: clinical outcomes and potential mechanisms of action.** *Oncol Res Treat.* 2014;37(3):128-34.

Arslan C, Yalcin S. **Current and future systemic treatment options in metastatic pancreatic cancer.** *J Gastrointest Oncol.* 2014 Aug;5(4):280-95.

Bardeesy N, Aguirre AJ, Chu GC, Cheng KH, Lopez LV, Hezel AF, Feng B, Brennan C, Weissleder R, Mahmood U, Hanahan D, Redston MS, Chin L, Depinho RA. **Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Apr 11;103(15):5947-52.

Belot A, Grosclaude P, Bossard N, Jouglu E, Benhamou E, Delafosse P, Guizard AV, Molinié F, Danzon A, Bara S, Bouvier AM, Trétarre B, Binder-Foucard F, Colonna M, Daubisse L, Hédelin G, Launoy G, Le Stang N, Maynadié M, Monnereau A, Troussard X, Faivre J, Collignon A, Janoray I, Arveux P, Buemi A, Raverdy N, Schvartz C, Bovet M, Chérié-Challine L, Estève J, Remontet L, Velten M. **Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005.** *Rev Epidemiol Sante Publique.* 2008 Jun;56(3):159-75.

Canto MI, Goggins M, Yeo CJ, Griffin C, Axilbund JE, Brune K, Ali SZ, Jagannath S, Petersen GM, Fishman EK, Piantadosi S, Giardiello FM, Hruban RH. **Screening for pancreatic neoplasia in high-risk individuals: an EUS-based approach.** *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004 Jul;2(7):606-21.

Capizzi RL, Davis R, Powell B, Cuttner J, Ellison RR, Cooper MR, Dillman R, Major WB, Dupre E, McIntyre OR. **Synergy between high-dose cytarabine and asparaginase in the treatment of adults with refractory and relapsed acute myelogenous leukemia--a Cancer and Leukemia Group B Study.** *J Clin Oncol.* 1988 Mar;6(3):499-508.

Collisson EA, Sadanandam A, Olson P, Gibb WJ, Truitt M, Gu S, Cooc J, Weinkle J, Kim GE, Jakkula L, Feiler HS, Ko AH, Olshen AB, Danenberg KL, Tempero MA, Spellman PT, Hanahan D, Gray JW. **Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy.** *Nat Med.* 2011 Apr;17(4):500-3.

Chauffert B, Mornex F, Bonnetain F, Rougier P, Mariette C, Bouché O, Bosset JF, Aparicio T, Mineur L, Azzedine A, Hammel P, Butel J, Stremmsdoerfer N, Maingon P, Bedenne L. **Phase III trial comparing intensive induction chemoradiotherapy (60 Gy, infusional 5-FU and intermittent cisplatin) followed by maintenance gemcitabine with gemcitabine alone for locally advanced unresectable pancreatic cancer. Definitive results of the 2000-01 FFCD/SFRO study.** *Ann Oncol.* 2008 Sep;19(9):1592-9.

Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS. **Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures.** *Methods.* 2003 Jul;30(3):256-68.

Farrell JJ, Elsaleh H, Garcia M, Lai R, Ammar A, Regine WF, Abrams R, Benson AB, Macdonald J, Cass CE, Dicker AP, Mackey JR. **Human equilibrative nucleoside transporter 1 levels predict response to gemcitabine in patients with pancreatic cancer.** *Gastroenterology.* 2009 Jan;136(1):187-95.

Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. **Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach.** Nat Protoc. 2009;4(3):309-24.

Froeling FE, Marshall JF, Kocher HM. **Pancreatic cancer organotypic cultures.** J Biotechnol. 2010 Jul 1;148(1):16-23.

Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, Egami T, Miyoshi K, Moriyama T, Cui L, Yu J, Zhao M, Manabe T, Tanaka M. **Tumor-stromal interactions with direct cell contacts enhance proliferation of human pancreatic carcinomacells.** Cancer Sci. 2009 Dec;100(12):2309-17.

Galili U, Shohet SB, Kobrin E, Stults CL, Macher BA. **Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells.** J Biol Chem. 1988 Nov 25;263(33):17755-62.

Goggins M. **Molecular markers of early pancreatic cancer.** J Clin Oncol. 2005 Jul 10;23(20):4524-31.

Gold EB, Goldin SB. **Epidemiology of and risk factors for pancreatic cancer.** Surg Oncol Clin N Am. 1998 Jan;7(1):67-91.

