



HAL
open science

Etude des effets cytotoxique et antitubuline des imidazoquinoxalines : Etude du mécanisme d'action par une analyse transcriptomique

Zahraa Zghaib

► **To cite this version:**

Zahraa Zghaib. Etude des effets cytotoxique et antitubuline des imidazoquinoxalines : Etude du mécanisme d'action par une analyse transcriptomique. Endocrinologie et métabolisme. Université Montpellier; École doctorale des Sciences et de Technologie (Beyrouth), 2016. Français. NNT : 2016MONT3511 . tel-01618974

HAL Id: tel-01618974

<https://theses.hal.science/tel-01618974>

Submitted on 18 Oct 2017

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

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



Université Libanaise

École Doctorale
Sciences et Technologies

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

THESE EN COTUTELLE

Délivrée par

l'UNIVERSITE DE MONTPELLIER

et par l'UNIVERSITE LIBANAISE

Sciences Chimiques et Biologiques pour la santé (CBS2)

Université de Montpellier

Spécialité : **Biologie santé**

et

L'École Doctorale des Sciences et Technologies

Université Libanaise

Spécialité : **Biologie santé/Cancérologie**

Présentée par **Zahraa Zghaib**

**Etude des effets cytotoxique et antitubuline des
imidazoquinoxalines.**

**Etude du mécanisme d'action par une analyse
transcriptomique.**

Soutenue le 20 septembre 2016

Mme Nathalie Andrieu-Abadie , DR2 INSERM, <i>Rapporteur</i>	Université Toulouse III
Mr Pierre Cuq , PU, <i>Coencadrant de thèse</i>	Université Montpellier
Mme Mona Diab-Assaf , PU, <i>Codirecteur de thèse</i>	Université Libanaise
Mr Kamel Hadj-Kaddour , IE, <i>Examinateur</i>	Université Montpellier
Mr Issam Kassab , PU associé, <i>Coencadrant de thèse</i>	Université Libanaise
Mme Carine Masquéfa , PU, <i>Directeur de thèse</i>	Université Montpellier
Mr Ramez Chahine , PU, <i>Examinateur</i>	Université Libanaise
Mr Mohamad Mroueh , PU associé, <i>Rapporteur</i>	Université Américaine Libanaise

Remerciements

La rédaction de ce manuscrit constitua l'une des étapes les plus longues et douloureuses de mes quatre années de thèse. Cette étape fut sans aucun doute celle qui aura nécessité le plus d'efforts et d'attention de ma part, tant je tenais à remercier comme il se doit les personnes ayant participé, directement ou non, à l'achèvement de ce travail.

Mes premiers remerciements vont à mes directeurs de thèse Mona Diab-Assaf et Carine Masquéfa, qui ont dirigé et encadré mes travaux. Les mots me manquent pour exprimer ma gratitude. L'idée de voler de ses propres ailes est un peu effrayante, mais j'ai l'impression d'avoir grandi, d'avoir acquis une certaine confiance grâce à vous. D'un point de vue relationnel, j'ai trouvé des relations cordiales, une écoute et ce que j'ai aimé par-dessus toute une franchise à toute épreuve. J'ai énormément appris à vos côtés. Merci pour tout.

Je remercie également mes co-encadrants de thèse Pierre Cuq et Issam Kassab. Pierre pour sa gentillesse et surtout de m'avoir permis de réaliser mon travail de paillasse dans les meilleurs conditions possibles. Issam, j'ai beaucoup appris grâce à lui, tant d'un point de vue technique que scientifique. Ses patiences et ses connaissances m'ont constamment permis de progresser. Merci pour tout.

Je remercie Georges qui a été à l'origine de la création de cette collaboration fructueuse avec l'Université de Montpellier. Georges, l'homme au grand cœur mais aussi l'enseignant chercheur rigoureux et méthodique.

Mes plus sincères remerciements vont également à Nathalie Andrieu-Abadie et Mohamad Mroueh qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'à Ramez Chahine et Kamel Hadj Kaddour pour avoir accepté de faire partie de jury.

Ainsi Je remercie Pierre-Antoine Bonnet pour sa gentillesse et son accueil. Je n'oublie pas notre première rencontre au Liban, il est pour moi l'exemple d'un chef d'équipe à l'écoute de tous ses collaborateurs.

J'ai eu la chance de travailler au sein d'une équipe dont la bonne ambiance a largement contribué à mon bien-être et qui a constitué pendant quatre ans une sorte de "deuxième famille" à mes yeux. Je tiens à les remercier tous. Tout d'abord, merci au chef d'équipe Pierre, dont l'humour et les histoires ont constitué une mine d'or à mes yeux. Je remercie tous les membres de cette équipe, en plus de ceux déjà cités : Chantal, Hinda, Cindy, Stéphanie, Florence, Françoise, Laure-Anaïs et Marie-Hélène. Un immense merci à celles qui sont devenues mes amies, Myriam et Audrey et qui ont partagé avec moi tous les moments (dures et faciles). Je n'oublie jamais

l'humour, nos sorties ensemble et nos déjeuners. Je n'oublie pas de remercier Kamel qui m'a soutenu dès mes premiers jours en France et qui m'a guidé et aidé au laboratoire. Je remercie aussi tous les thésards et les stagiaires (passés et présents) qui ont partagé cette aventure: Chaker (qui m'a aidé à m'adapter en France d'une façon directe et indirecte), Adrien, Elige, Verra, Laure, Johanna, Julien et Sébastien.

Merci Michel pour ton implication dans ce travail et ton aide.

Merci à l'équipe d'Ali Bazerbachi et Hiba Al Hajj à l'Université Américaine de Beyrouth de m'avoir accueillie pendant mon séjour au Liban, un merci appuyé à Nadim pour avoir facilité mon intégration dans cette équipe performante.

Merci Christian Larroque et Nicole Bec pour m'avoir laissée réaliser quelques manips chez vous et pour vos aides et vos collaborations.

Je remercie infiniment les amis à qui je n'ai jamais su dire toute l'affection que j'ai pour eux, qui furent présents à mes côtés lorsque j'en avais besoin. Merci donc à Samia, Racha, Iman, Mohamad, Amel, Selma, Maya, Ramy, Mariana, Mengli, Nisrine, Hani, Léa, Sana, Ali et Khalil.

Je tiens à remercier le Centre Islamique d'Orientation et d'Education Supérieur (CIOES) à ses financements pour mes séjours en France pendant toutes mes années de thèse et un grand merci à son président Ali Zalzali.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille. A mon père Ahmad et son soutien inconditionnel. A ma maman Siham qui m'a fait comprendre que la vie n'est pas faite uniquement de problèmes qu'on peut résoudre avec des formules mathématiques et des algorithmes. Leur intelligence, leur confiance, leur tendresse et leur amour me portent et me guident tous les jours. Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. A mon frère Jad et ma sœur Suzan que j'aime de tout mon cœur. A mes tantes, mes oncles, mes cousins et cousines, en particuliers un grand merci à mon cousin Moutaz et sa femme Zeinab. Merci pour toute cette famille qui est le point d'ancrage de ma vie. Ma famille, une pluie de "merci" s'échappe de mon cœur : mettez-vous à l'abri ! Merci, merci, merci, merci...

Liste des abréviations

AACR	American Association for Cancer Research
ABCA1	ATP-binding cassette transporter
ADCC	Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity
ADNc	ADN complémentaire
AIF	Apoptosis Inducing Factor
AJCC	American Joint Committee on Cancer
Akt	Sérine-Thréonine kinase
alloSCT	Transplantation allogénique de Cellules Souches
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AMPc	Adénosine Mono Phosphate cyclique
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament
Anti-CTLA-4	anticorps Anticytotoxique de Cellule à Lymphocyte-T4
Anti-PD1	anticorps Anti-Programmed Death-1
APAF1	Apoptotic Protease Activating Factor 1
ARNc	Acide Ribonucléique complémentaire
ARNm	ARN messenger
ATLL	Lymphome ou Leucémie T de l'Adulte
ATL	Adult T-cell leukemia
AUB	American University of Beirut
BAD	Bcl-2-associated death promoter
BAK	bcl-2-like protein 4
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BCL-XL	B-cell lymphoma-extra large
BCR-ABL	Breakpoint Cluster Region fusion with ABL1 gene
BELD	Bléomycine/vindesine/Lomustine/Dacarbazine
BER	Base Excision Repair
BET	Bromure d'ETHidium
Bid	BH3-interacting death agonist
BIM	BH3-only protein BCL2L11
BLV	Bovine leukemia virus
BMS	Bristol-Myers Squibb
BOLD	Bléomycine/vincristine/Lomustine/Dacarbazine
BP	Biological Processes
BRAF	BV-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BSA	Bovin Serum Albumin
β-caténine	beta caténine
CASPASE	Cysteine Aspartate-Specific ProteASEs
CBDT	Dacarbazine/Carmustine/cisplatine/Tamoxifène
CA	Affymetrix Santa Clara
CCLE	Cancer Cell Line Encyclopedia
CCR4	Recepteurs des Chimioquinas CC4
CC	Cellular Components
CDC42EP3	Cdc42 effector protein 3
CDK	Cyclines/kinases dépendantes des cyclines
CDKI	Cycline dependent kinase inhibitor
CD4	Cluster of Differentiation 4
c-fos	Fos family proto-oncogen C
Ced10/RAC1	Caenorhabditis elegans intestinal epithelium/ Ras-related C3 botulinum toxin substrate
CHOP	(C/EBP homologous protein)/GADD153 (Growth Arrest Damage DNA

	induced gene <i>p53</i>)
CI90	Concentration Inhibitrice de 90%
CI50	Concentration Inhibitrice de 50%
C-KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
CMF	Cytométrie en Flux
CML	Leucémie Myéloïde Chronique
CR	Complete Remission
CRLC	Centre Régionale de Lutte contre le Cancer
CVAD	Cyclophosphamide/Vincristine/doxorubicine/Dexaméthasone
CVP	Cyclophosphamide/Vincristine/Prednisone
cyt-c	Cytochrome c
Cy3	Cyanine vert
Cy5	Cyanine rouge
DL50	Dose Léthale 50
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DRL	Death Receptor Ligand
DTIC	Dimethyl-Triazeno-Imidazole-Carboxamide
EAPB	Equipe d'Accueil PharmacoChimie
EDTA	Acide Ethylene Diamine Tetra-Acétique disodique
egr-1,	Early growth response protein 1
Endo G	Endonucléase G
ER	Récepteurs aux Oestrogènes
ERCC1	DNA excision repair protein ERCC-1
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FADD	Fas-Associated Death Domain
FAK	Focal Adhesion kinase
FasL/CD95L	Fibroblast-associated Ligand
FC	Fold-Change
FDA	Food and Drug Administration
FDR	False Discovery Rate
FGF	Fibroblast Growth Factor
FND	Fludarabine/mitoxantrone/Dexaméthasone
5-FU	5Fluoro-Uracile
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GIST	Tumeurs Stromale Gastro-Intestinales
GI50	Growth Inhibition of 50 % cells
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GO	Gene Ontology
gp170	glycoprotéine 170
GSH	Greffe de Cellules Souches hématopoïétiques
GTP	Guanosine TriPhosphate
HAS	Haute Autorité de Santé
HBZ	HTLV-1 basic zipper factor
HDAC	Histone deacetylase
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HGU133+2	Human Genome U133 plus 2
HSP90	Heat shock protein 90
HTLV-1	Human T cell leukemia/lymphoma virus type 1
H	Heure
IRBM	Institut de Recherche en Biothérapie de Montpellier
ID	Identifiants des protéines
IFN	Interférons
IRF-4	Interferon regulatory factor 4

INCa	l'Institut National du Cancer
IPA	logiciel Ingenuity Pathway Analysis
IVT	transcription in vitro
IV	Intra veineuse
IBMM	Institut de Biomolecule Max Moussron
i.p.	Intrapéritonéale
IL	Interleukine
I-κB	NF-kappa B Inhibitor
JAK2	Janus kinase 2
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LDH	lactate-déshydrogénases
LEF1	Lymphoïde Enhancer Factor 1
LIC	Cellules Leucemiques Initiatrices
LNH	lymphome non hodgkinien
M	Mitose
MAC	conditionnement myéloablatif
MACOP-B	Methotrexate/Doxorubicine/cyclophosphamide/vincristine
MAPK	Mitogen-Activated Protein kinase
MAS5	Microarray Suite version 5.0
MCL-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1
MDM2	Murine Double Minute 2
MDR	Multi-Drug Resistance (multirésistance)
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
MF	molecular functions
MGMT	O(6)-methylguanine-DNA methyltransférase
MGSA	model-based gene set analysis,
MINDACT	Microarray for Node Negative Disease May Avoid Chemotherapy /prednisone/bléomycine
MITF	Microphthalmia-Associated Transcription Factor
MM	Mélanome Malin
MMP2	Matrix MetalloProtein 2
MMR	DNA-mismatch repair (système de réparation des mésappariements)
Mn	Minute
MPP	Marginal Position Probability
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
NCB1	Nano Capsules Blanche série 1
NC6	Nano Capsules d'EAPB0503 série 6
NF-κB	Nuclear Factor-Kappa B
NK	Natural killer cell
NER	Nucleotide Excision Repair
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
NT	Neurotransmitters
PARP	Poly (ADP-ribose) polymérase
Pb	Paire de base
PCDH7	Protocadherin-7
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
P-gp	Phospho-glycoprotein
PI	Propidium Iodure
PI-3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PM/MM	perfect match/mismatch
P53	Tumor protein
PR	Partiel Remission
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
RAF	serine/threonine-selective protein kinases

RDAM	Rank Difference Analysis of Microarrays
REVIGO	REduce and VISualise GO terms
RGD	acides aminés arginine-glycine-aspartate
RIC	conditionnement d'intensité réduite
RMA	Robust Multi-array Average
Smac/Diablo	Second Mitochondrial Activator of Caspases or Direct IAP
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute medium
RSA	Relation Structure- Activité
RT	Reverse Transcriptase
SCID	Souries Immunodéficience Combiné Sévère
SEER	Surveillance, Epidemiology and Result Program
SOM	Self Organizing Map
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
STLV	Simian T-cell Leukemia Virus
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
SVF	Serum de veau foetal
TBE	0,5X (Tris-Borate-EDTA
TCF4	Transcription Factor 4
TEM	Transition Epithélio Mésoenchymateuse
TGF β	Transforming Growth Factor beta
TLR-7	Toll Like Receptor 7
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNF-R	Tumor Necrosis Factor-Receptor
TNM	Tumor, Nodes, Metastasis
Topo II	Topoisomérase II
TRADD	TNF-R-Receptor Associated Death Domain
TRAF2	TNF-Receptor-Associated Factor 2
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TSP/HAM	Tropical Spastic Paraparesis/ HTLV-I-Associated Myelopathy
TUBB	Tubulin, Beta Class I
UICC	Union internationale contre le cancer
UM1	Université de Montpellier 1
USA	Unitate state of America
UV	ultraviolets
V	Valine
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
WB	Western Blot
$\alpha 5$-$\beta 3$	alpha 5- beta 3

Sommaire

I. Etude bibliographique	12
I.1 Chapitre 1 : le mélanome.....	12
I.1.1 Généralités.....	12
I.1.1.1 Définition	12
I.1.1.2 Epidémiologie	12
I.1.1.3 Facteurs de risques.....	13
I.1.1.4 Prévention	14
I.1.2 Mécanismes physiopathologiques du mélanome.....	14
I.1.2.1 Mécanismes physiopathologiques au niveau cellulaire.....	14
I.1.2.2 Mécanismes physiopathologiques au niveau moléculaire	16
I.1.3 Diagnostic et classifications du mélanome	22
I.1.3.1 Diagnostic et classification cliniques	22
I.1.3.2 Diagnostic et classification histologiques.....	24
I.1.3.3 Diagnostic et classification moléculaires.....	28
I.1.4 Traitements du mélanome	30
I.1.4.1 La chirurgie	31
I.1.4.2 La radiothérapie.....	31
I.1.4.3 L'immunothérapie	32
I.1.4.4 Les thérapies ciblées.....	33
I.1.4.5 La chimiothérapie classique	36
I.1.4.6 Conclusion et perspectives thérapeutiques	38
I.2 Chapitre 2 : lymphome T de l'adulte	39
I.2.1 Généralités.....	39
I.2.1.1 La leucémie/ lymphome T de l'adulte (ATL).....	39
I.2.1.2 Epidémiologie du lymphome T de l'adulte.....	40
I.2.2 Mécanismes physiopathologiques impliqués dans de lymphome T de l'adulte	41
I.2.2.1 Le virus HTLV-1	41
I.2.2.2 Modes de transmission du virus HTLV-I	44

I.2.3	Diagnostic clinique et stadification	45
I.2.3.1	Diagnostic clinique.....	45
I.2.3.2	Stadification du lymphome non Hodgkinien	45
I.2.4	Traitements	46
I.2.4.1	Les chimiothérapies conventionnels	46
I.2.4.2	Thérapie biologique.....	47
I.3	Chapitre 3: la problématique de résistance du mélanome et du lymphome ATL aux chimiothérapies classiques.....	49
I.3.1	Généralités sur les mécanismes de résistance.....	49
I.3.2	Chimiorésistances du mélanome : Mécanismes moléculaires et cellulaires	49
I.3.2.1	L'altération de la sensibilité à l'apoptose	50
I.3.2.2	La surexpression de protéines membranaires	51
I.3.2.3	La dérégulation des voies de réparation de l'ADN.....	52
I.3.2.4	La modification de cible.....	52
I.3.2.5	Le contournement de la cible.....	53
I.3.3	Chimiorésistance de lymphome T	56
I.4	Chapitre 4 : les nouvelles stratégies thérapeutiques	57
I.4.1	Le mélanome malin	57
I.4.1.1	Les thérapies ciblées.....	57
I.4.1.2	Les immunothérapies	63
I.4.2	Le lymphome T de l'adulte	64
I.4.2.1	Transplantation allogénique de cellules souches.....	64
I.4.2.2	Interféron alpha et (Zidovudine) AZT	65
I.4.2.3	Les inhibiteurs des histones deacétylases (vorinostat, romidepsine)	65
I.4.2.4	Le trioxyde d'arsenic (AsO ₃).....	66
I.4.2.5	Anticorps Monoclonal Spécifique.....	67
I.4.2.6	Anti-CC Chemokine Receptor 4 (CCR4)	67
I.4.2.7	Agents efficaces sur ATL hors l'infection par HTLV-1.....	67
I.4.3	Les Imidazoquinoxalines : une nouvelle classe de composés à activité anticancéreuse	69
I.4.3.1	Généralités.....	69

I.4.3.2	Activités antitumorales in vitro et in vivo.....	71
I.4.3.3	Pharmacocinétique et toxicité	73
I.4.3.4	Mécanismes d'action théoriques	73
I.5	Chapitre 5 : puces à ADN et analyse du transcriptome.....	77
I.5.1	Les technologies haut débit dans l'étude des cellules tumorales.....	77
I.5.1.1	Introduction	77
I.5.1.2	Principe général	78
I.5.1.3	Les différents types de puce à ADN.....	80
I.5.1.4	Préparation des échantillons, amplification, marquage et hybridation des cibles (228,229).....	84
I.5.1.5	Analyse bio-informatique et biostatistique.....	86
I.5.2	Conclusion	91
II.	Objectifs de la thèse	93
III.	Matériels et méthodes.....	95
III.1	Composés chimiques, anticancéreux de référence et nanocapsules	95
III.2	Lignées cellulaires utilisées	95
III.2.1	Les Lignées cellulaires adhérents.....	95
III.2.1.1	La lignée de mélanome humain A375	96
III.2.1.2	La lignée de carcinome de colon LS174T	96
III.2.1.3	La lignée de cancer de sein MCF7	97
III.2.2	La lignée non adhérent (en suspension) de lymphome T, HUT102.....	97
III.2.3	Entretien des cellules.....	97
III.3	Tests in vitro	98
III.3.1	Test de viabilité	98
III.3.1.1	Test au rouge neutre	98
III.3.1.2	Test au MTT	99
III.3.2	Test de polymérisation de tubuline	99
III.4	Test in vivo.....	99
III.4.1	Les souris SCID	99
III.5	Extraction d'ADN	101
III.5.1	Recherche de mutations somatiques V600 sur le gène BRAF par pyroséquençage	101

III.6	Les biopuces Affymetrix	102
III.6.1	Choix du modèle cellulaire.....	102
III.6.2	Conception de l'étude transcriptomique : préparation des échantillons 103	
III.6.3	Extraction de l'ARN total.....	103
III.6.3.1	Méthode par RNeasy® Mini Kit.....	103
III.6.3.2	Electrophorèse sur gel d'agarose	103
III.6.4	Hybridation des biopuces	104
III.6.5	Analyse bioinformatique des données des puces	104
III.6.5.1	Analyse statistique des données des biopuces	105
III.6.5.2	Comparaison de profils d'expression	105
III.6.5.3	Sélection des probe sets.....	108
III.6.5.4	Enrichissement fonctionnel.....	108
III.7	Préparation de lysats cellulaires, extraction des protéines et ses analyses 112	
III.7.1	Conception de l'étude pathscan : préparation des extraits protéiques 112	
III.7.2	Dosage des protéines par la méthode de BSA.....	113
III.7.3	Analyse des protéines d'intérêt.....	114
III.7.3.1	Pathscan Séparation et transfert des protéines.....	114
III.7.3.2	Analyse par Western Blot (WB).....	119
IV.	D. Les Résultats	121
IV.1	Partie 1- Criblage et tubuline	121
IV.1.1	Introduction	121
IV.1.2	Criblage in vitro des Imidazoquinoxalines : détermination des CI ₅₀ sur la lignée de référence (A375) puis sur d'autres types de lignées cancéreuses.	121
IV.1.2.1	Caractérisation de la lignée cellulaire choisie	121
IV.1.2.2	Cytotoxicité des composés EAPB synthétisés	123
IV.1.2.3	Etude de la relation structure/activité	125
IV.1.2.4	Cytotoxicité d'EAPB0503 sur différentes lignées cancéreuses	127
IV.1.3	Etude de l'activité d'EAPB0503 et ses dérivés sur la polymérisation de la tubuline purifiée	128

IV.1.4	Etude de l'interaction Imiqualine-Tubuline par modélisation moléculaire	132
IV.1.5	Conclusion.....	132
IV.2	Partie 2 : Analyse transcriptomique.....	133
IV.2.1	Introduction	133
IV.2.2	Etude N°1: originalité de mécanisme d'action d'EAPB0503?	134
IV.2.2.1	Design de l'étude	134
IV.2.2.2	Résultats	135
IV.2.2.3	Conclusion	138
IV.2.3	Etude N°2 : mécanismes d'action d'EAPB0503 ?	138
IV.2.3.1	Design de l'étude	138
IV.2.3.2	Résultats	139
IV.2.3.3	Conclusion	159
IV.3	Partie 3 : validation biologique du mécanisme d'action.....	160
IV.3.1	Introduction	160
IV.3.2	Design des études	160
IV.3.3	Résultats.....	160
IV.3.3.1	Détection de niveau d'activation par pathscan.....	160
IV.3.3.2	Détection de niveau d'expression et d'activation avec le Western Blot	164
IV.4	Partie 4 : formulation galénique	166
IV.4.1	Introduction	166
IV.4.2	Formulation galénique : description.....	166
IV.4.3	Activité in vitro.....	167
IV.4.4	Activité in vivo.....	169
IV.4.5	Conclusion.....	170
V.	Conclusions et discussions.....	172
VI.	Perspectives	174
VII.	Références	175

Liste des figures

Figure 1 :Les différents modèles de progression du mélanome(11,12,14).....	15
Figure 2: Les voies de signalisation impliquées dans le développement du mélanome. D'après Palmieri et al. 2009 (19).....	17
Figure 3 : voies de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK et PI3K/AKT(24).....	18
Figure 4 : Evènements biologiques et altérations moléculaires intervenant au cours de la progression du mélanome. D'après Miller et al. 2006(33)	21
Figure 5 : La règle ABCDE. Adapté de Whited et al 1998 (41).....	23
Figure 6 : Les différents types de mélanome. Adapté de Hoek et al. 2008 (11)	24
Figure 7 : Stadification du mélanome : premier stades(45).	27
Figure 8 : fréquence des mutations de BRAF, NRAS et c-KIT en fonction du type de mélanome. Adapté de Curtin et al. 2005 (50).....	28
Figure 9: Représentation schématique des voies MEK/ERK et PI3K/AKT.	34
Figure 10: structure chimique de la dacarbazine	36
Figure 11 : structure chimique du témozolomide	36
Figure 12 : structure chimique de la fotemustine	37
Figure 13: Régulation du cycle viral et de l'expression de gènes cellulaires par Tax. Cette figure a pour origine(95).	42
Figure 14 : Histoire naturelle du développement d'une leucémie T de l'adulte (ATL) associé à l'HTLV-1.....	44
Figure 15 : Les voies apoptotiques qui sont dérégulées dans le mélanome et induisent une chimiorésistance.La finalité de l'action des différents agents anticancéreux est la mort des cellules tumorales par apoptose. Les voies de signalisation contrôlant l'apoptose sont donc largement dérégulées dans le mélanome comme dans d'autres types tumoraux. Le schéma décrit les mécanismes moléculaires de l'apoptose. Les protéines colorées en vert sont des protéines pro-apoptotiques. Les protéines colorées en bleu sont des protéines anti-apoptotiques. Les protéines entourée et écrite en rouge sont dérégulées dans le mélanome.....	51
Figure 16 : Homme de 38 ans atteint de mélanome avec dépôts métastatiques sous- cutanés.(A) avant l'initiation du traitement au vemurafenib, (B) après 15 semaines de traitement et (C), après rechute, après 23 semaines de traitement. D'après Wagle et al(144).....	55
Figure 17: Les voies de signalisation activées dans le mélanome. D'après Algazi et al. 2010(154).....	58
Figure 18: les trois séries chimiques développées.....	69
Figure 19 : Recherche des résumés des publications concernant les imidazo[1,2- a]quinoxalines dans les 10 dernières années d'après pubmed(192–194)	70
Figure 20 : structure chimique de l'imiquimod, de la série imidazo[1,2-a]quinoxaline et des deux molécules leader EAPB0503 et EAPB0203.....	72
Figure 21: Effet des traitements par EAPB0203 et fotémustine sur la croissance tumorale.	72

Figure 22: Profil d'inhibition sur un panel de 196 kinases pour EAPB0203 et EAPB0503 (Screening CEREP).....	74
Figure 23 :EAPB0503 induit l'apoptose sur les lignées cellulaires CML.....	75
Figure 24 : EAPB0503 inhibe fortement la polymérisation des tubulines purifiées à des concentrations supérieures ou égales à 5 µM.	76
Figure 25: Immunofluorescence sur les cellules A375 à l'aide des anticorps anti-tubuline.	76
Figure 26: Exemple d'une puce Affymetrix R.....	78
Figure 27 : Schématisation de la technique d'analyse du transcriptome par la technologie des puces à ADN (224).	79
Figure 28: les trois phases de la technique des puces à ADN.....	80
Figure 29 : Principes des biopuces « double couleur » et « simple couleur » (Affymetrix)(227).....	81
Figure 30 : Biopuce Affymetrix : image après scan.....	83
Figure 31: comparaison des protocoles d'utilisation des puces à ADN avec simple (A) ou double (B) marquage(228).	84
Figure 32: Principes de représentation des données de puces à ADN.	87
Figure 33: Microphotographie de la lignée A375.....	96
Figure 34 : Microphotographie de la lignée LS174T.....	96
Figure 35 : Microphotographie de la lignée MCF7.....	97
Figure 36 : Microphotographie de la lignée HUT102.....	97
Figure 37 : les souris SCID récepteurs.....	99
Figure 38 : Design expérimental : des souris SCID injectée par des cellules ATL au Jour 1 (J1) puis les traitements débutent dès le jour 6 jusqu'au jour 31 (traitements par injection intrapéritonéale 5 jours/semaine).....	100
Figure 39 : Intersection entre les signatures de gènes identifiés par des études transcriptomiques sur les lignées de mélanome.	102
Figure 40 : Conception de l'étude transcriptomique : Les étapes nécessaires pour la préparation des échantillons à hybrider.	103
Figure 41 : visualisation sous ultra-violet des ARN totaux.....	104
Figure 42 : Matrice de distances et dendrogramme associé pour les puces du groupe 1.	107
Figure 43 : Matrice de distances des puces du groupe 2.....	107
Figure 44 : « Report page » de PathwayLinker(254).....	110
Figure 45 : exemple de rapport après utilisation de pathwaylinker.	111
Figure 46 : Les étapes nécessaires pour la préparation des extraits protéiques à partir de la lignée cellulaire A375.....	112
Figure 47 : les différents réactifs de kitDC™ (détergent compatible) protein assay (http://www.bio-rad.com/).....	113
Figure 48 : Target map de PathScan® Intracellular Signaling Array Kit (Lecture Chemiluminescent) #7323.....	115
Figure 49 : les Différents étapes nécessaires pour monter la plaque multi-puits.....	116
Figure 50 : Détermination des voies métaboliques activées ou inhibées à l'aide du kit PathScan® Intracellular Signaling Array Kit. L'intensité des signaux chimioluminescent est déterminée à l'aide du logiciel ImageJ (NIH, https://imagej.nih.gov/ij/).	119
Figure 51 : Statuts de la mutation de BRAF sur 3 lots des lignées A375 par rapport aux contrôles.....	122

Figure 52: Relation entre la structure et l'activité au niveau du cycle imidazole de la série imidazo[1,2-a]quinoxaline	125
Figure 53: Criblage d'inhibition de la prolifération cellulaire sur 60 lignées cellulaires tumorales traitées par EAPB0503 ou vinorelbine, réalisé par le National Cancer Institut (NCI).....	131
Figure 54: Comparaison des profils d'expression génique des composés comparateurs dans l'étude 1 sur la lignée cellulaire A375, permet d'isoler trois groupes (I, II et III).	136
Figure 55: Distribution des probe sets (en ordonnée) des têtes de liste de taille 250 (A) et 2000 (B) dans les différentes comparaisons entre les cellules traitées (en abscisse) et les cellules non traitées.....	137
Figure 56: Comparaison des profils d'expression génique de l'hybridation 2 sur la lignée cellulaire A375.....	139
Figure 57: Représentation schématique des différentes étapes d'enrichissement fonctionnel réalisées.....	140
Figure 58: Histogramme représentant le nombre des termes GO en fonction de nombre des listes.	142
Figure 59: Exemple de résultat d'analyse MGSA : comparaison EAPB0503 versus contrôle, base de données processus biologique (BP) de GO, pour les gènes surexprimés.	143
Figure 60 : Exemple de résultat d'analyse MGSA puis RESN : comparaison EAPB0503 versus contrôle, base de données processus biologique (BP) de GO, pour les gènes surexprimés.	147
Figure 61: Tree map représentative des termes GO : comparaison EAPB0503-u(Colchicine, Maytansine, Vinorelbine) base de données processus biologique (BP) de GO, pour les gènes surexprimés. Chaque couleur représente les termes qui se regroupent.	148
Figure 62: Représentation schématique des voies de signalisation cellulaire potentiellement à l'origine du (des) mécanisme(s) d'action de l'EAPB0503.....	153
Figure 63: Réseau obtenu après analyse par GENEMANIA des gènes surexprimés dans la comparaison EAPB0503-u(COLCHCIINE, MAYTANSINE, VINORELBINE).....	154
Figure 64: Réseau obtenu après analyse par GENEMANIA des gènes sous-exprimés dans la comparaison EAPB0503-u(COLCHCIINE, MAYTANSINE, VINORELBINE).....	154
Figure 65: Réseau obtenu après analyse par GENEMANIA des gènes surexprimés dans la comparaison EAPB0503:6h vs CONT:6H.....	155
Figure 66: Réseau obtenu après analyse par GENEMANIA des gènes sous-exprimés dans la comparaison EAPB0503:6h vs CONT:6H.....	155
Figure 67 : Réseau obtenu après analyse par GENEMANIA des gènes surexprimés dans la comparaison n(EAPB0503,COLCH):6H.....	156
Figure 68: Réseau obtenu après analyse par GENEMANIA des gènes sous-exprimés dans la comparaison n(EAPB0503,COLCH):6H.....	156
Figure 69: 12 premières voies de signalisation obtenues après analyse par PATHWAY LINKER des gènes dont l'expression est altérée dans la comparaison EAPB0503-u(COLCHCIINE, MAYTANSINE, VINORELBINE).....	157
Figure 70: 12 premières voies de signalisation obtenues après analyse par PATHWAY LINKER des gènes dont l'expression est altérée dans la comparaison EAPB0503 Versus Contrôle	158

Figure 71: 12 premières voies de signalisation obtenues après analyse par PATHWAY LINKER des gènes dont l'expression est altérée dans la comparaison (EAPB0503, Colchicine).....	158
Figure 72: (A) Carte cible du Kit Array signalisation intracellulaire PathScan®. (B) les protéines présentes dans ce kit et qui rentre dans la signalisation intracellulaire. ..	161
Figure 73: Histogramme indiquant le statut de phosphorylation de 9 protéines de PathScan après traitement avec EAPB0503.	161
Figure 74: Histogramme indiquant le statut de phosphorylation de 4 protéines de PathScan après traitement avec EAPB0503. Le schéma de la voie de PI3K est inspiré de Keiran S.M. Smalley et al (138) et D. Grahame Hardie(267).....	162
Figure 75: Histogramme indiquant le statu de phosphorylation de 3 protéines de PathScan après traitement avec EAPB0503 avec la voie de RAS inspire de Lu et Xu (268).....	163
Figure 76 : Détection par western blot des extraits de protéines totales purifiés à partir d'A375. Détection de l'actine comme contrôle positive et la protéine ERK1/2 phosphorylé ou non phosphorylé. Ce travail a été répété trois fois (Echantillon 1, 2, et 3). Le traitement a été faite durant 1 heure avec une concentration 1µM de EAPB0503.....	164
Figure 77: Vue générale de la voie de transduction de signal cellulaire qui peut être déclenchée par EAPB0503.....	165
Figure 78 : Représentation de la composition des nanocapsules lipidiques(269)	166
Figure 79: Exemples de nanocapsules par microscopie électronique en transmission, Hitachi S2600N à pression variable, agrandissement : x 15 (à droite) et x 300 000 (à gauche).	167
Figure 80: Les courbes d'activités in vitro d'EAPB0503, de NC6, et NCB1 sur la lignée d'humain de lymphome T HUT102.	168
Figure 81 : Etudes in vivo sur modèle murin ATL. Courbes de survie	170

Liste des tableaux

Tableau 1 : Type et fréquence des altérations génétiques rencontrées dans le mélanome. Tableau adapté de Gray-Schopfer et al. 2007 (20).....	17
Tableau 2 : Classification TNM, AJCC 9 ^{ème} édition (43)	26
Tableau 3: Stadification du mélanome, AJCC, version actualisée en 2009 (43).....	27
Tableau 4 : Classification moléculaire du MM. D'après Vidwans SJ et.al. 2011 (54).....	30
Tableau 5 : Différents types d'association en chimiothérapie pour le traitement du lymphome(108–111).....	47
Tableau 6 : Molécules sélectionnées pour la thérapie ciblée anti-mélanome. D'après Gray-Schopfer et al. 2007 (20)	59
Tableau 7 : Exemples des inhibiteurs de la voie BRAF/MEK/ERK.....	60
Tableau 8 : Autres thérapies ciblées	61
Tableau 9 : Anticorps anti-CTLA-4, anti-PD1 et ses associations.	63
Tableau 10 : Autres immunomodulateurs.	64
Tableau 11 : Les différents brevets acquis national et international pour l'imidazo[1,2-a]quinoxaline.	70
Tableau 12 : Concentrations inhibitrices 50% (CI ₅₀) en µM des molécules leaders et des molécules de référence sur différentes lignées cellulaires issues de plusieurs types de cancer.	71
Tableau 13 : Essai in vivo de NC6 et NCB1 sur des souris SCID malades. Trois groupes de souris SCID malades ont été utilisée et chaque groupe représente 5 souris. J1 : injection intrapéritonéale de 10 ⁶ cellules de la rate provenant des souris Tax transgéniques.....	100
Tableau 14 : Conditions biologiques utilisées avec leur rang. Contrôle : non traité.....	106
Tableau 15: Exemple de comparaisons effectuées entre les conditions biologiques. Le nombre de probe sets sélectionnés, selon le FDR et la variation SUREXPRIME ou SOUS EXPRIME, sont indiqués dans les colonnes FDR1% et FDR10%. La colonne TOTAL indique l'estimation de la variation totale.	106
Tableau 16 : Dérivés imidazo[1,2-a]quinoxalines, leur formule chimique et leur CI ₅₀ : concentration inhibitrice 50 ou concentration de la molécule qui inhibe 50% de la croissance cellulaire de cellules traitées par rapport la croissance cellulaire de cellules non traitées. Les valeurs de CI ₅₀ sont calculées à l'aide du logiciel PRISM (GraphPad) à partir de trois expériences indépendantes.....	124
Tableau 17 : les CI ₅₀ de EAPB0503, colchicine, irinotecan, doxorubicine, arsenic-interféron, fotémustine et vémurafénib sur les lignées cancéreuses humaines A375 (mélanome), MCF7 (cancer du sein), LST174T (cancer du côlon), HUT102 (lymphome T).	127
Tableau 18 : Dérivés imidazo[1,2-a]quinoxalines, CI ₅₀ : concentration de composé nécessaire pour inhiber la croissance cellulaire de A375 de 50% ;.....	128
Tableau 19 : Design de l'étude N°1.	134
Tableau 20: Noms, classes et cibles des composés utilisés dans l'étude 1.....	134

Tableau 21: Design de l'étude N°2 : utilisation de l'hybridation 1 de l'étude N°1 et de l'hybridation 2. Toutes les conditions de l'hybridation 2 ont été faites en dupliquat par rapport à l'hybridation 1.....	138
Tableau 22: Différentes listes réalisées afin de sélectionner les probe sets pour l'enrichissement fonctionnel. Les listes en bleu ont été sélectionnées pour les analyses MGSA.....	141
Tableau 23: Représentation du nombre de termes GO et de ses gènes obtenus par MGSA pour les trois listes choisies EAPB0503-u (Colchicine, Maytansine, Vinorelbine), EAPB0503 Versus Contrôle et N (EAPB0503, Colchicine).....	142
Tableau 24: nombre de termes GO et gènes associés après sélection des termes inclus dans au moins 3 listes.....	144
Tableau 25: termes GO « actifs » pour la comparaison EAPB0503-u(Colchicine, Maytansine, Vinorelbine). BP : base de donnée « processus biologique » de GO, MF : base de donnée « fonction moléculaire », CC : base de donnée «composant cellulaire ».....	145
Tableau 26: termes GO « actifs » pour la comparaison EAPB0503 Versus Contrôle. BP : base de donnée « processus biologique » de GO, MF : base de donnée « fonction moléculaire », CC : base de donnée «composant cellulaire ».....	146
Tableau 27: termes GO « actifs » pour la comparaison n(EAPB0503, Colchicine). BP : base de donnée « processus biologique » de GO, MF : base de donnée «fonction moléculaire », CC : base de donnée «composant cellulaire ».....	146
Tableau 28: termes GO sélectionnés pour la comparaison EAPB0503-u(Colchicine, Maytansine, Vinorelbine) après analyse MGSA, simplification, puis regroupement par REVIGO. BP : base de donnée « processus biologique » de GO, MF : base de donnée « fonction moléculaire », CC : base de donnée « composant cellulaire », population : nombre de gènes définissant le terme GO, Nombre de gènes : nombre de gènes du terme GO altérés dans la comparaison.....	149
Tableau 29: termes GO sélectionnés pour la comparaison EAPB0503 versus CONTROLE après analyse MGSA, simplification, puis regroupement par REVIGO. BP : base de donnée « processus biologique » de GO, MF : base de donnée « fonction moléculaire », CC : base de donnée « composant cellulaire », population : nombre de gènes définissant le terme GO, Nombre de gènes : nombre de gènes du terme GO altérés dans la comparaison.....	150
Tableau 30: termes GO sélectionnés pour la comparaison n(EAPB0503, Colchicine) après analyse MGSA, simplification, puis regroupement par REVIGO. BP : base de donnée « processus biologique » de GO, MF : base de donnée « fonction moléculaire », CC : base de donnée « composant cellulaire », population : nombre de gènes définissant le terme GO, Nombre de gènes : nombre de gènes du terme GO altérés dans la comparaison.....	151

I. Etude bibliographique

I.1 Chapitre 1 : le mélanome

I.1.1 Généralités

I.1.1.1 Définition

Le mélanome est une prolifération maligne de mélanocytes, cellules à morphologie dendritiques qui produisent la mélanine(1). Il ne représente qu'une minorité (10%) des cancers de la peau mais c'est un des plus dangereux.