Gresham GK, Wells GA, Gill S, Cameron C, Jonker DJ. **Chemotherapy regimens for advanced pancreatic cancer: a systematic review and network meta-analysis.** BMC Cancer. 2014 Jun 27;14:471.

Guerra C, Schuhmacher AJ, Cañamero M, Grippo PJ, Verdaguer L, Pérez-Gallego L, Dubus P, Sandgren EP, Barbacid M. **Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice.** Cancer Cell. 2007 Mar;11(3):291-302.

Guérin S, Hill C. **[Cancer epidemiology in France in 2010, comparison with the USA].** Bull Cancer. 2010 Jan;97(1):47-54.

Hardacre JM, Mulcahy M, Small W, Talamonti M, Obel J, Krishnamurthi S, Rocha-Lima CS, Safran H, Lenz HJ, Chiorean EG. **Addition of algenpantucel-L immunotherapy to standard adjuvant therapy for pancreatic cancer: a phase 2 study.** J Gastrointest Surg. 2013 Jan;17(1):94-100; discussion p. 100-1.

Hennessey PT, Ochs MF, Mydlarz WW, Hsueh W, Cope L, Yu W, Califano JA. **Promoter methylation in head and neck squamous cell carcinoma cell lines is significantly different than methylation in primary tumors and xenografts.** PLoS One. 2011;6(5):e20584.

Herrerros-Villanueva M¹, Hijona E, Cosme A, Bujanda L. **Mouse models of pancreatic cancer.** World J Gastroenterol. 2012 Mar 28;18(12):1286-94.

Hidalgo M. **New insights into pancreatic cancer biology.** Ann Oncol. 2012 Sep;23 Suppl 10:x135-8.

Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S, Tuveson DA. **Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice.** Cancer Cell. 2005 May;7(5):469-83.

HogenEsch H, Nikitin AY. **Challenges in pre-clinical testing of anti-cancer drugs in cell culture and in animal models.** J Control Release. 2012 Dec 10;164(2):183-6.

Hruban RH, Petersen GM, Goggins M, Tersmette AC, Offerhaus GJ, Falatko F, Yeo CJ, Kern SE. **Familial pancreatic cancer.** Ann Oncol. 1999;10 Suppl 4:69-73.

Huguet F, Orthuon A, Touboul E, Marsequerra R, Mornex F. **[Pancreatic cancer].** Cancer Radiother. 2010 Nov;14 Suppl 1:S94-102.

Hwang RF, Moore T, Arumugam T, Ramachandran V, Amos KD, Rivera A, Ji B, Evans DB, Logsdon CD. **Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression.** Cancer Res. 2008 Feb 1;68(3):918-26.

Jemal A, Center MM, Ward E, Thun MJ. **Cancer occurrence.** Methods Mol Biol. 2009;471:3-29.

Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Kamiyama H, Jimeno A, Hong SM, Fu B, Lin MT, Calhoun ES, Kamiyama M, Walter K, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Hartigan J, Smith DR, Hidalgo M, Leach SD, Klein AP, Jaffee EM, Goggins M, Maitra A, Iacobuzio-Donahue C, Eshleman JR, Kern SE, Hruban RH, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. **Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses.** Science. 2008 Sep 26;321(5897):1801-6.

Kaur S, Baine MJ, Jain M, Sasson AR, Batra SK. **Early diagnosis of pancreatic cancer: challenges and new developments.** Biomark Med. 2012 Oct;6(5):597-612.

Laurent J, Frongia C, Cazales M, Mondesert O, Ducommun B, Lobjois V. **Multicellular tumor spheroid models to explore cell cycle checkpoints in 3D.** BMC Cancer. 2013 Feb 8;13:73.

Lelièvre SA. **Tissue polarity-dependent control of mammary epithelial homeostasis and cancer development: an epigenetic perspective.** J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2010 Mar;15(1):49-63.

Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. **Identification of pancreatic cancer stem cells.** Cancer Res. 2007 Feb 1;67(3):1030-7.

Longati P, Jia X, Eimer J, Wagman A, Witt MR, Rehnmark S, Verbeke C, Toftgård R, Löhr M, Heuchel RL. **3D pancreatic carcinoma spheroids induce a matrix-rich, chemoresistant phenotype offering a better model for drug testing.** BMC Cancer. 2013 Feb 27;13:95.