Les mélanocytes se développent à partir de progéniteurs embryonnaires issus de la crête neurale. Ils partagent ainsi avec les neurones des récepteurs, des voies et des molécules de signalisation(2). Les mélanocytes étant localisées non loin du réseau de vaisseaux sanguins qui irriguent le derme, en cas de transformation maligne, ils peuvent facilement passer dans la circulation sanguine et se répandre n'importe où dans l'organisme pour conduire à la formation de métastases.

Les mélanomes peuvent se développer sur n'importe quelle région du corps, la localisation cutanée étant la plus fréquente. Dans les chapitres suivant, nous ne parlerons donc que du mélanome cutané. Le mélanome peut se développer sur une peau saine (*de novo*) ou par dégénérescence d'un nævus préexistant (dans 20 à 30% des cas). Un nævus désigne une prolifération circonscrite bénigne de mélanocytes dans la peau(3). Les éphélides (tâches de rousseur) ne dégènèrent jamais.

I.1.1.2 Epidémiologie

Le MM est un problème de santé publique majeur au niveau mondial (4) : d'une part son incidence est en constante augmentation, d'autre part il touche tous les âges de la vie (excepté l'enfance).

L'exemple des Etats-Unis reflète bien la tendance épidémiologique mondiale (données du Surveillance, Epidemiology, and End Results Program (SEER), du National Cancer Institute (NCI) (5), estimations pour l'année 2014 aux Etats-Unis) :

- Les cancers de la peau sont les cancers les plus fréquemment diagnostiqués.
- Le MM représente 5% des cancers cutanés et 4,6% de la totalité des cancers.
- L'âge médian de diagnostic est d'environ 60 ans.
- Le MM est le cancer le plus fréquent chez les jeunes adultes (25-29 ans) (6).
- L'incidence augmente de façon rapide et continue depuis 1975 (25-31% / 10 ans).

- Le taux de survie à 5 ans dépend du stade du MM (global : 90% ; MM métastatique : 20%).
- Le taux de mortalité est stable (2,7 décès pour 100 000 habitants).

En France, selon les données de l'Institut National du Cancer (INCa), le mélanome de la peau se situait au 11ème rang des cancers les plus fréquents en 2012, tout sexe confondu(7). Les chiffres avancés par l'INCa pour l'année 2012 étaient les suivants :

- Nombre de nouveaux cas estimés de mélanome cutané: 11 176 (5 429 hommes et 5 747 femmes).
- Âge moyen au diagnosti:61 ans chez l'homme et 64 ans chez la femme.
- Nombre de décès par mélanome cutané estimé: 1 672 (954 hommes et 718 femmes).

Le mélanome présente la plus forte augmentation d'incidence parmi tous les cancers à travers le monde. On observe notamment une hausse continue (estimée entre 3 et 7 % par an selon les pays) du nombre de nouveaux cas depuis 40 ans parmi les populations à peau blanche(7). L'incidence du mélanome varie au niveau mondial selon deux facteurs : la génétique des populations (phototype cutané), et la localisation géographique (taux d'ensoleillement).

Ainsi, l'Australie, qui cumule le phototype particulièrement à risque de ses populations et une forte exposition solaire, est le pays où l'incidence du mélanome est la plus forte(8). Au contraire, l'Afrique, l'Amérique latine et à plus forte raison l'Asie ont l'incidence du mélanome la plus faible en raison du phototype peu à risque de leurs populations (Globocan 2012, International Agency for Research on Cancer(9)).

1.1.1.3 Facteurs de risques

Comme tout cancer, le mélanome est une maladie multifactorielle. Les facteurs de risque du mélanome de la peau principaux sont les suivants (8) :

- Les facteurs de risque externes, liés à l'environnement et aux modes de vie :
 - ✓ Les expositions prolongées au soleil avant l'âge de 10 ans : en cas de brûlures solaires (érythème bulleux) reçues dans l'enfance, le risque de survenue ultérieure d'un mélanome double.
 - ✓ L'exposition aux rayonnements ultraviolets (UV) : on estime que deux tiers des mélanomes sont dus à une exposition excessive aux UV.
- Les facteurs de risque internes, c'est-à-dire constitutifs des individus, d'ordre génétique :

- ✓ Les antécédents familiaux de mélanome : environ 20 à 40% des patients atteints de mélanome ont un historique familial avec la maladie.
- ✓ Le phototype cutané : les personnes à phototype clair qui ne bronzent pas ou peu sont les plus menacées.
La présence de nombreux nævus (> 50) supérieurs à 2mm, ou de nævus atypique multiplie le risque d'avoir un mélanome par 4 ou 5.
Les nævus congénitaux ont un risque de transformation maligne.

I.1.1.4 Prévention

Le mélanome en phase métastatique ne peut être traité par simple exérèse chirurgicale et est l'une des tumeurs les plus chimiorésistantes. La prévention est donc primordiale pour en limiter l'incidence. Il existe actuellement un large consensus pour affirmer que l'exposition récréative et intermittente au soleil est le principal facteur de risque connu de mélanome. La prévention du mélanome est donc principalement basée sur les conseils de protection solaire. La priorité à la photoprotection vestimentaire sera donnée chez les enfants. L'utilisation des cabines UV est à proscrire.

Parallèlement, une observation régulière de la peau en s'aidant de la règle ABCDE (cf. chapitre diagnostic) est recommandée. Cette auto-surveillance permet de repérer les lésions précocement, d'accélérer le diagnostic d'éventuelles anomalies malignes et, ainsi, d'optimiser les chances de guérison(10). Elle est particulièrement recommandée chez les patients présentant des antécédents familiaux ou personnels de mélanome.

I.1.2 Mécanismes physiopathologiques du mélanome

Le mélanome a pour origine la transformation maligne des mélanocytes. Il peut apparaître *de novo*, ou, plus rarement, résulter de la transformation maligne d'un nævus. 70 à 80 % des mélanomes surviennent *de novo* (Haute Autorité de Santé (HAS) 2012).

I.1.2.1 Mécanismes physiopathologiques au niveau cellulaire

La transformation d'un mélanocyte en mélanome se fait selon plusieurs modèles (figure 1).

Le modèle de progression linéaire (à gauche) stipule que l'instabilité génétique et l'expansion clonale sont à l'origine du développement du mélanome et que les propriétés proliférantes ou invasives des cellules cancéreuses sont obtenues par

mutations génétiques successives. Le modèle des cellules souches cancéreuses (au centre) prédit que seule une sous-population des cellules de mélanome possède un pouvoir tumorigène. La tumeur devient hétérogène au cours des cycles de prolifération et de différenciation des cellules souches cancéreuses. Les cellules souches cancéreuses peuvent dériver de la transformation de cellules souches de mélanocytes, ou de la dédifférenciation de mélanocytes sains. Le modèle du phénotype réversible (à droite) propose une plasticité des phénotypes cellulaires en fonction des interactions avec le microenvironnement. Les cellules cancéreuses pourraient ainsi acquérir un caractère invasif, prolifératif ou différencié suivant leur environnement(11–14).

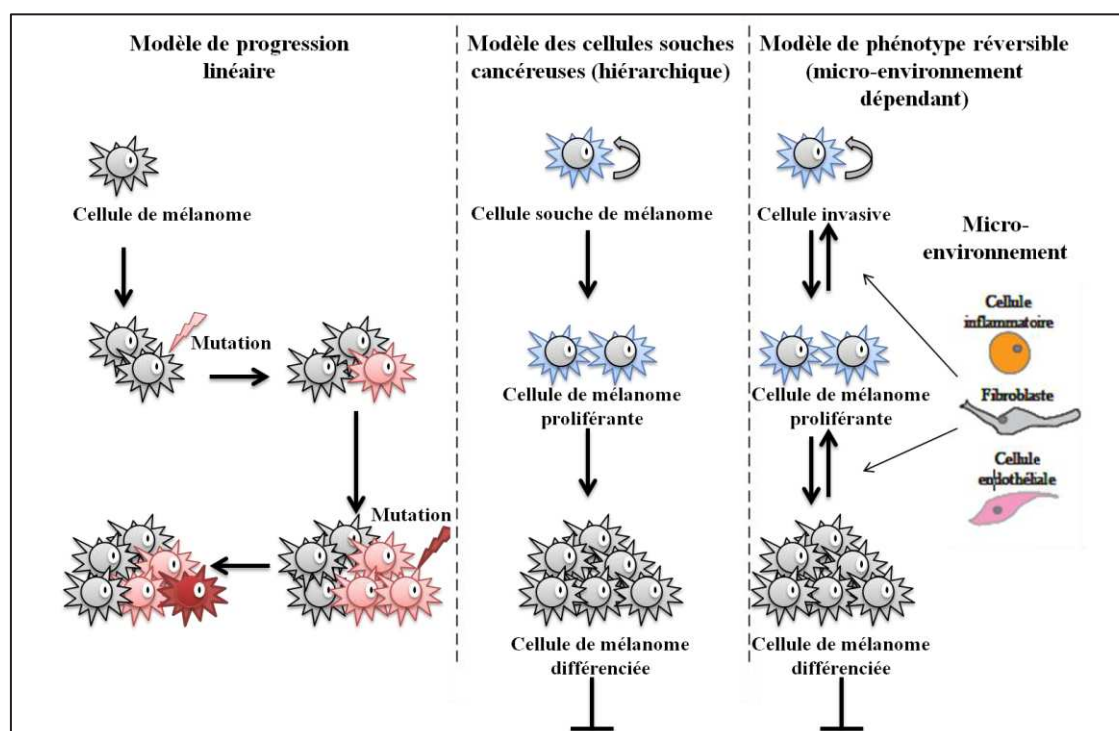


Figure 1 :Les différents modèles de progression du mélanome(11,12,14).

I.1.2.1.1 Le modèle linéaire classique

Ce modèle se base sur l'expansion clonale d'une population ayant acquis des propriétés de prolifération suite à des mutations génétiques (figure 1). Selon ce modèle de progression tumorale linéaire classiquement admis, toutes les cellules sont potentiellement tumorigènes et c'est l'instabilité génétique qui conditionne l'évolution de la maladie (15). La population de mélanocyte, homogène au départ, se diversifie ultérieurement suite à des événements d'ordre génétique pour donner naissance à des sous populations plus invasives.

I.1.2.1.2 Le modèle des cellules souches cancéreuses

Selon ce modèle, seule une faible proportion des cellules est responsable de la tumorigenèse. Ce modèle propose qu'une sous-population possédant des caractéristiques de cellules souches somatiques soit capable de proliférer et de donner des « cellules filles différenciées » formant la masse tumorale. Cette sous-population permettrait de maintenir la croissance tumorale. Elle peut également dériver d'une cellule déjà différenciée ayant acquis des caractéristiques souches par le processus de transformation tumorale en réactivant des voies de signalisation spécifiques (figure 1). En l'absence de consensus sur les caractéristiques attribuées aux cellules souches cancéreuses, une commission de l'ACR (American Association for Cancer Research) a proposé une définition unifiée de ce concept selon laquelle une cellule souche cancéreuse est une cellule possédant des capacités d'auto-renouvellement et étant à l'origine de l'hétérogénéité de la masse tumorale (16).

I.1.2.1.3 Le modèle de l'interconversion

C'est le modèle du phénotype réversible qui propose une plasticité des phénotypes cellulaires en fonction des interactions avec le microenvironnement. Ce dernier modèle suggère que l'hétérogénéité tumorale résulterait de l'expression ou de la réexpression de certains gènes en réponse à des stimuli du microenvironnement. Ainsi, les cellules tumorales seraient capables, en réponse au microenvironnement, de passer d'un état de cellules prolifératives à un état de cellules invasives ou encore différenciées(11,12,14)(figure 1).

Le changement entre les états prolifératifs et invasifs a été associé à la voie de signalisation Wnt qui oriente le développement en mélanocyte ou cellules gliales à travers l'action de la β -caténine. Une surexpression de la β -caténine entraîne une augmentation du nombre de mélanocytes et une diminution des cellules gliales (17). La distribution de la β -caténine apparaît « phénotype spécifique » avec une présence membranaire associée à un état prolifératif et une présence cytosolique associée à un état invasif. De même les cofacteurs LEF1 (pour Lymphoïde Enhancer Factor 1) et TCF4 (Transcription Factor 4) de la β -caténine sont exprimés différemment suivant les phénotypes (expression préférentielle de LEF1 dans les cellules prolifératives plus différenciées et de TCF4 dans les cellules invasive moins différenciées)(18).

1.1.2.2 Mécanismes physiopathologiques au niveau moléculaire

I.1.2.2.1 Le passage d'un nævus à un mélanome primaire

Le passage d'un nævus bénin à un nævus dysplasique est caractérisé par des altérations génétiques ou épigénétiques affectant la régulation du cycle cellulaire, la prolifération et l'apoptose (19–21). Les gènes mutés sont pour la plupart des

1.1.2.2.1.1 La voie des MAPK

La voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) impliquant la cascade d'activation RAS/RAF/MEK/ERK contrôle la prolifération cellulaire (figure 3). Cette voie de signalisation joue un rôle particulièrement important dans le cas du mélanome avec une hyper-activation retrouvée dans 80% des cas. Plusieurs mécanismes peuvent conduire à cette activation tels que la production par voie autocrine de facteurs de croissance, la modification des récepteurs à tyrosine kinase (figure 3), ou des mutations activatrices dans les effecteurs de la voie comme RAS ou RAF. Ainsi, le gène c-KIT est suractivé dans 30% des mélanomes cutanés sur zones exposées au soleil par mutation ou augmentation du nombre de copies du gène. Des mutations activatrices de NRAS ont également été identifiées dans 15 à 30% des mélanomes(20). Les mutations de BRAF sont mutuellement exclusives avec celles de NRAS. La mutation la plus fréquente dans le mélanome concerne la kinase BRAF : remplacement de la valine en position 600 par un acide glutamique (V600E). Elle est présente dans 50 à 70% des cas de mélanomes. Il existe également d'autres mutations plus rares de la valine 600 remplacée dans certains cas par une lysine (V600K) ou une arginine (V600R). La présence de BRAF muté est également détectée dans les nævi bénins et dysplasiques montrant qu'il s'agit d'un évènement précoce dans la progression du mélanome(22,23).

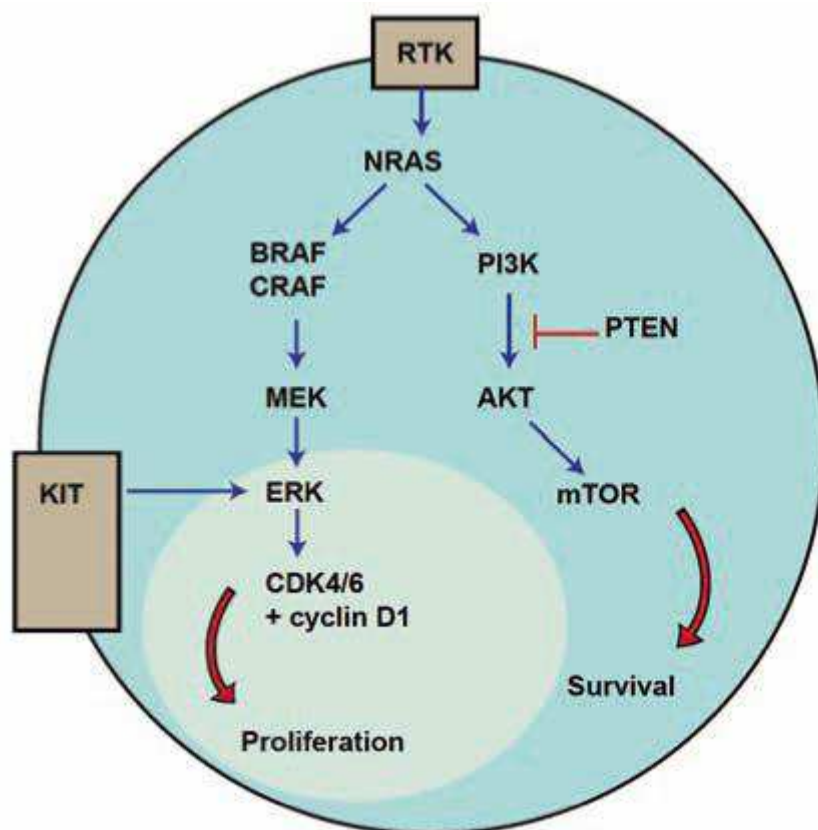


Figure 3 : voies de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK et PI3K/AKT(24).

1.1.2.2.1.2 La voie PI3K/AKT

La voie PI3K/AKT est également fréquemment dérégulée dans le mélanome (21,25). Les mutations de PI3K α , pourtant fréquemment retrouvées dans les pathologies cancéreuses, ne sont présentes que dans 3% des mélanomes métastatiques. La perte de PTEN par mutation ou mécanisme épigénétique est observée dans 5 à 30 % des mélanomes en stades terminaux. Les souris transgéniques PTEN $^{-/-}$ meurent dans les stades précoces de l'embryogenèse, et les souris hétérozygotes PTEN $+/-$ développent de nombreuses pathologies tumorales mais seules les souris PTEN $+/-$ /Cdkn2a $+/-$ développent des mélanomes(26,27). La surexpression d'AKT est notée dans 60 % des mélanomes. L'ensemble de ces dérégulations participent à l'activation globale de la voie PI3K/AKT régulant ainsi la survie cellulaire et l'apoptose (figure 3).

1.1.2.2.1.3 La voie p53 et le cycle cellulaire

La voie P53 est très fréquemment dérégulée dans les cancers mais dans le cas du mélanome, la perte de fonction de p53 est observée dans seulement 10% des cas.

La protéine p16INK4a freine la prolifération cellulaire (blocage G1). Si les inactivations mutationnelles sont quasiment exclusivement retrouvées dans les mélanomes familiaux, une extinction de l'expression de p16INK4a par méthylation de l'ADN est retrouvée dans 75% des cas(28). L'inactivation de cette voie perturbe également le contrôle de l'apoptose et le cycle cellulaire.

1.1.2.2.1.4 La voie Wnt/ β -caténine

La voie Wnt/ β -caténine a également été impliquée dans le développement du mélanome par une activation constitutive comme en atteste l'accumulation de la β -caténine dans le noyau(29). Le rôle de la β -caténine dans le mélanome est encore controversé. En effet, il est établi qu'une augmentation de son expression nucléaire et cytoplasmique est un facteur de bon pronostic. Cependant, il a également été montré à l'aide de souris transgéniques NRASQ61K/bcatsta que sa stabilisation induit une inhibition de p16INK4a conduisant à une immortalisation des mélanocytes sans pour autant augmenter la prolifération comme cela a été montré dans d'autres types cancéreux. Cela suggère que des altérations de la voie β -caténine pourrait être impliquées lors des phases précoces du développement des mélanomes(30,31).

1.1.2.2.1.5 Le facteur de transcription MITF

Le facteur de transcription MITF (pour Microphthalmia-Associated Transcription Factor) apparaît comme un élément important de la prolifération et la survie des mélanocytes avant et pendant leur migration à partir de la crête neurale. Il est

retrouvé amplifié dans 15 à 20 % des mélanomes et a été inversement corrélé à la survie des patients. Une forte expression de MITF serait ainsi corrélée à un état prolifératif tandis qu'une faible expression de MITF serait associée à un état invasif et peu prolifératif(19,32).

I.1.2.2.2 Implication des protéines d'adhésion dans la progression du mélanome

A côté des altérations au niveau des oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeur, toute une série d'anomalies de l'expression de certaines protéines-clés peut avoir un rôle important dans la progression tumorale, notamment les intégrines et les cadhérines qui interviennent dans les phénomènes d'adhésion, de communication ou de migration cellulaire.

I.1.2.2.2.1 Les cadhérines

Les cadhérines sont des protéines favorisant les communications intercellulaires et sont particulièrement liées à la progression tumorale métastatique. La transition entre la phase de croissance radiale et la phase de croissance verticale est caractérisée par un échappement au contrôle des kératinocytes et une capacité à envahir les couches fibroblastiques du derme (Figure 4) (33,34). Ce phénomène se caractérise par une perte d'expression de l'E-cadhérine et une augmentation de l'expression de la N-cadhérine typique d'une transition épithélio-mésenchymateuse notamment médiée par la voie BRAF(35). En diminuant l'expression de l'E-cadhérine, les cellules de mélanome parviennent à réduire leurs interactions avec les kératinocytes qui contrôlent la prolifération et le comportement normal des mélanocytes sains(36). A l'inverse, l'augmentation du niveau d'expression de la N-cadhérine et de protéines associées permet aux cellules de mélanome d'interagir avec les fibroblastes du stroma dans le derme ainsi qu'avec les cellules endothéliales constituant la paroi des vaisseaux(36,37).

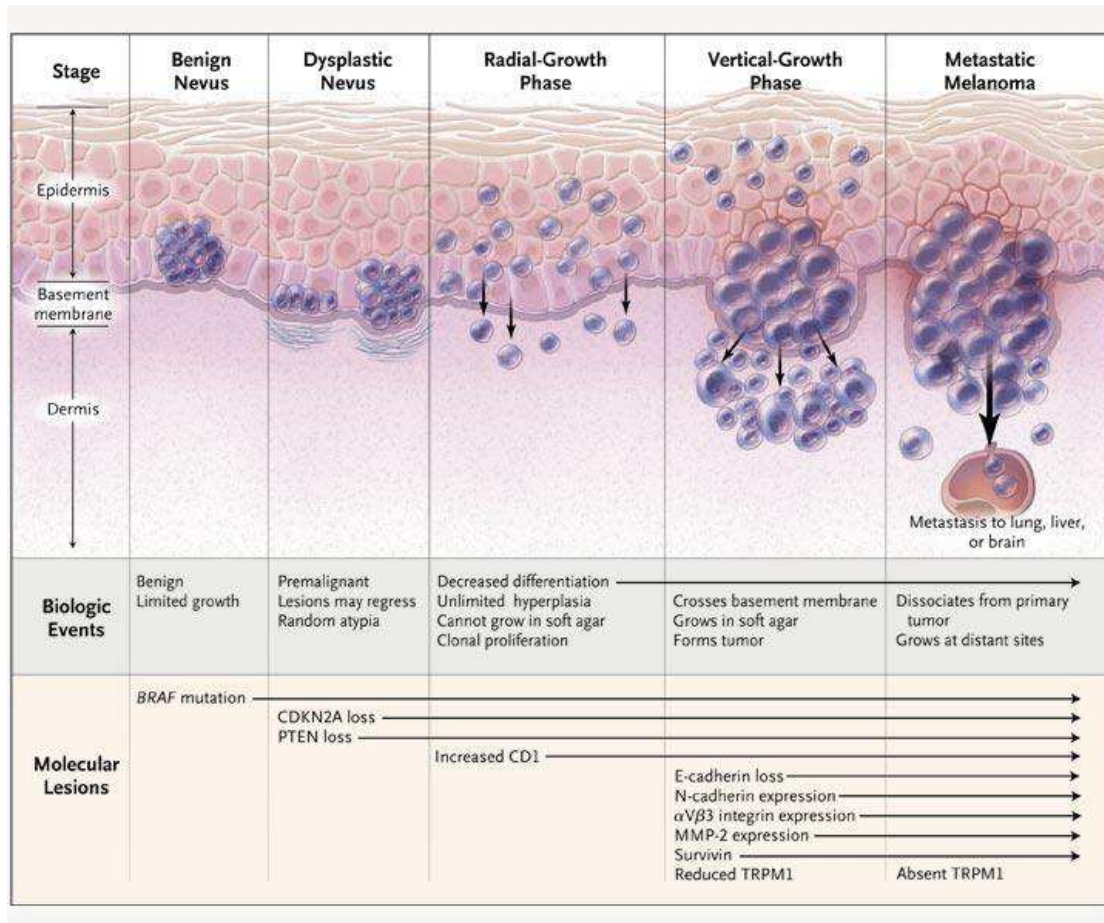


Figure 4 : Evènements biologiques et altérations moléculaires intervenant au cours de la progression du mélanome. D'après Miller et al. 2006(33)

1.1.2.2.2 Les intégrines

Les intégrines permettent de transmettre à la cellule une information relative à la nature et la composition du milieu et engendre une réponse cellulaire adaptée. Les hétérodimères de type α 5- β 3 qui interagissent avec de nombreux composés de la matrice extracellulaire sont surexprimés dans les mélanomes agressifs et corrént avec la phase de croissance verticale. De plus, ces protéines interagissent avec MMP2 (Matrix MetalloProtein 2) impliquée dans dégradation de la matrice extracellulaire(38). Ces résultats montrent le rôle central dans la migration des cellules de mélanome et de l'invasion, et de ce fait, ces protéines peuvent représenter des cibles utiles pour le traitement du mélanome. Plus récemment plusieurs stratégies médicamenteuses ont été développées pour le ciblage des intégrines, notamment grâce à des tripeptides RGD (acides aminés arginine-glycine-aspartate)(39).

I.1.2.2.3 Altération des fonctions autocrine et paracrine lors de la phase invasive du mélanome

L'expression de nombreux facteurs de croissance est également altérée durant la phase invasive du mélanome avec notamment une augmentation de l'expression de HGF (pour Hepatocyte Growth Factor), de FGF (pour Fibroblast Growth Factor) ou de TGFbeta (Transforming Growth Factor β). En supplément de l'augmentation de cette fonction autocrine, les cellules de mélanomes ont également une stratégie paracrine avec la production de FGF et de TGFbeta qui entraîne chez les fibroblastes une sécrétion de signaux pro-invasifs tels que la tenascine-C ou HGF(34,40).

I.1.3 Diagnostic et classifications du mélanome

I.1.3.1 Diagnostic et classification cliniques

I.1.3.1.1 Diagnostic clinique

Le diagnostic clinique repose sur un examen visuel selon deux règles principales : la règle « ABCDE », et la liste révisée des 7 points du groupe de Glasgow.

La règle « ABCDE » (figure 5) permet de distinguer les lésions cutanées suspectes d'un nævus bénin au moment de l'examen (41):

- A comme asymétrie : la lésion pigmentée est asymétrique
- B comme bord : les bords sont irréguliers
- C comme couleur : la couleur n'est pas homogène
- D comme diamètre : le diamètre est supérieur à 5 mm
- E comme évolution : l'aspect de la lésion évolue

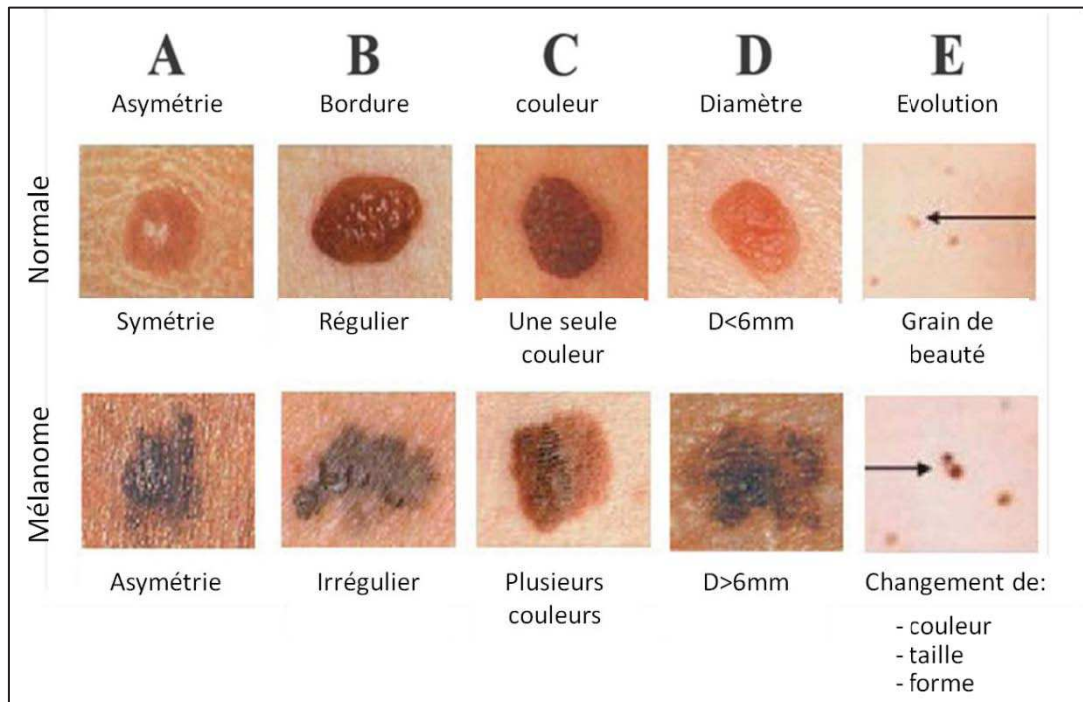


Figure 5 : La règle ABCDE. Adapté de Whited et al 1998 (41).

La liste révisée des 7 points du groupe de Glasgow repose quant à elle sur l'évolutivité de la lésion :

- Changement de taille (lésion connue ou nouvelle) (critère majeur)
- Changement de forme (lésion connue) (critère majeur)
- Changement de couleur (lésion connue) (critère majeur)
- Plus grand diamètre ≥ 7 mm (critère mineur)
- Inflammation (critère mineur)
- Ulcération ou saignement (critère mineur)
- Changement dans la sensibilité de la lésion (critère mineur)

I.1.3.1.2 Classification clinique

Quatre formes anatomo-cliniques principales de mélanome cutané ont été décrites (figure 6)(11):

- le mélanome à extension superficielle (60 à 70%)
- le mélanome nodulaire
- le mélanome de Dubreuilh
- le mélanome acral lentigineux

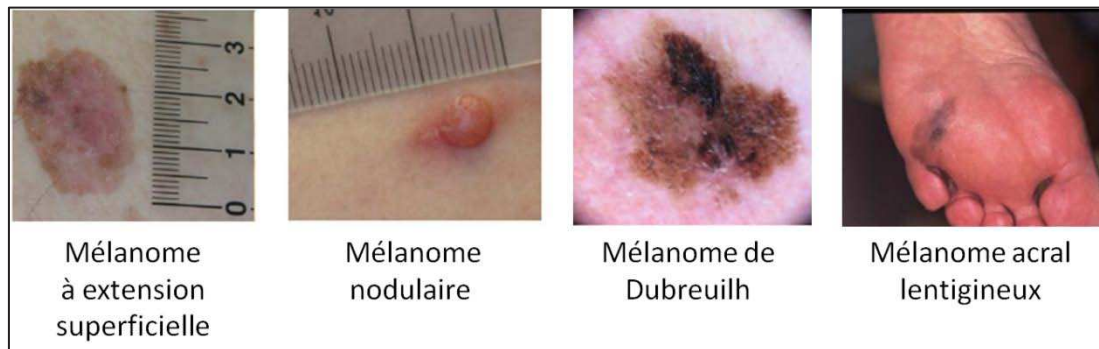


Figure 6 : Les différents types de mélanome. Adapté de Hoek et al. 2008 (11)

Le mélanome nodulaire a la particularité d'avoir une phase de croissance d'emblée verticale alors que les trois autres formes de mélanome ont d'abord une phase de croissance horizontale intra-épidermique puis une phase de croissance verticale avec envahissement du derme puis de l'hypoderme. Le mélanome nodulaire est donc la forme la plus agressive.

1.1.3.2 Diagnostic et classification histologiques

1.1.3.2.1 Diagnostic histologique

L'examen anatomo-pathologique permet de confirmer ou d'infirmer le diagnostic clinique. Parallèlement, il fournit les indications indispensables à la classification anatomo-clinique du mélanome, à la détermination du pronostic, et à la prise en charge (marges de l'exérèse chirurgicale). Ces informations sont classées en critères obligatoires (*i.e.* obligatoirement présents dans tout compte rendu anatomo-pathologique), et facultatifs (42):

Critères obligatoires :

- Diagnostic et typage clinico-pathologique
- Epaisseur de la tumeur en mm (indice de Breslow)
- Ulcération (présence ou absence)
- Nombre de mitoses par mm² (indice mitotique)
- Marges d'exérèse
- Niveau d'invasion (niveau de Clark), particulièrement utile en cas de MM d'épaisseur ≤ 1 mm
- Microsatellites (présence ou absence)

Critères facultatifs :

- Phase de croissance
- Régression (présence ou absence)

- Infiltration par les lymphocytes (degré)
- Vascularité
- Neurotropisme
- Micrométastase lymphatique (présence ou absence, examen du ganglion sentinelle)

Par ailleurs, le mélanome malin présente une forte capacité à métastaser. Par voie lymphatique, les cellules tumorales atteignent les ganglions et s’y multiplient pour donner naissance à des métastases ganglionnaires régionales. Les cellules cancéreuses peuvent également, dans un second temps, se disséminer par voie sanguine vers d’autres organes (principalement poumons, foie, autre site cutané, ou cerveau)(15). La détection et la caractérisation de ces métastases est indispensable pour la stadification du mélanome.

I.1.3.2.2 Classification histologique

I.1.3.2.2.1 Classification TNM

La classification TNM (tableau 2), proposée conjointement par l’American Joint Committee on Cancer (AJCC)(43), et l’Union for International Cancer Control (UICC)(44), est utilisée de façon consensuelle à travers le monde. Cette classification est divisée en trois sous-classifications qui permettent de décrire le degré d’extension du MM au niveau du site primaire (T pour tumeur), des ganglions régionaux (N pour Node ou ganglion), et des organes distants (M pour métastase).

Classification T	Epaisseur (Indice de Breslow)	Ulcération / Mitoses
T1	≤ 1 mm	a : sans ulcération et mitoses < 1 / mm ² b : avec ulcération ou mitoses ≥ 1 / mm ²
T2	1,01 - 2 mm	a : sans ulcération b : avec ulcération
T3	2,01 - 4,00	a : sans ulcération b : avec ulcération
T4	> 4 mm	a : sans ulcération b : avec ulcération

Classification N	Nombre de ganglions envahis	Invasion métastatique
N1	1	a : micrométastase b : macrométastase
N2	2 - 3	a : micrométastase b : macrométastase c : métastases en transit / nodules satellites <u>sans</u> envahissement ganglionnaire
N3	≥ 4 ou masse polyganglionnaire ou métastases en transit / nodules satellites <u>avec</u> ganglions envahis	

Classification M	Site des métastases	Taux sérique de LDH
M1a	Cutané, sous-cutané ou ganglionnaire au-delà de l'aire ganglionnaire régionale	Normal
M1b	Pulmonaire	Normal
M1c	Autres localisations viscérales Toutes métastases à distance	Normal Augmenté

Tableau 2 : Classification TNM, AJCC 9^{ème} édition (43)

1.1.3.2.2 La stadification du mélanome

La classification du stade, ou stadification (tableau 3, figure 7), correspond à un standard international proposé conjointement par l'AJCC et l'UICC permettant de définir l'extension du MM (Tableau 3) (43,44). Le système repose sur la classification TNM précédemment décrite. Les stades sont exprimés par un chiffre, allant de 0, pour le stade le moins avancé (localisé), à IV pour le plus avancé (métastatique).

- Le stade 0 désigne les mélanomes ou les cellules cancéreuses qui ne sont retrouvées que dans la partie superficielle de la peau (l'épiderme) et n'ont pas envahi les autres couches. Les ganglions lymphatiques ne sont pas atteints. Il n'y a ni métastase en transit, ni métastase à distance.
- Le stade I désigne les mélanomes localisés de faible épaisseur ou non ulcérés. Les ganglions lymphatiques ne sont pas atteints. Il n'y a ni métastase (en transit), ni métastase à distance.
- Le stade II désigne les mélanomes localisés de plus grande épaisseur ou avec ulcération. Les ganglions lymphatiques ne sont pas atteints. Il n'y a ni métastase en transit, ni métastase à distance.
- Le stade III désigne les mélanomes qui, quelle que soit leur épaisseur, présentent un envahissement locorégional : atteinte des ganglions lymphatiques ou présence de métastases en transit.

- Le stade IV désigne les mélanomes, qui quelle que soit leur épaisseur et l'atteinte ganglionnaire, présente des métastases à distance. On parle aussi de mélanome métastatique.