Mantoni TS, Schendel RR, Rödel F, Niedobitek G, Al-Assar O, Masamune A, Brunner TB. **Stromal SPARC expression and patient survival after chemoradiation for non-resectable pancreatic adenocarcinoma.** Cancer Biol Ther. 2008 Nov;7(11):1806-15.

Mews P, Phillips P, Fahmy R, Korsten M, Pirola R, Wilson J, Apte M. **Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis.** Gut. 2002 Apr;50(4):535-41.

Miller FH, Rini NJ, Keppke AL. **MRI of adenocarcinoma of the pancreas.** AJR Am J Roentgenol. 2006 Oct;187(4):W365-74.

Miyabayashi K, Ijichi H, Mohri D, Tada M, Yamamoto K, Asaoka Y, Ikenoue T, Tateishi K, Nakai Y, Isayama H, Morishita Y, Omata M, Moses HL, Koike K. **Erlotinib prolongs survival in pancreatic cancer by blocking gemcitabine-induced MAPK signals.** Cancer Res. 2013 Apr 1;73(7):2221-34.

Moss RA, Lee C. **Current and emerging therapies for the treatment of pancreatic cancer.** Onco Targets Ther. 2010 Sep 7;3:111-27.

Okano K, Suzuki Y. **Strategies for early detection of resectable pancreatic cancer.** World J Gastroenterol. 2014 Aug 28;20(32):11230-40.

Petersen OW, Rønnov-Jessen L, Howlett AR, Bissell MJ. **Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Oct 1;89(19):9064-8.

Quintás-Cardama A, Verstovsek S. **Molecular pathways: Jak/STAT pathway: mutations, inhibitors, and resistance.** Clin Cancer Res. 2013 Apr 15;19(8):1933-40.

Rasheed ZA, Yang J, Wang Q, Kowalski J, Freed I, Murter C, Hong SM, Koorstra JB, Rajeshkumar NV, He X, Goggins M, Iacobuzio-Donahue C, Berman DM, Laheru D, Jimeno A, Hidalgo M, Maitra A, Matsui W. **Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma.** J Natl Cancer Inst. 2010 Mar 3;102(5):340-51.

Regine WF, Winter KA, Abrams RA, Safran H, Hoffman JP, Konski A, Benson AB, Macdonald JS, Kudrimoti MR, Fromm ML, Haddock MG, Schaefer P, Willett CG, Rich TA. **Fluorouracil vs gemcitabine chemotherapy before and after fluorouracil-based chemoradiation following resection of pancreatic adenocarcinoma: a randomized controlled trial.** JAMA. 2008 Mar 5;299(9):1019-26.

Rossi GR, Mautino MR, Awwad DZ, Husske K, Lejukole H, Koenigsfeld M, Ramsey WJ, Vahanian N, Link CJ. **Allogeneic melanoma vaccine expressing alphaGal epitopes induces antitumor immunity to autologous antigens in mice without signs of toxicity.** J Immunother. 2008 Jul-Aug;31(6):545-54.

Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. **Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma.** Cancer Res. 1997 May 1;57(9):1731-4.

Saif MW. **Advanced stage pancreatic cancer: novel therapeutic options.** Expert Rev Clin Pharmacol. 2014 Jul;7(4):487-98.

Schober M, Jesenofsky R, Faissner R, Weidenauer C, Hagmann W, Michl P, Heuchel RL, Haas SL, Löhner JM. **Desmoplasia and chemoresistance in pancreatic cancer.** Cancers (Basel). 2014 Oct 21;6(4):2137-54.

Stathopoulos GP, Boulikas T, Vougiouka M, Rigatos SK, Stathopoulos JG. **Liposomal cisplatin combined with gemcitabine in pretreated advanced pancreatic cancer patients: a phase I-II study.** Oncol Rep. 2006 May;15(5):1201-4.

Sultana A, Tudur Smith C, Cunningham D, Starling N, Tait D, Neoptolemos JP, Ghaneh P. **Systematic review, including meta-analyses, on the management of locally advanced pancreatic cancer using radiation/combined modality therapy.** Br J Cancer. 2007 Apr 23;96(8):1183-90. Epub 2007 Apr 3.

Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ, Raz A. **Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer.** Am J Pathol. 2007 Mar;170(3):793-804.