Stade I	Mélanome localisé (N0, M0) à faible risque évolutif	
I A	T1a	
I B	T1b ou T2a	
Stade II	Mélanome localisé (N0, M0) avec risque de rechute	
II A	T2b ou T3a	
II B	T3b ou T4a	
II C	T4b	
Stade III	Mélanome avec atteinte ganglionnaire régionale (N, M0)	
III A	N1a ou N2a	(mélanome non ulcéré T1 – T4a)
III B	N1a ou N2a	(mélanome ulcéré T1 – T4b)
	N1b ou N2b	(mélanome non ulcéré T1 – T4a)
	N2c	(mélanome ulcéré ou non T1 – T4a / b)
III C	N1b ou N2b	(mélanome ulcéré T1 – T4b)
	N3	(mélanome ulcéré ou non)
Stade IV	Mélanome avec métastase au-delà du premier relai ganglionnaire régional (M+)	

Tableau 3: Stadification du mélanome, AJCC, version actualisée en 2009 (43)

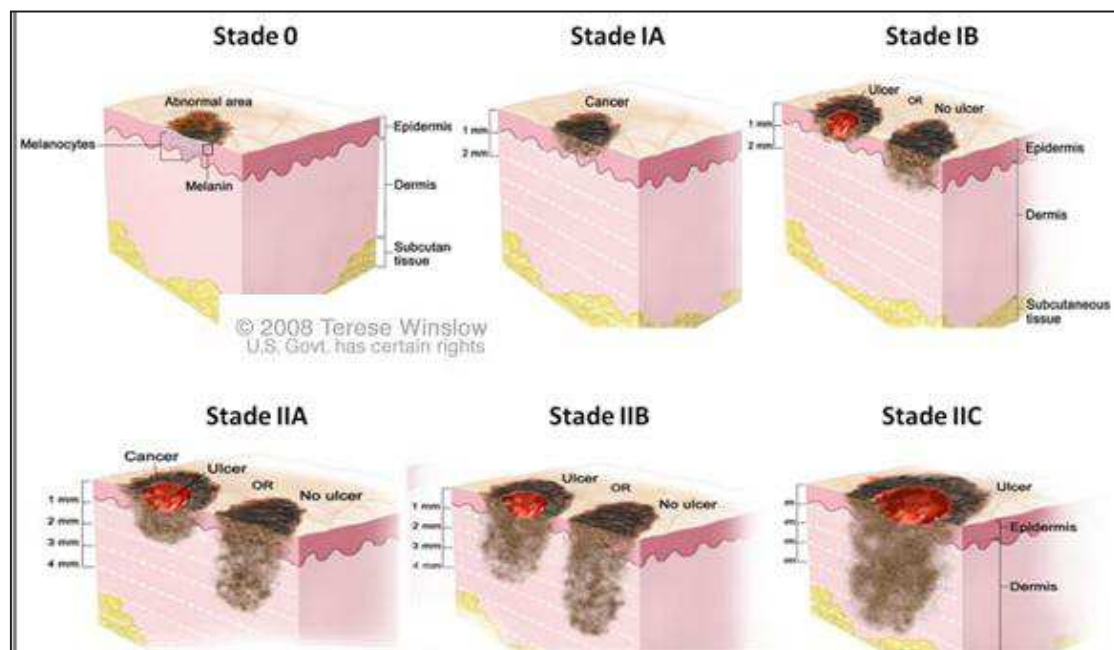


Figure 7 : Stadification du mélanome : premier stades(45).

1.1.3.3 Diagnostic et classification moléculaires

1.1.3.3.1 Diagnostic moléculaire

Dans une perspective de médecine personnalisée(46), la recherche de biomarqueurs diagnostiques, pronostiques, et prédictifs de réponse aux traitements, ainsi que l'identification de cibles moléculaires est devenue une priorité.

L'analyse moléculaire des mélanomes (tumeur primaire et/ou métastases) est aujourd'hui systématique et permet l'orientation de la prise en charge des patients relevant d'une thérapeutique systémique (47,48). Les tests utilisés en routine visent principalement à identifier la présence d'altérations activatrices de la voie RAS/RAF/MEK/ERK afin de proposer aux patients, le cas échéant, des thérapies ciblées.

1.1.3.3.2 Classification moléculaire

1.1.3.3.2.1 Fréquence des mutations en fonction du type du mélanome

Suivant l'origine du développement du mélanome, les types de mutations varient considérablement. Les mélanomes cutanés avec exposition intermittente au soleil sont associés à des mutations activatrices de BRAF et une augmentation relative des mutations de NRAS. Ces mutations sont mutuellement exclusives. A l'inverse les mélanomes des muqueuses, les mélanomes acro-lentigineux et les mélanomes cutanés avec exposition chronique au soleil ne présentent habituellement pas de mutations de BRAF et de NRAS mais peuvent présenter des mutations de c-KIT(15). Ainsi des mutations et/ou une augmentation du nombre de copies du récepteur tyrosine kinase c-KIT sont détectées dans environ 40% des mélanomes muqueux(49,50). Les mutations somatiques de NRAS et BRAF y sont beaucoup plus rares. Concernant les mutations somatiques du mélanome de l'œil, celles de BRAF sont rares (51–53)(Figure 8).

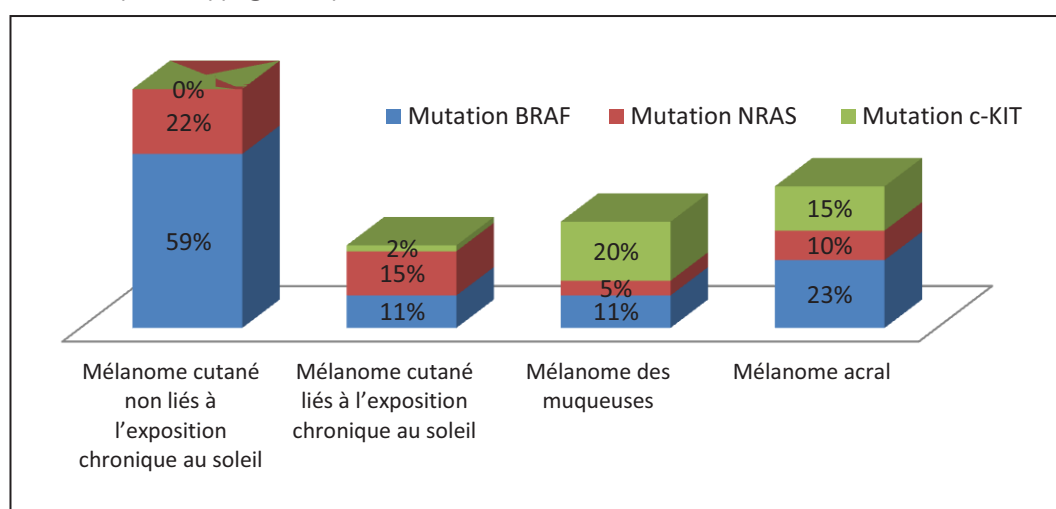


Figure 8 : fréquence des mutations de BRAF, NRAS et c-KIT en fonction du type de mélanome. Adapté de Curtin et al. 2005 (50)

Plusieurs classifications moléculaires du MM ont été proposées (Tableau 4). Celle de Vidwans SJ *et.al.* publiée en 2011 est l'une des plus complètes (54). Elle classe les mélanomes en 8 types selon leur(s) altération(s) moléculaire(s), et décrit les méthodes de diagnostic et les thérapies ciblées possibles pour chaque type.

Type	Voie altérée	Sous-type	Gène clé	Altération	Fréquence	Méthode diagnostique	Thérapies possibles
I	MAPK	I.1	BRAF	Mutation activatrice	BRAF : 40-70% des MM	Séquençage ciblé	Inhibiteurs de BRAF, MEK ou HSP90
		I.2	BRAF / PTEN	Mutation activatrice / Perte ou sous-expression	BRAF : 40-70% des MM	Séquençage ciblé & Immuno-hystochimie	Inhibiteurs de BRAF & inhibiteurs de PI3K, AKT ou mTOR
		I.3	BRAF / AKT	Mutation activatrice / Mutation activatrice	BRAF : 40-70% des MM	Séquençage ciblé & nombre de copies	Inhibiteurs de BRAF & inhibiteurs de AKT ou mTOR
		I.4	BRAF / CDK4	Mutation activatrice / Amplification	15% des Types I	Séquençage ciblé & nombre de copies / CGH	Inhibiteurs de BRAF & inhibiteurs de CDK
Type	Voie altérée	Sous-type	Gène clé	Altération	Fréquence	Méthode diagnostique	Thérapies possibles
II	c-KIT	II.1	c-KIT	Mutation activatrice ou amplification	39% des MM mucosal, 36% des MM acral, 28% des MM cutanés sur zones exposées chroniquement au soleil, 0% des MM sur zones non exposées	Séquençage ciblé / nombre de copies	Inhibiteurs de c-KIT (gleevec)
III	GNAQ GNA11	III.1	GNAQ	Mutation activatrice	>85 des <i>naevi</i> bleus, >50% des <i>naevi</i> bleus malin, ~50% des MM uvéal	Séquençage ciblé	Inhibiteurs de MEK
		III.2	GNA11	Mutation activatrice		Séquençage ciblé	Inhibiteurs de MEK
IV	NRAS	IV.1	NRAS	Mutation activatrice	15-30% des MM	Séquençage ciblé	Inhibiteurs de BRAF, MEK, PI3K, AKT ou mTOR; inhibiteurs de Farnesyl transférase
V	MITF	V.1	MITF	Amplification	10-16% des MM	Nombre de copies	Inhibiteurs de HDAC

		VI.1	PTEN	Perte ou sous-expression	5-40% des MM	Immuno-hystochimie	Inhibiteurs de PI3K, AKT ou mTOR
VI	AKT / PI3K	VI.2	AKT	Mutation activatrice ou amplification	70% des MM métastatiques primaires (sous-type I.3 inclus)	Nombre de copies	Inhibiteurs de PI3K, AKT ou mTOR
		VI.3	PI3K	Activation ou surexpression		Immuno-hystochimie	Inhibiteurs de PI3K, AKT ou mTOR
		VII.1	ARF / INK4A	Inactivation ou perte	inactivé dans 10% des MM, délété dans 50% des MM	Séquençage ciblé / CGH	Inhibiteurs de CDK
VII	CDK	VII.2	CDK4	Amplification	4% des MM	Nombre de copies / CGH	Inhibiteurs de CDK
		VII.3	CCND1 / Cycline D1	Amplification	6-44 % des MM	Nombre de copies / CGH	Inhibiteurs de CDK
VIII	p53 / BCL2	VIII.1	BCL2	Surexpression		Immuno-hystochimie	ND
		VIII.2	p53	Mutation inhibitrice	10% des MM	Séquençage ciblé	ND

Tableau 4 : Classification moléculaire du MM. D'après Vidwans SJ et.al. 2011 (54)

1.1.3.3.2 Implication des altérations moléculaires du mélanome

Cette classification moléculaire montre l'hétérogénéité génétique du mélanome. Elle a conduit à de nouvelles approches thérapeutiques dites « ciblées ». Ces approches ont montré efficacité clinique lors des essais cliniques et sont aujourd'hui utilisées en première intention lors de traitement de mélanomes présentant des mutations contre les quelles de telles thérapies sont disponibles. A titre d'exemple, le chef de file, le vemurafenib, a été développé pour inhiber BRAF présentant la mutation activatrice V600E (55).

1.1.4 Traitements du mélanome

90% des mélanomes diagnostiqués sont des tumeurs primaires sans signe évident de présence de métastases (stade I) ; ils sont systématiquement traités par exérèse chirurgicale. La survie des patients atteints de ce type de tumeur est de 75 à 85%(48).

Le problème du traitement se pose lorsque les patients présentent des signes de dissémination métastatique, dans ce cas la survie n'excède pas les 10%. Le traitement de MM a été révolutionné ces dernières années par le développement d'immunothérapies qui ont montré un bénéfice significatif sur la survie globale, ainsi que par des thérapies ciblées extrêmement efficaces, qui ont également fait la preuve d'un bénéfice en survie.

Les traitements proposés pour les stades III non résecables et stades IV sont donc des thérapies systémiques : des immunothérapies, des thérapies ciblées et des chimiothérapies. Les thérapies ciblées sont utilisées en première ligne dans les mélanomes porteurs d'une altération de la voie des MAPK (BRAF V600E notamment). Les chimiothérapies classiques ne permettent pas d'améliorer la survie des patients de façon satisfaisante avec moins de 20% de réponses objectives pour l'ensemble des traitements disponibles(56). Elles ne sont utilisées, en association, que dans les mélanomes pour lesquels aucune thérapie ciblée n'est disponible ou en cas de rechute après traitement par ces thérapies.

1.1.4.1 La chirurgie

La chirurgie est le traitement principal du mélanome localisé et permet habituellement de guérir le mélanome de stade précoce (0, I, II, et III résecable). La première exérèse sert à confirmer le diagnostic et préciser l'épaisseur du mélanome. Dans la majorité des cas, une reprise chirurgicale préventive est nécessaire. Le dermatologue ou le chirurgien complète la première intervention chirurgicale (exérèse diagnostique) en enlevant une bande plus ou moins large de tissu sain autour de la cicatrice de la première exérèse. On appelle aussi cette zone, marge de peau saine ou marge de sécurité. Les marges de la reprise d'exérèse seront adaptées à l'épaisseur du mélanome (mesurée au microscope lors de l'examen anatomopathologique).

Les marges d'exérèse recommandées sont les suivantes :

- mélanome in situ : 0,5 centimètre ;
- mélanome de 1 millimètre ou moins : 1 centimètre ;
- mélanome de 1 à 2 millimètres : 1 à 2 centimètres ;
- mélanome de 2 à 4 millimètres : 2 centimètres ;
- mélanome de plus de 4 millimètres : 2 à 3 centimètres.

Une marge d'exérèse supérieure à 3 cm n'a pas d'intérêt thérapeutique. Pour les mélanomes de Dubreuilh non invasifs, une marge de 1 centimètre est recommandée (48,57).

1.1.4.2 La radiothérapie

La radiothérapie consiste à traiter localement les cancers par des radiations ou rayonnements pour détruire les cellules cancéreuses. Ces rayonnements sont produits soit par des accélérateurs de particules, soit par des sources radioactives. On parle d'irradiation de la tumeur ou de la zone à traiter.

De façon générale, la radiothérapie est peu utilisée dans le traitement du mélanome. Lorsqu'une métastase osseuse entraîne une douleur ou une compression (par exemple compression de la moelle épinière avec un risque de paralysie), la radiothérapie permet de soulager les symptômes (radiothérapie palliative). Elle peut également être utilisée sur les métastases cérébrales peu nombreuses et de petite taille(48,57,58).

1.1.4.3 L'immunothérapie

L'immunothérapie active et passive sont mises à l'œuvre dans le traitement du mélanome métastaté.

L'immuno-stimulation, en traitement adjuvant (en complément de la chirurgie) pour les mélanomes de stade II et III(59), est très controversé. Elle utilise l'IL-2 ou les interférons (α , β , γ). L'IL-2 forte dose est approuvée au Etats-Unis mais pas en France.

Par ailleurs, l'immunothérapie passive utilise des anticorps monoclonaux spécifiques permettant de restaurer le système immunitaire contre le mélanome. Les traitements approuvés par la FDA sont des anticorps anti-CTLA-4 (ipilimumab, 2011), et des anticorps anti-PD1 (nivolumab et pembrolizumab, 2014)(60). Le frein à l'utilisation de ces traitements est leur cout très important et les effets secondaires graves développés (auto-immunité principalement).

1.1.4.3.1.1 L'ipilimumab

L'ipilimumab a été la première des nouvelles immunothérapies lancées pour le mélanome. Elle a démontré, pour la 1ère fois, une amélioration de la survie chez les patients atteints de mélanome malin(61). Cependant très peu de patients atteints de mélanome métastatique répondent cependant à ce traitement. La priorité est aujourd'hui mise sur la recherche de marqueurs prédictifs de réponse. De plus, les effets indésirables sont lourds. L'ipilimumab peut causer des effets indésirables graves en lien avec une activation du système immunitaire, telles qu'une hépatite ou une atteinte de l'hypophyse.

1.1.4.3.1.2 Le nivolumab et le pembrolizumab

Le nivolumab et le pembrolizumab bloquent le récepteur PD-1 (programmed death-1), un récepteur inhibiteur du système immunitaire exprimé par les lymphocytes activés. Leur action, à peu près similaire, a démontré chez 30 % en moyenne des malades une régression durable des tumeurs et, dans certains cas, une stabilisation

de la maladie (62,63). Ces deux molécules ont bénéficié d'une procédure accélérée pour l'obtention d'une approbation par la FDA en 2014. Le pembrolizumab a été abandonné en raison d'une trop fréquente induction d'effets secondaires graves.

1.1.4.4 Les thérapies ciblées

Les études effectuées sur les altérations des voies responsables de la transduction du signal intracellulaire dans le mélanome malin a permis d'introduire de nouveaux agents médicamenteux ciblant spécifiquement les cascades mutées. Cette stratégie de thérapeutique « ciblée » est de plus en plus explorée dans de nombreux cancers. Il s'agit de cibler spécifiquement des protéines ou des voies de signalisation connues pour être mutées et/ou dérégulées dans un cancer donne et ainsi épargner les cellules saines de l'organisme. Dans le cas du mélanome, les voies des MAPK et PI3K/AKT sont particulièrement dérégulées (80 % des cas) (figure 9)(64–66). Plusieurs études cliniques ont ainsi abouti à l'approbation par la FDA de quatre nouveaux agents depuis 2011 (60):

1. les inhibiteurs de BRAF muté (vemurafenib 2011, dabrafenib 2013),
2. les inhibiteurs de MEK (trametinib 2013, cobimetinib 2015)

Ces thérapies dites ciblées sont actuellement utilisées en première intention dans les mélanomes porteurs de la mutation BRAF V600E (70% des mélanomes) (60,67). Cette mutation, activant de façon constitutive la cascade des MAPK, est responsable de l'agressivité de ces mélanomes.

Néanmoins, de nouvelles difficultés surgissent comme le phénomène de résistance acquise (rechutes dans une médiane de 5-7 mois) ou les effets indésirables graves de ces nouveaux médicaments.

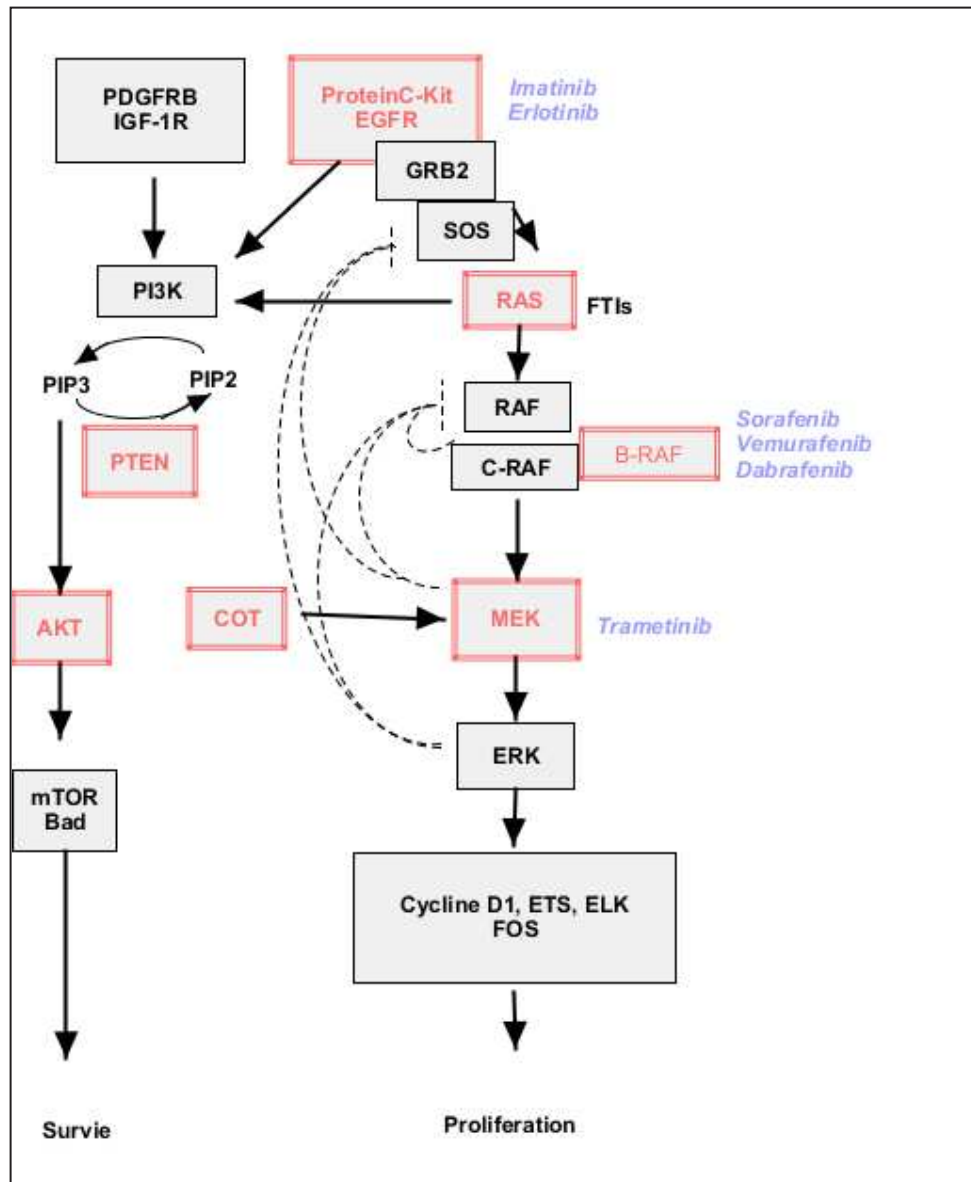


Figure 9: Représentation schématique des voies MEK/ERK et PI3K/AKT. Les protéines marquées en rouge sont les plus fréquemment retrouvées mutées dans les mélanomes. Les molécules pharmacologiques inhibitrices sont mentionnées en bleu à proximité de leur(s) cible(s) protéique(s). Ainsi les Principaux mécanismes de régulation de la voie MEK/ERK.

I.1.4.4.1 Les anti-BRAF

I.1.4.4.1.1 Le vemurafenib

Le vemurafenib est la première molécule de thérapie ciblée à avoir été autorisée en France pour le traitement des mélanomes métastatiques et non opérables. Disponible depuis février 2012, elle est prescrite aux seuls patients présentant une mutation de l'oncogène BRAF (68). Cette mutation, présente chez environ 50 % des patients développant des métastases, entraîne une modification délétère de l'activité de la protéine BRAF qui favorise la prolifération anormale des cellules

cancéreuses. Son action peut être bloquée indirectement par le vémurafenib. Ce traitement oral a permis d'augmenter la survie sans progression par rapport au traitement standard, d'après l'étude de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) ayant autorisé la thérapie ciblée en France. Toutefois, des résistances paraissent se mettre en place après quelques mois de traitement, limitant son efficacité à plus long terme.

Au niveau cellulaire, le vemurafenib entraîne une inhibition de croissance, l'arrêt du cycle cellulaire et le déclenchement de l'apoptose dans les lignées sensibles, mutées pour BRAF. A l'inverse une lignée cellulaire « wild-type » pour BRAF ou mutée pour NRAS reste résistante à l'inhibiteur sélectif(69). En effet, alors que le vemurafenib inhibe BRAF dans les cellules portant la mutation V600E, on observe au contraire une activation de cette cascade de signalisation dans les lignées sauvages pour BRAF via l'activation de CRAF (70). Ces études suggèrent la nécessité de connaître le statut mutationnel de BRAF avant toute instauration de traitement par vemurafenib.

1.1.4.4.1.2 Le dabrafenib

Pour tenter d'améliorer les résultats obtenus avec le vemurafenib, des chercheurs ont développé un autre inhibiteur de la protéine BRAF, le dabrafenib. Cette nouvelle thérapie ciblée, destinée au même groupe de patients présentant une mutation du gène BRAF (71). Le dabrafenib a reçu l'AMM européenne en 2013(72).

1.1.4.4.2 Les anti-MEK

1.1.4.4.2.1 Le trametinib

Le trametinib est l'une de thérapie ciblée qui bloque spécifiquement la protéine MEK, kinase se situant juste après BRAF dans la cascade des MAPK. Le trametinib a reçu l'AMM dans le traitement des patients adultes atteints d'un mélanome non résecable ou métastatique porteur d'une mutation BRAF V600 en association au dabrafenib, en 2015(73).

1.1.4.4.2.2 Le cobimetinib

Le Cobimetinib est un nouvel anti-MEK approuvé en 2015 par la FDA pour une utilisation en association avec le vemurafenib (60).

1.1.4.5 La chimiothérapie classique

La chimiothérapie cytotoxique est réservée aux mélanomes métastatiques non porteurs d'altération sur la voie BRAF/MEK, ou en rechute après traitement par thérapie ciblée. Les agents alkylants tels que la dacarbazine (molécule de référence) ou le temozolomide ont montré un bénéfice très limité (56,74). D'autres agents peuvent être utilisés en association tel que les anti-microtubules (taxanes et vinca-alcaloïdes (67)). La toxicité de l'ensemble de ces agents est par ailleurs très importante.

1.1.4.5.1 Dacarbazine

La dacarbazine (ou DTIC pour dimethyl-triazeno-imidazole-carboxamide) (Figure 10) est un agent alkylant. La dacarbazine est le seul agent cytotoxique approuvé par la FDA pour les mélanomes de stades IV. Elle a constitué, pendant plus de trois décennies après son AMM aux USA en 1975, le traitement standard pour le mélanome métastatique(75). L'effet alkylant de la dacarbazine est observé après activation métabolique au niveau des microsomes hépatiques. La dacarbazine est administrée par voie parentérale, son effet n'est pas temps-dépendant.

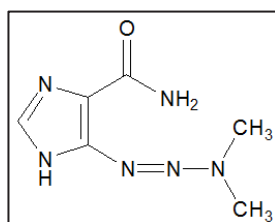


Figure 10: structure chimique de la dacarbazine

1.1.4.5.2 Témzolomide

Le témzolomide ou le 3-méthyl-4-oxoimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tétrazine-8-carboxamide est un composé monovalent (figure 11). C'est une pro-drogue activée après hydrolyse suivie d'une décarboxylation. Elle agit selon le même mode d'action que la dacarbazine mais présente l'avantage d'être administrée par voie orale (76). Des essais cliniques ont montré que le témzolomide présente une activité équivalente à celle de la dacarbazine(77,78).

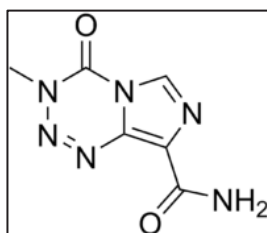


Figure 11 : structure chimique du témzolomide

I.1.4.5.3 Les dérivés nitroso-urées

Ces nitroso-urées sont indiqués aussi dans le traitement du mélanome métastatique: la fotemustine (Muphoran®), la carmustine (BCNU, BICNU®), la lomustine (CCNU, Bélustine®) ou encore la semustine (methyl-CCNU). Les nitrosourées sont très liposolubles et sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique, ce qui les rend utiles dans le traitement des métastases cérébrales.

La fotemustine (Figure 12) est le seul composé de cette famille utilisé en clinique dans le cas de métastases cérébrales. Une étude a montré une réponse objective de 15,2% contre 6,8% pour la dacarbazine mais pas d'allongement de la survie globale(79). Les associations entre fotemustine et dacarbazine ont montré des taux de réponses plus importants (entre 11,7 et 33%) mais sans amélioration de la durée de survie et accompagné de toxicités très variables(75).

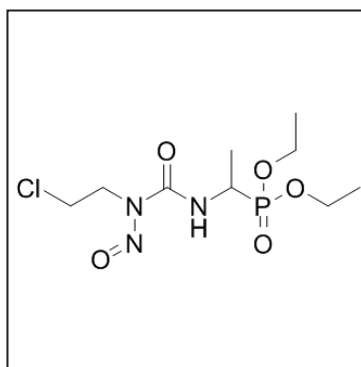


Figure 12 : structure chimique de la fotemustine

I.1.4.5.4 Les Poly - Chimiothérapie

Plusieurs types d'association entre agents cytotoxiques ont été essayés. Les premières testées furent les BOLD (bléomycine/vincristine/lomustine/dacarbazine) et les BELD (bléomycine/vindésine/lomustine/dacarbazine). Les taux de réponses objectives varient entre 2 et 45% suivant les études. L'association CVD (cisplatine/vinblastine/ dacarbazine) fut ensuite extensivement étudiée et le taux de réponses objectives observées varie entre 25 et 45% suivant les études. Enfin, l'association CBDT (dacarbazine/carmustine/cisplatine/tamoxifène), aussi appelée "Dartmouth regimen" fut plus récemment étudiée et montre des taux de réponses objectives entre 10 à 30% suivant les études(75). Globalement les poly-chimiothérapies n'ont pas réussi à apporter la preuve d'une différence significative de leur action par rapport à une mono-chimiothérapie(48).

De plus, la toxicité est nettement plus élevée avec ce type de stratégie thérapeutique. A ce jour, les poly-chimiothérapies ne sont donc utilisées qu'en dernier recours pour le traitement du mélanome métastatique.

1.1.4.6 Conclusion et perspectives thérapeutiques

Au-delà de ces lignes thérapeutiques, il n'y a pas d'attitude standard. Les médicaments employés, les doses administrées, ainsi que le rythme des traitements varient d'une personne à l'autre, en fonction des caractéristiques du mélanome et de la tolérance au traitement. C'est pourquoi le plan de traitement est déterminé au cas par cas.

Avant l'apparition des thérapies ciblées, le traitement du mélanome n'avait pas progressé depuis plusieurs dizaines d'années et aucune chimiothérapie n'avait permis d'améliorer la survie globale des patients une fois le stade métastatique atteint. Les solutions thérapeutiques commencent donc à voir le jour souffrant pourtant toujours du caractère très chimiorésistant du mélanome. L'amélioration des traitements par les thérapies ciblées et le développement de cibles pharmacologiques innovantes sont donc dépendants de la compréhension de l'échec thérapeutique et des mécanismes de la chimiorésistance de ce cancer.

I.2 Chapitre 2 : lymphome T de l'adulte

I.2.1 Généralités

Maladies du système lymphatique, les lymphomes se caractérisent par la prolifération anormale des lymphocytes et leur accumulation dans les ganglions lymphatiques (souvent le cou, les aisselles, l'aîne), et/ou dans d'autres organes (tube digestif, moelle osseuse, poumon, peau), finissant par former une tumeur, qui empêche le système immunitaire de fonctionner normalement.

La maladie apparaît initialement en un endroit déterminé, habituellement un ganglion lymphatique. Dans de rares cas, elle peut débuter dans des organes lymphoïdes comme la rate, le foie ou la moelle osseuse.

Selon leur profil histologique et épidémiologique, on distingue deux types de lymphomes :

- Le lymphome hodgkinien qui touche en particulier les jeunes adultes et se caractérise par la présence de cellules de Reed Sternberg, dérivant de lymphocytes B
- le lymphome non hodgkinien (LNH), qui regroupe une trentaine de sous-types. Ils touchent en particulier les personnes plus âgées (après 60 ans). Ils désignent les proliférations malignes du tissu lymphoïde impliquant, selon les cas, la transformation de cellules lymphoïdes B, T, NK ou dendritiques.

Le lymphome non hodgkinien représente 85 % des lymphomes ; le lymphome hodgkinien 15 %. Environ 85 % des cas de LNH sont des lymphomes B. Les autres, soit 15 %, sont des lymphomes T et des lymphomes NK (HAS 2012).

À l'heure actuelle plus de 30 sortes de lymphomes non Hodgkiniens sont connues. Ces transformations malignes sont toutes différentes et nécessitent chacune un traitement adapté.

Dans cette thèse, nous nous intéresserons au lymphome non hodgkinien de type lymphome T de l'adulte (ATL).

I.2.1.1 La leucémie/ lymphome T de l'adulte (ATL).

La leucémie/lymphome T de l'adulte (ATL) est une prolifération lymphoïde maligne, portant sur les lymphocytes CD4+ activés, il est découvert en 1980, et presque exclusivement retrouvée chez les patients originaires de zones d'endémie pour le rétrovirus HTLV-1 (Human T Lymphocyte Virus type 1). Le provirus HTLV-1 est intégré de façon clonale dans les lymphocytes atypiques caractéristiques de l'ATL(80). Il diffère de la maladie de Hodgkin ou lymphome hodgkinien par l'absence de cellules

de Sternberg. Parmi les sujets infectés, 2 à 3% développent une ATLL, 20 à 40 ans après la contamination verticale (allaitement maternel dans plus de 95% des cas).

La variabilité des formes cliniques a conduit à une classification en quatre sous-types qui peuvent se succéder l'un à l'autre (81) :

1. La forme aiguë : elle survient dans 55% à 75% des cas des ATLL. L'ATLL aiguë associe une hyperlymphocytose et un syndrome tumoral. Ces formes sont souvent graves d'emblée, avec

- o des lésions de la peau,
- o L'apparition de nombreux ganglions lymphatiques enflés (adénopathie généralisée),
- o une hépatosplénomégalie
- o une hausse du nombre de globules blancs et
- o apparition d'infections opportunistes.

2. La forme lymphomateuse de l'ATL: elle est rare et se comporte agressivement elle aussi. Elle est caractérisée par des ganglions lymphatiques enflés (adénopathie), mais on n'observe habituellement pas de cellules leucémiques dans le sang. Une hausse du taux de calcium est moins probable dans le cas de la forme lymphomateuse de l'ATL/L que de la forme aiguë.

3. La forme chronique : souvent caractérisée par des lésions de la peau et un nombre élevé de globules blancs. Cependant, contrairement à la forme aiguë, il n'y a pas d'hypercalcémie et pas de cellules leucémiques dans le sang.

4. L'ATL indolent, quatrième sous-type, il est rare. Il est caractérisé par un passage de cellules atypiques circulantes sans hyperlymphocytose. Il n'y a pas d'atteinte viscérale autre que cutanée et pulmonaire.

1.2.1.2 Epidémiologie du lymphome T de l'adulte

Même s'il est difficile de connaître avec précision le nombre de personnes infectées par HTLV-1 dans le monde, on estime actuellement ce chiffre environ 5 % des 10 à 20 millions de personnes infectées, après une longue période de latence(82). Il existe des zones de forte endémie, avec plus de 2 % de séroprévalence dans la population adulte, tels le sud du Japon, l'Afrique intertropicale, la région Caraïbe et ses alentours, l'Amérique centrale et du Sud, certaines régions de Mélanésie et du Moyen-Orient (Nord-Est de l'Iran)(83). Au Japon, on considère qu'il existe environ un million de porteurs asymptomatiques(84). L'Afrique apparaît comme la plus grande zone d'endémie avec quelques millions de personnes infectées. En France

métropolitaine, les cas d'ATL ou de TSP/HAM sont surtout retrouvés chez les patients originaires de zones d'endémie (Antillais ou Africains).

I.2.2 Mécanismes physiopathologiques impliqués dans de lymphome T de l'adulte

HTLV-1 est le seul rétrovirus humain connu en tant qu'agent étiologique direct d'une affection maligne : la leucémie/lymphome T de l'adulte (ATLL). Le HTLV-1 est un provirus intracellulaires qui infecte les lymphocytes en formant une "synapse virologique" qui permet au génome viral de passer d'une cellule à une autre. L'infection affecte l'expression génique des lymphocytes T, conduisant à une augmentation de la prolifération des lymphocytes T affectées. Le HTLV affecte principalement les lymphocytes T et spécifiquement les lymphocytes CD4, tandis que le HTLV-2 touche principalement les lymphocytes CD8. In vitro, le HTLV-1 est capable d'infecter d'autres types cellulaires, ce qui représente la pathogenèse de divers HTLV-1 (85). Morphologiquement, ces cellules leucémiques caractéristiques de l'ATL ont un noyau hyperconvoluté dit en trèfle, et un cytoplasme hyperbasophile et sont appelées « flower cells » par les auteurs anglosaxons. Elles expriment les marqueurs lymphocytaires T CD2, CD3, CD4, CD5, avec une négativité fréquente des marqueurs CD7 et CD8. Le plus souvent, on retrouve à leur surface les marqueurs d'activation HLA-DP, DQ, DR et surtout la chaîne alpha du récepteur de l'interleukine 2 (CD25)(86). Le risque de survenue d'une ATL chez un sujet infecté par HTLV-1 est de 1 à 5 %. L'ATL apparaît après une latence clinique de 20 à 60 ans, chez un sujet le plus souvent infecté par l'allaitement(87–89).

I.2.2.1 Le virus HTLV-1

Le virus HTLV-1 a été découvert en 1980 par Gallo et al, à partir d'une lignée issue d'une culture à long terme de lymphocytes du sang périphérique d'un patient atteint d'un lymphome T cutané(80). En 1982, kalyanaraman et al, la même équipe isola le HTLV-2 d'une lignée dérivée du tissu splénique d'un patient ayant une forme particulière, à cellules T, de leucémie à tricholeucocytes(90). HTLV-1 et HTLV-2 ont une homologie de séquence nucléotidique de 65-70 %.

HTLV-1 est le seul rétrovirus humain connu en tant qu'agent étiologique direct d'une affection maligne : la leucémie/lymphome T de l'adulte (ATL)(91). En 1985, l'infection par ce virus fut associée en Martinique à une neuromyélopathie chronique, dénommée paraparésie spastique tropicale (TSP). En 1986, une équipe japonaise rapporta l'existence d'une maladie similaire associée également à ce rétrovirus qui fut appelée HTLV-1 associated myelopathy (HAM). Cette mélopathie chronique est actuellement nommée TSP/HAM(92).

Le virus HTLV2, isolé en 1982, possède une séquence proche d'HTLV1, mais en diffère par certains aspects épidémiologiques et pathogéniques. Il ne semble être associé qu'à de rares cas de neuromyélopathie primitive proche des TSP/HAM. HTLV2 est endémique dans des populations d'Amérindiens et de Pygmées, mais aussi chez des toxicomanes aux drogues IV de nombreuses régions (Amérique, Europe, Asie). Sa prévalence est très variable.

Le virus HTLV-1 est un onco-rétrovirus(93) exogène qui se transmet horizontalement de cellule à cellule. Il est actuellement taxonomiquement groupé avec les virus HTLV-II, le BLV (Bovine leukemia virus) et le virus STLV (Simian T-cell leukemia virus), du fait des similitudes de la structure et de l'organisation moléculaire. L'observation en microscopie électronique montre un aspect de rétrovirus de type C avec un diamètre de 110 à 140nm. L'infection par HTLV-1 ne produit pas d'effet cytopathogène caractéristique, et le virus n'est pas lytique mais transformant. Le provirus HTLV-I est intégré de façon clonale dans l'ADN de ces cellules leucémiques. La transformation et l'expansion clonale des lymphocytes T sont liées à l'oncoprotéine virale Tax qui induit l'expression constitutive du récepteur à l'interleukine 2 à la surface des cellules T et favorise leur instabilité génétique.

Au niveau moléculaire, comme pour tous les rétrovirus, HTLV-1a un motif HTLV gag-pol-env flanquant avec de longues séquences terminales répétées (figure 13). Dans l'ATL, la protéine pathogène principale Tax, conduit à une leukogénèse en immortalisation des lymphocytes T in vitro(94).