Tang S, Huang G, Liu J, Liu T, Treven L, Song S, Zhang C, Pan L, Zhang T. **Usefulness of 18F-FDG PET, combined FDG-PET/CT and EUS in diagnosing primary pancreatic carcinoma: a meta-analysis.** Eur J Radiol. 2011 Apr;78(1):142-50.

Thota R, Pauff JM, Berlin JD. **Treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma: a review.** Oncology (Williston Park). 2014 Jan;28(1):70-4.

Vaccaro V, Sperduti I, Milella M. **FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer.** N Engl J Med. 2011 Aug 25;365(8):768-9; author reply 769.

Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin SA, Ma WW, Saleh MN, Harris M, Reni M, Dowden S, Laheru D, Bahary N, Ramanathan RK, Tabernero J, Hidalgo M, Goldstein D, Van Cutsem E, Wei X, Iglesias J, Renschler MF. **Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine.** N Engl J Med. 2013 Oct 31;369(18):1691-703.

Vonlaufen A, Joshi S, Qu C, Phillips PA, Xu Z, Parker NR, Toi CS, Pirola RC, Wilson JS, Goldstein D, Apte MV. **Pancreatic stellate cells: partners in crime with pancreatic cancer cells.** Cancer Res. 2008 Apr 1;68(7):2085-93.

Wang X, Li Y, Tian H, Qi J, Li M, Fu C, Wu F, Wang Y, Cheng D, Zhao W, Zhang C, Wang T, Rao J, Zhang W. **Macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC-1/GDF15) as a novel diagnostic serum biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma.** BMC Cancer. 2014 Aug 8;14:578.

Yip D, Karapetis C, Strickland A, Steer CB, Goldstein D. **Chemotherapy and radiotherapy for inoperable advanced pancreatic cancer.** Cochrane Database Syst Rev. 2006 Jul 19;(3):CD002093.

Summary

Development and use of preclinical models for the discovery of new molecules in pancreatic cancer.

Ductal adenocarcinomas are the most common among exocrine pancreatic cancers, with 90%. In this thesis work, we will focus on these ductal adenocarcinomas.

The ductal adenocarcinoma's prognosis remains poor, among the worst in survival rates. Around 74% of patients died during the first year of diagnosis and 94% during the first five years after diagnosis. Taking into account that an early diagnostic improves survival rates, searches are currently performed on specific biomarkers or diagnostic imagery. During my pharmacist training, I performed an experimental work in order to develop a new *in vivo* preclinical model in pancreatic cancer. Prospects of pancreatic cancer treatments involving vectored cytotoxic agents and targeted therapies are developed in the next part of this thesis.

AUTEUR : Cindy CAVELIER

TITRE : Développement et utilisation des modèles précliniques pour la découverte de nouvelles thérapeutiques dans le cancer du pancréas

DIRECTEUR DE THESE : Monsieur le Docteur Bruno GOMES

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Toulouse, le 15 décembre 2014

RESUME

Parmi les cancers du pancréas d'origine exocrine, l'adénocarcinome ductal est très largement majoritaire avec 90% des tumeurs, et fait l'objet de cette thèse d'exercice. Ce cancer présente un des taux de survie les plus bas parmi l'ensemble des cancers, avec environ 74% des patients qui décèdent durant la 1^{ère} année qui suit le diagnostic et 94% durant les 5 années suivant le diagnostic. Etant donné qu'un diagnostic précoce de la pathologie permet d'offrir les meilleures chances de survie aux patients, des recherches sont actuellement en cours concernant les biomarqueurs ou encore l'imagerie à visée diagnostique. Des efforts considérables sont également mis en œuvre en recherche afin de mieux comprendre la tumorigenèse de ce cancer, les voies de signalisation dérégulées, les mécanismes de résistance... Un travail expérimental a été réalisé dans le cadre de cette thèse visant à mettre à point un nouveau modèle préclinique de cancer du pancréas. Les perspectives de prise en charge du cancer du pancréas faisant appel notamment à des agents cytotoxiques vectorisés et à des thérapies ciblées sont abordées dans la dernière partie de cette thèse.

Titre et résumé en Anglais : voir au recto de la dernière page de la thèse

DISCIPLINE administrative : Pharmacologie

MOTS-CLES :

Cancer du pancréas – Adénocarcinome ductal - Modèles précliniques – Oncologie – Agents cytotoxiques – Thérapie ciblée

**Université Toulouse III Paul Sabatier
Faculté des Sciences Pharmaceutiques
35, Chemin des Maraichers
31 400 Toulouse**