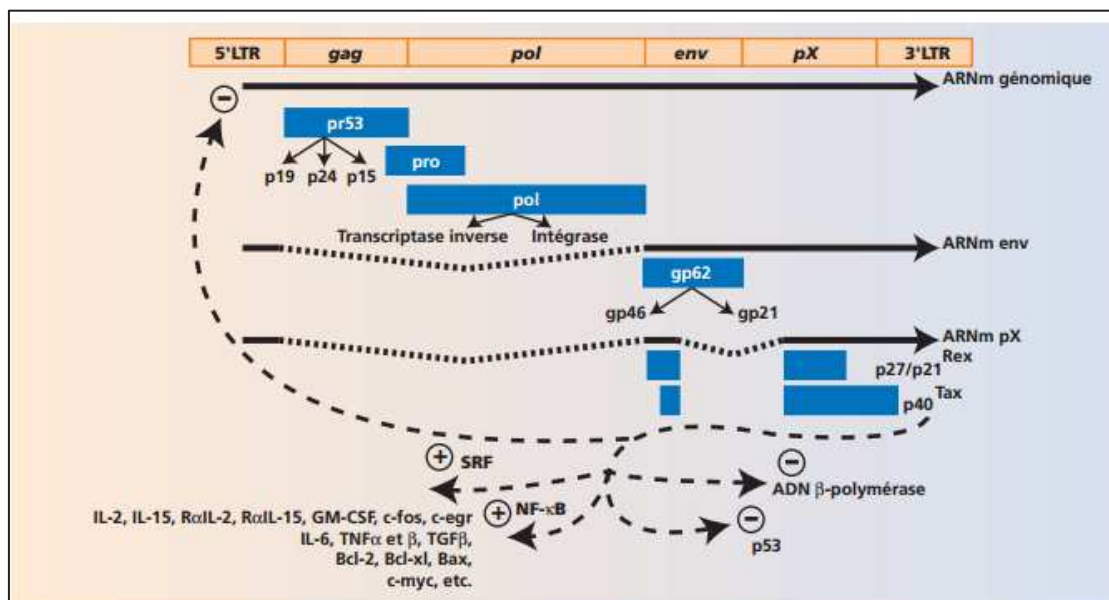


Figure 13: Régulation du cycle viral et de l'expression de gènes cellulaires par Tax. Cette figure a pour origine(95).

Ce résultat est obtenu par la stimulation de l'interleukine-15 (IL-15) et l'interleukine-2 (IL-2), à son tour, conduisant à la croissance des cellules T et à leur transformation.

L'expression du gène Tax est inhérente à l'HTLV-1 et HTLV-2, bien que HTLV-1 est plus pathogène (96,97).

La protéine Tax codée par la région pX du génome de HTLV-1 module la synthèse ou la fonction de protéines régulatrices de la prolifération et de la survie cellulaire. La division mitotique de la cellule hôte stimulée par Tax constitue le mode de réplication prédominant de HTLV-1, expliquant la grande stabilité génétique de ce rétrovirus et l'expansion polyclonale des lymphocytes infectés. Dans l'ATL, une altération de l'intégrité génétique de la cellule, induite par Tax, participerait à l'émergence du clone leucémique. Dans la TSP/HAM, la réponse immunitaire cellulaire, principalement dirigée contre les lymphocytes infectés exprimant Tax, pourrait jouer un rôle délétère par libération dans le système nerveux central de cytokines pro-inflammatoires.

L'échappement à la réponse immunitaire des cellules d'ATLL semble corrélé à la protéine HBZ (HTLV-1 Bzip factor (basic leucine zipper factor)), surtout dans les phases tardives de la maladie. On a constaté récemment que le gène HBZ est constamment exprimé dans les cellules d'ATL, suggérant un rôle dans la transformation cellulaire et la leucémogénèse et l'augmentation de la pathogénèse de HTLV-1 ainsi que l'augmentation de la charge du provirus HTLV-1(98).

1.2.2.1.1 Rôle du virus HTLV-1 dans l'ATL

Contrairement à d'autres modèles rétroviraux animaux, le virus HTLV-1 ne possède pas un oncogène viral analogue à un proto-oncogène cellulaire. Les particules virales d'HTLV-1, mêmes inactivées par les rayons UV sont capables de stimuler in vitro les lymphocytes T normaux au repos. L'expression de plusieurs gènes de facteurs de croissance ou de transcription cellulaires peut être induite sous l'effet transactivateur de la protéine Tax (Figure 14). Ce phénomène qui passe par l'interaction de Tax avec un facteur de transcription ubiquitaire, a été décrit pour les gènes de l'interleukine 2 (IL2), la chaîne alpha du récepteur à l'IL2, le GM-CSF, les proto-oncogènes c-sis, c-fos, fra-1, egr-1, egr-2 et c-jun, la vimentine, l'interleukine 6 (IL6), le TNF-bêta, le TGF-bêta, la globine et la parathyroid hormone related protein ou PTHrP (99). À l'inverse, Tax exerce un rôle répresseur sur le gène de la bêta polymérase impliquée dans la réparation de l'ADN. L'effet transactivateur de Tax va favoriser une prolifération cellulaire autocrine facilitant le développement d'événements secondaires. Le virus HTLV-1 agit donc précocement dans la transformation mais d'autres événements sont nécessaires à l'apparition d'un clone malin chez l'individu infecté. En effet, une population T pré-maligne, oligoclonale ou monoclonale, représentant jusqu'à 10% des leucocytes, est parfois retrouvée chez des sujets séropositifs parfaitement asymptomatiques, dont très peu progresseront vers une forme agressive d'ATL. Parmi ces événements secondaires, on ne connaît

pas d'anomalie cytogénétique caractéristique de l'ATL, mais plusieurs anomalies chromosomiques non spécifiques et souvent multiples sont fréquemment observées: trisomie 3 ou 7, anomalies des chromosomes 6 et 14 (100). La survenue de ces anomalies cytogénétiques pourrait être favorisée par le rôle inhibiteur de la protéine Tax sur le promoteur de la β -polymérase cellulaire qui joue un rôle important dans la réparation de l'ADN.

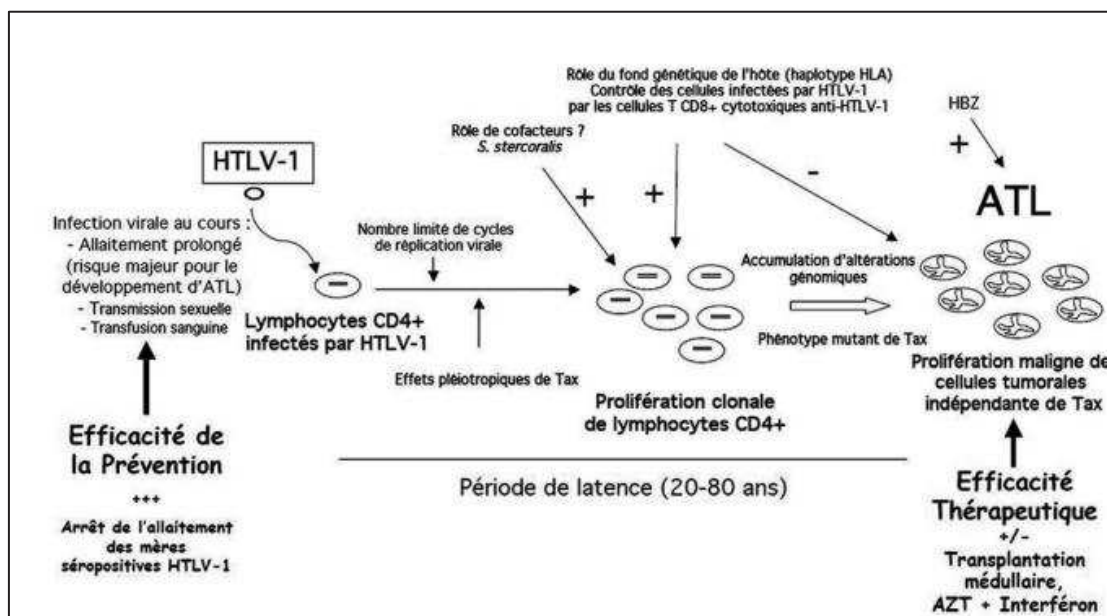


Figure 14 : Histoire naturelle du développement d'une leucémie T de l'adulte (ATL) associée à l'HTLV-1.

Ce schéma montre le rôle de l'HTLV-1 de la primo-infection jusqu'à la prolifération maligne de lymphocytes T CD4+(92).

1.2.2.2 Modes de transmission du virus HTLV-1

Trois principales voies de transmission pour HTLV-1 ont été rapportées, il s'agit de(82) :

- L'allaitement maternel

Plusieurs travaux, surtout japonais, ont montré que l'allaitement maternel est la voie principale de transmission d'HTLV-1(101). Quelques enfants peuvent également avoir été infectés en période pré- ou périnatale.

- La transmission sexuelle

Le virus est sexuellement transmissible principalement dans le sens homme-femme.

- La transfusion de cellules sanguines.

Environ 50% des sujets séronégatifs qui reçoivent du sang HTLV-1 positif deviennent positifs, mais contrairement à ce qui a été observé dans le cas des produits sanguins contaminés par le virus HIV, les produits sanguins acellulaires contaminés par HTLV-1 sont non infectieux. La transmission d'HTLV-1 nécessite donc la présence de cellules infectées(102,103).

Les facteurs de risque de développement d'un ATLL, chez un sujet infecté, ainsi que les déterminants de la progression de la maladie restent très mal connus. Il pourrait s'agir de facteurs viraux, de l'hôte et/ou environnementaux(104).

I.2.3 Diagnostic clinique et stadification

I.2.3.1 Diagnostic clinique

D'un point de vue clinique, Le diagnostic repose sur l'association d'une sérologie HTLV-1 positive en western-blot avec une prolifération lymphoïde T CD4 + activée ayant un aspect cytologique parfois typique de « cellules en trèfle ». Le diagnostic doit, surtout dans les formes atypiques, être complété par la recherche de l'intégration monoclonale du provirus par Southern Blot. Il n'y a pas un dépistage défini pour cette maladie qui survient en général après une longue période de latence a peut près de 20 à 40 ans(92). Cependant, l'hybridation in situ permet de détecter l'expression virale, du fait du faible niveau d'expression in vivo cette technique longue, chère et difficile à mettre en œuvre, nécessite un laboratoire spécialisé.

Le diagnostic d'une infection à HTLV repose donc, en routine, sur le dépistage des anticorps par Elisa suivi d'une confirmation par Western blot. Dans le cas où le Western blot donne un résultat indéterminé, ou si l'on n'est pas parvenu à typer le virus, on a recours à la PCR. L'amplification génique ou PCR est la technique la plus utilisée. Elle peut être réalisée à partir d'ADN extrait de lymphocytes ou de concentré leucocytaire du sang périphérique ou de biopsie ganglionnaire ou cutanée. Pour le diagnostic, les séquences à amplifier doivent se situer dans des zones conservées du génome (exemple : Tax)(105,106).

I.2.3.2 Stadification du lymphome non Hodgkinien

Sur la base des résultats des différents examens, les médecins peuvent déterminer le stade de la maladie. Traditionnellement, quatre stades sont distingués(107):

1. Stade I : la maladie est limitée à un seul territoire ganglionnaire, par exemple les ganglions lymphatiques du cou, ou à un seul organe.

2. Stade II : la maladie se limite à plusieurs territoires ganglionnaires situés du même côté du diaphragme, ou à un seul organe et à un ou plusieurs territoires ganglionnaires situés du même côté du diaphragme.
3. Stade III : la maladie atteint des territoires ganglionnaires situés de part et d'autre du diaphragme, et parfois également la rate et/ou un autre organe.
4. Stade IV : au départ du tissu lymphatique, la maladie s'est disséminée à d'autres organes comme les poumons, le foie, la moelle osseuse ou la peau.

Si le patient ne présente pas de symptômes généraux, la lettre A est ajoutée au stade. La lettre B signifie qu'un ou plusieurs symptômes généraux sont présents, à savoir :

- ✓ alternance de périodes de fièvre et de température normale
- ✓ perte de poids et manque d'appétit
- ✓ forte fatigue sans raison apparente
- ✓ transpiration abondante, surtout la nuit.

I.2.4 Traitements

Les lymphomes non hodgkiniens (LNH) font partie des maladies que l'on soigne bien avec les traitements actuels tels que la chimiothérapie, la radiothérapie, l'immunothérapie et la greffe de cellules souches (GSH), utilisés seuls ou en association. Une autogreffe ou greffe autologue ou, exceptionnellement, une allogreffe ou greffe allogénique de cellules souches est parfois nécessaire. Sauf cas exceptionnel, la chirurgie intervient uniquement au moment du diagnostic du LNH.

La réponse aux traitements des différents LNH dépend du type et du stade de la maladie, ainsi que d'un certain nombre d'autres facteurs tels que l'âge, l'état général de santé et des paramètres sanguins.

À l'heure actuelle, le traitement de référence des lymphomes non hodgkiniens repose sur une immunochemiothérapie, c'est-à-dire l'association d'une chimiothérapie et d'une immunothérapie par anticorps monoclonaux.

I.2.4.1 Les chimiothérapies conventionnelles

Les médicaments employés, les doses administrées ainsi que les horaires suivis varient d'une personne à l'autre. La chimiothérapie est habituellement administrée par cycles. Le nombre de cycles et l'intervalle entre chacun dépendent du type de

LNH, de son stade et de son grade ainsi que des types d'agents chimiothérapeutiques employés(108–111).

Les agents chimiothérapeutiques qu'on administre dépendent du type de LNH, de son stade et de son grade.

On a habituellement recours à un seul agent chimiothérapeutique pour traiter un LNH d'évolution lente (indolent). Les associations d'agents chimiothérapeutiques habituellement utilisées pour traiter le LNH sont illustrées dans le tableau 5.

Association	Agents chimiothérapeutiques	Classification pharmacologique
CHOP	Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine, Prednisone	Agent alkylant, Anthracycline, Antitubuline, Glucocorticoïde
CVP	Cyclophosphamide, Vincristine, Prednisone	Agent alkylant, Antitubuline, Glucocorticoïde
FND	Fludarabine, Mitoxantrone Dexaméthasone	Antimétabolite, Anthracycline, Glucocorticoïde
MACOP-B	Méthotrexate, Doxorubicine, Cyclophosphamide, Vincristine, Bléomycine, Prednisone	Antifolate, Anthracycline, Agent alkylant, Antitubuline, Agent scindant, Glucocorticoïde

Tableau 5 : Différents types d'association en chimiothérapie pour le traitement du lymphome(108–111).

On administre habituellement les protocoles CHOP et CVP pendant 6 à 8 cycles, selon le stade du lymphome et sa réponse au traitement. En général, on administre un cycle tous les 21 jours.

1.2.4.2 Thérapie biologique

La thérapie biologique comporte plusieurs types de traitements dont les anticorps monoclonaux(107) :

a. Le rituximab est un anticorps monoclonal anti-CD20 qui se lie spécifiquement par son fragment Fab à l'antigène CD20, phosphoprotéine non glycosylée transmembranaire, présent à la surface des lymphocytes B normaux et malins mais non sur les précurseurs des lymphocytes B ni sur les cellules présentatrices de l'antigène. La fixation du rituximab à l'antigène CD20 provoque des modifications intracellulaires, l'activation du complément et la prise de la cellule B comme cible par les macrophages et les lymphocytes T tueurs (phénomène ADCC : antibody dependent cell-mediated cytotoxicity). De plus, le rituximab sensibilise les

lymphocytes B aux médicaments cytotoxiques. Le rituximab est le médicament biologique le plus utilisé dans le traitement des lymphomes non Hodgkiniens à cellules B. Il peut être ajouté à des associations chimiothérapeutiques, comme les protocoles CHOP (CHOP-R, ou R-CHOP) et CVP (CVP-R, ou R-CVP), ou à des médicaments administrés seuls comme la fludarabine (fludarabine-R).

b. L'ibritumomab tiuxétan (Zevalin®) est une forme plus récente de médicament biologique qu'on pourrait employer pour traiter certains types de LNH à cellules B. Il s'agit d'un mélange d'anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène CD20 des lymphocytes B, l'ibritumomab, et d'un chélateur tiuxétan lié par une liaison covalente à l'ibritumomab. Le tiuxétan peut fixer un atome d'yttrium ou d'indium, stable ou radioactif. Dans le Zevalin® l'atome chélaté par le tiuxétan est l'yttrium radioactif Y-90, émetteur de rayonnements bêta dont la demi-vie est de 64 heures. Le trajet du rayonnement bêta responsable de l'activité et de la toxicité est de l'ordre de 5 mm. Le rôle de l'anticorps est de concentrer l'yttrium radioactif autour des lymphocytes B empêchant ainsi sa diffusion dans l'ensemble des tissus de l'organisme. L'ibritumomab tiuxétan, considéré comme une radiothérapie ciblée est utilisé dans le traitement des lymphomes non hodgkiniens à cellules B, CD20 positives. Ses effets indésirables résultent de la présence de l'anticorps et de la radioactivité qui peut provoquer des tumeurs malignes secondaires. Il est administré après une cure préalable par le rituximab.

I.3 Chapitre 3: la problématique de résistance du mélanome et du lymphome ATL aux chimiothérapies classiques

I.3.1 Généralités sur les mécanismes de résistance

La résistance des cellules tumorales aux chimiothérapies est considérée comme la principale cause de l'échec du traitement dans la plupart des cancers. Deux types de résistance à la chimiothérapie sont décrits :

- La résistance intrinsèque (ou innée) survient d'emblée lors de l'administration des premières séances de chimiothérapie, sans phase de sensibilité initiale. De nombreuses tumeurs sont ainsi d'emblée résistantes. Le mélanome est l'une des tumeurs les plus résistantes. La résistance primaire du mélanome est principalement due à une faible sensibilité à l'apoptose(112).
- La chimiorésistance acquise survient après une phase initiale de chimio-sensibilité. Elle est responsable d'une progression de la maladie. C'est le cas de nombreuses tumeurs solides comme les cancers du sein et de l'ovaire, et avant tout du mélanome. La résistance acquise du mélanome peut être reliée à sa grande plasticité (113), et à l'hétérogénéité tumorale(114).

Les processus biologiques provoquant ces résistances sont très variés. Le premier grand mécanisme intervient au niveau du transport du produit jusqu'aux cellules cancéreuses. Parmi ces mécanismes, on retrouve l'influence du micro environnement avec notamment la vascularisation, la diffusion et l'hypoxie. On retrouve également la pharmacocinétique avec la métabolisation et l'élimination des substances ainsi que la faible activation métabolique dans le cas de pro-drogues. Enfin, le profilage génétique des cancers, de plus en plus systématique lors du diagnostic ou lors d'essais cliniques, a permis de mieux cerner les mécanismes à l'origine des résistances aux agents anticancéreux (115–117).

I.3.2 Chimiorésistances du mélanome : Mécanismes moléculaires et cellulaires

Les sous parties suivants décrivent les mécanismes cellulaires et moléculaires principalement responsables de la résistance (primaire et acquise) du mélanome aux chimiothérapies.

1.3.2.1 L'altération de la sensibilité à l'apoptose

La plupart des chimiothérapies ont pour objectif ultime la mort des cellules cancéreuses par apoptose. Cependant, le mélanome, qui dérive des mélanocytes, est réfractaire à l'apoptose. Cette propriété vient de la biologie des mélanocytes. Les mélanocytes sont naturellement plus résistants à l'apoptose et supportent sans atteinte majeure les dommages générés par les rayonnements ultraviolets pour pouvoir assurer leur rôle protecteur de la peau (synthèse de mélanine). Le mélanome possède ainsi des spécificités de résistance propres à la biologie des mélanocytes. Ainsi la voie de la mélanogenèse apparaît progressivement dans la littérature comme un mécanisme possible de résistance à la chimiothérapie (118,119).

Ce manque de sensibilité à l'apoptose semble principalement lié à la surexpression des protéines anti-apoptotiques BCL-2, MCL-1 et BCL-XL (120,121) et à la sous-expression des protéines pro-apoptotiques BAX et BAK(122) (figure 15). L'endothelin-1 et les mélanocortines ont également été impliquées comme facteurs de survie(123). Cette particularité est retrouvée dans le mélanome et sa résistance à l'apoptose est ainsi beaucoup plus importante que dans d'autres types de cancers (124).

De plus de nombreuses voies de signalisations mutées dans le mélanome interviennent en faveur d'une diminution de l'apoptose. Ainsi BRAF qui, comme vu précédemment est très fréquemment suractivé dans le mélanome, interagit directement avec la famille BCL-2 et conduit ainsi à une survie augmentée. De même ERK inhibe les protéines pro-apoptotiques BIM et BAD, inhibiteurs de BCL-XL (figure 15). Le rôle d'AKT est un peu plus controversé car il peut favoriser des réponses pro ou anti-apoptotiques suivant les cas (figure 15).

Enfin, même si les mutations de p53 sont relativement peu fréquentes dans le mélanome comparé à d'autres types de cancers, d'autres effecteurs de la voie de p53 sont déficients. Notamment Apaf-1 est fréquemment réprimé par méthylation dans les mélanomes métastatiques (figure 15)(125,126).

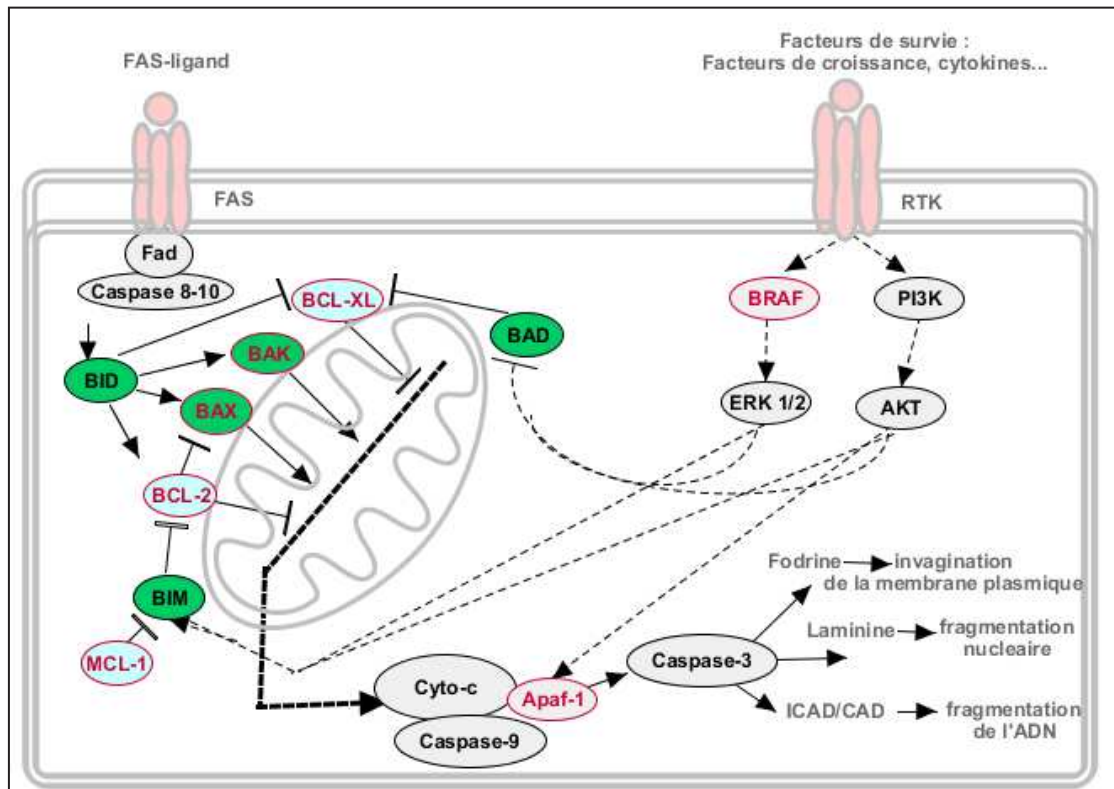


Figure 15 : Les voies apoptotiques qui sont dérégulées dans le mélanome et induisent une chimiorésistance. La finalité de l'action des différents agents anticancéreux est la mort des cellules tumorales par apoptose. Les voies de signalisation contrôlant l'apoptose sont donc largement dérégulées dans le mélanome comme dans d'autres types tumoraux. Le schéma décrit les mécanismes moléculaires de l'apoptose. Les protéines colorées en vert sont des protéines pro-apoptotiques. Les protéines colorées en bleu sont des protéines anti-apoptotiques. Les protéines entourée et écrite en rouge sont dérégulées dans le mélanome.

1.3.2.2 La surexpression de protéines membranaires

Les pompes d'efflux comme la P-Gp entraînent un flux du cytotoxique du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. La concentration intracellulaire du médicament est donc diminuée, réduisant ainsi son efficacité. Le gène codant pour la P-Gp, est amplifié dans la cellule cancéreuse ayant acquis une résistance, aboutissant à la surexpression de cette protéine membranaire. Cette protéine permet l'efflux extracellulaire de composés hydrophobes comme la plupart des chimiothérapies classiques (vinca-alcaloïdes, inhibiteurs de topoiso-mérasés, antimétabolites, etc.), mais aussi des thérapies ciblées (inhibiteurs de tyrosine kinases(127). D'autres pompes d'efflux, tels que les MRP, sont classiquement responsables de phénomène de « multi-drug resistance ».

1.3.2.3 La dérégulation des voies de réparation de l'ADN

Les phénomènes de réparation de l'ADN peuvent être dérégulés aboutissant ainsi à la réduction de la cytotoxicité par réparation accélérée des lésions créées sur l'ADN, grâce notamment à l'amplification de gènes codant pour des protéines de réparation dont le niveau est nettement amplifié. Les voies de réparation de l'ADN sont donc un des mécanismes récurrents dans la résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie, notamment dans le cas du mélanome avec l'usage d'agents alkylants tels que la dacarbazine ou le témozolomide(128,129).

1.3.2.3.1 Voie de la réversion directe par la MGMT

La voie de réparation la plus directe est la réversion des adduits. La MGMT (pour O(6)-methylguanine-DNA methyltransférase) est une enzyme capable de réparer spécifiquement les adduits O6-méthylguanine provoqués par l'action d'agents alkylants comme la dacarbazine ou le temozolomide. *In vitro* sur des lignées résistantes à la fotemustine, une surexpression de la MGMT a été mise en évidence(130,131). Une étude a montré une corrélation inverse entre le niveau d'expression de la MGMT et le taux de réponse clinique tous traitements confondus(132).

1.3.2.3.2 Autres voies de réparation de l'ADN impliquées dans la chimiorésistance

D'autres voies de réparation de l'ADN ont été impliquées dans la résistance de nombreux cancers telle que la voie de réparation par excision de nucléotide (NER pour Nucleotide Excision Repair) notamment dans le cas du cancer du poumon non à petites cellules avec l'implication d'ERCC1 ou encore de la réparation par excision de base (BER pour Base Excision Repair). La voie de réparation des mésappariements (MMR pour MisMatch Repair) a également été mise en cause et associée à la résistance à de nombreux composés. Cependant peu d'études ont été menées sur le mélanome. Plusieurs protéines du MMR dont hMSH2, hMLH1 et hMSH6 ont été trouvées sous-exprimées dans des lignées résistantes de mélanomes à l'étoposide, la vindésine ou le cisplatine(126). Une étude a également montrée une augmentation de la voie du BER dans des lignées résistantes à la fotemustine ou au cisplatine(133). Cette même étude a montré que la voie du MMR était sous-régulée dans ces lignées résistantes.

1.3.2.4 La modification de cible

Chacune des cibles des médicaments anti-cancéreux peut présenter des modifications qualitatives ou quantitatives. Cette cible peut en effet muter, elle n'est

alors plus reconnue par le cytotoxique (modification qualitative). La cible peut également être produite en grande quantité dans la cellule cancéreuse (modification qualitative) en raison d'une amplification du gène codant pour cette cible. Dans le premier cas le médicament ne reconnaît plus sa cible, dans le second cas la quantité de médicament est insuffisante pour entraîner une cytotoxicité significative.

Ce mécanisme de résistance est retrouvé pour les vinca-alcaloïdes. Des modifications qualitatives sur leur cible, la tubuline, au niveau du site de liaison, font que les vinca-alcaloïdes ne reconnaissent plus leur cible.

Un autre exemple de mécanisme de résistance à des agents anti cancéreux traditionnels est la modification quantitative ou qualitative de la topoisomérase II (Topo-II)(134). Des altérations de l'activité de la Topo II (activité augmentée), ainsi que des mutations de cette même enzyme, ont été décrites dans des cas de résistance de MM à la doxorubicine et à l'étoposide(135).

Les résistances aux thérapies ciblées tels que l'imatinib sont principalement la conséquence de mutations de type « gatekeeper » (elles empêchent l'accessibilité de la molécule au site actif) de BCR-ABL ou c-KIT(136). Cependant, les mécanismes de résistance liés à des mutations secondaires de B-RAF semblent peu fréquents dans les mélanomes

1.3.2.5 Le contournement de la cible

Les mécanismes de résistances liés au contournement de la cible sont fréquents dans le cas des thérapies ciblées, notamment pour les inhibiteurs de BRAF ou MEK.

Plusieurs mécanismes potentiels ont été identifiés, incluant une augmentation de l'expression et de la régulation de récepteurs à tyrosine kinase, tels que les récepteurs au PDGF et à l'IGF1, l'apparition de mutations secondaires dans les gènes N-RAS ou MEK ainsi que l'augmentation de l'expression des COT/ MAP3K8. Ces mécanismes de résistance impliquent l'activation des voies MEK/ERK et/ou PI3K/AKT dans les conditions où la cible est inhibée(137–140).

1.3.2.5.1 La dérégulation de la voie MEK/ERK

Certains mécanismes de résistance peuvent s'expliquer par la dérégulation des rétrocontrôles de la voie MEK/ERK. Initialement, cette voie était décrite comme un simple module linéaire déclenchant à partir de RAS-GTP l'activation de C-RAF et, en cascade, l'activation par phosphorylation de différentes kinases jusqu'à la réponse cellulaire. Dans ce modèle simple, les effets des inhibiteurs RAF n'auraient pas dû être distingués de ceux des inhibiteurs de MEK ou de ERK. Cependant, quand des

inhibiteurs de cette voie ont été développés, des effets inattendus ont été observés, suggérant que ces voies étaient bien plus complexes. En effet, il existe des mécanismes permettant de limiter l'activation de la voie, par rétrocontrôle sur RAF lui-même, de MEK et de ERK sur RAF ou de ERK sur le récepteur à l'EGF (figure 9). Ainsi, il n'est pas du tout surprenant que l'inhibition de certains acteurs de la voie MEK/ERK entraîne l'expression de gènes qui étaient soumis à un rétrocontrôle négatif et qui pourraient participer à la résistance au traitement. Nous avons récemment démontré que des inhibiteurs de B-RAF étaient capables de moduler l'expression des protéines de la famille RHO, notamment les protéines RHOE et RHOB dans des lignées de mélanome humain. Ce sont des GTPases de la superfamille RAS qui participent au contrôle de la mobilité et de la survie cellulaire(141). La dérégulation de leur expression dans de nombreux cancers humains est à l'origine de l'acquisition de la résistance à l'apoptose et d'un phénotype invasif. Nous avons mis en évidence que l'inhibition de l'induction de RHOB augmentait la sensibilité au vemurafenib en induisant l'apoptose. Ce travail met en lumière de nouvelles voies de survie cellulaire qui sont activées par les inhibiteurs de B-RAF et ouvre la voie à de nouvelles stratégies d'associations thérapeutiques.

I.3.2.5.2 Les mécanismes indépendants de la voie MEK/ERK

De façon inattendue, certains mélanomes mutés pour B-RAF résistent au vemurafenib malgré l'inhibition quasi-totale de la voie MEK/ERK par des mécanismes qui restent encore à déterminer. Une première hypothèse est liée au passage d'un phénotype « épithelial-like » (les mélanocytes ne sont pas d'origine épithéliale) vers un phénotype mésenchymateux, ou TEM (Transition Epithélio Mésenchymateuse), que les cellules tumorales effectuent pour envahir les tissus et favoriser la survenue de métastases. En effet, la transition vers le phénotype mésenchymateux est associée à l'acquisition de caractéristiques des cellules souches, notamment la résistance aux thérapeutiques antitumorales(142). Une deuxième hypothèse est que le microenvironnement tumoral, par la sécrétion de facteurs solubles, stimule des voies de signalisation capable de compenser l'inhibition de la voie MEK/ERK. Les récents résultats qui montrent que l'HGF sécrété par les fibroblastes activés entourant la tumeur est à l'origine de la résistance au vemurafenib de mélanomes mutés B-RAF, vont dans ce sens(143). Quoiqu'il en soit, ces résultats mettent en lumière l'importance de rechercher les caractéristiques de la tumeur, incluant son environnement tissulaire, pour prédire la réponse thérapeutique.

I.3.2.5.3 Cas du vemurafenib

La réponse au vemurafenib est rapide et spectaculaire mais des rechutes surviennent systématiquement, en moyenne après 6 à 8 mois de traitement,

suggérant l'émergence de mécanismes de résistance secondaire. Ces résistances sont liées à des mécanismes dépendants ou indépendants de la voie MEK/ERK.

Ces rechutes peuvent parfois être tout aussi brutales et spectaculaires que la réponse comme en témoigne l'étude de Wagle et al (144) (figure 16). Après quinze semaines de traitement par vemurafenib, un patient porteur de la mutation BRAF V600E, et présentant initialement de nombreuses métastases sous cutanées et viscérales était presque en rémission complète. Mais après seize semaines traitement, le patient a rechuté, et à vingt-trois semaines la plupart des sites viscéraux et sous cutanés sont à nouveaux envahis. Une des explications de l'apparition de ces lésions est l'activation paradoxale de la voie MEK/ERK qui survient suite à l'inhibition de BRAFV600E. En effet, en présence d'inhibiteur et de RAS activé, B-RAF forme avec C-RAF un hétérodimère qui déclenche l'activation de la voie MEK/ERK à l'origine des pathologies prolifératives (137,138,145).



Figure 16 : Homme de 38 ans atteint de mélanome avec dépôts métastatiques sous-cutanés.(A) avant l'initiation du traitement au vemurafenib, (B) après 15 semaines de traitement et (C), après rechute, après 23 semaines de traitement. D'après Wagle et al(144)

I.3.3 Chimiorésistance de lymphome T

Peu d'études sont rapportées dans le monde sur le traitement de l'ATL par poly-chimiothérapie. Des études réalisées portant toujours sur de petits effectifs, retrouvent toujours une résistance ou une rechute précoce après des poly-chimiothérapies intensives(146). Quelques greffes de moelle ont été réalisées avec une plus grande toxicité de la procédure de la greffe, du fait de l'immunodépression préexistante. Une rechute post-greffe survient parfois très précocement(146). Cette rechute pourrait être favorisée par l'infection précoce des cellules du donneur par le virus.

Plusieurs obstacles altèrent les possibilités de traitement de l'ATL par poly-chimiothérapie et en aggravent le pronostic comme :

1. Les infections opportunistes (fongiques, parasitaires ou virales) souvent retrouvées même aux stades précoces de la maladie(147), surviennent plus fréquemment en cours du traitement, sans doute en raison de l'aggravation du déficit de l'immunité à médiation cellulaire.
2. Une surexpression du gène de résistance aux drogues MDR (*multi drug resistance*) même avant traitement, est souvent observée dans les cellules d'ATL, leur conférant une résistance intrinsèque à la chimiothérapie(148).
3. La dysfonction de la voie TP53 et une activation constitutive du facteur nucléaire kB (NF-kB)(149) qui contribuent au chimiorésistance(150). Des études de réarrangement de gènes ont démontré la persistance de clones de cellules T en circulation chez des survivants maintenus à long terme par la thérapie antivirale. L'expression de c-Rel nucléaire et IRF-4 se produit en l'absence de Tax dans ATLL primaire et est associée à la résistance aux antiviraux(151).
4. Les caractéristiques cliniques des patients avec une hypercalcémie paranéoplasique rebelle, une très forte masse tumorale, des défaillances multiviscérales associées, et en particulier l'insuffisance rénale et l'atteinte hépatique et, enfin, un très mauvais état général, empêchent l'administration de doses intensives de chimiothérapie. D'où la nécessité de nouvelles approches thérapeutiques dans le traitement de cette maladie.

I.4 Chapitre 4 : les nouvelles stratégies thérapeutiques

I.4.1 Le mélanome malin

Pour pallier au problème de résistance (innée et acquise) du mélanome, qui reste un défi thérapeutique, de nombreuses molécules, et/ou nouvelles associations, sont en développement. Actuellement, 141 essais cliniques sont en cours pour le mélanome de grade III et 189 pour le mélanome de grade IV (152).

Les thérapies en cours d'études sont :

- des thérapies ciblées utilisées seules ou en association, dont de nouveaux inhibiteurs de BRAF et MEK, des anti-PI3K (phosphoinositide-3-kinase) et Akt (protéine-kinase B), des inhibiteurs de CDK (kinases cycline-dépendantes),
- des thérapies ciblées pour des populations de mélanome spécifiques,
- des agents anti-angiogéniques,
- des immunothérapies utilisées seules ou en association pour un effet immunomodulateur plus important,
- Des combinaisons d'immunothérapie et de thérapie ciblée,
- injections intralésionnelles (par exemple, les virus oncologiques).

Dans les plus petits sous-ensembles de mélanome, des mutations activatrices peuvent se produire dans NRAS (RAS de neuroblastome virale [v-ras] homologue oncogène) (15% -20%), c-KIT (28% -39% des mélanomes qui se posent dans la peau endommagée par le soleil chronique ou les mélanomes et les muqueuses acrale) et CDK4 (kinase dépendante de la cycline 4) (<5%), alors que GNAQ est fréquemment muté dans le mélanome de la choroïde. Médicaments mis au point pour cibler les voies activées par ces mutations sont actuellement en essais cliniques.

I.4.1.1 Les thérapies ciblées

Le mélanome est une pathologie génétiquement complexe. En développant le séquençage de gènes pour l'analyse de mutations et la recherche d'oncogènes, certaines voies de signalisation cruciales ont pu être identifiées (Figure 17). Cette démarche a permis le développement des premières thérapies ciblées utilisées dans le mélanome. Ainsi, le vemurafenib (2011), et le dabrafenib (2013), ciblent BRAF muté ; le trametinib (2013) inhibe quant à lui MEK.

Le développement de nouvelles thérapies contre le mélanome se fait selon deux axes :

- l'association de thérapies ciblées déjà développées,

- le développement de molécules ciblant de nouvelles cibles.

I.4.1.1.1 Association de thérapies ciblées : inhibiteur de BRAF plus inhibiteur de MEK (vemurafenib plus cobimetinib)

La combinaison de thérapies ciblées est testée dans le double objectif d'augmenter la durée de réponse, et de limiter l'émergence des résistances.

En Janvier 2014, la FDA a accordé une « approbation accélérée » du Dabrafenib plus trametinib en combinaison pour le traitement des patients atteints de mélanomes non résecable ou métastatique porteurs des mutations BRAF V600E ou V600K. Cette même démarche d'association est testée pour le vemurafenib plus cobimetinib dans un essai international de phase III (153).

I.4.1.1.2 Thérapies ciblées en développement

Tous les oncogènes ne sont pas des cibles potentielles mais les enzymes telles que les kinases, les protéases et les phosphatases ont un intérêt majeur car leur site catalytique profond permet une meilleure sélectivité des molécules conçues par drug design(20).

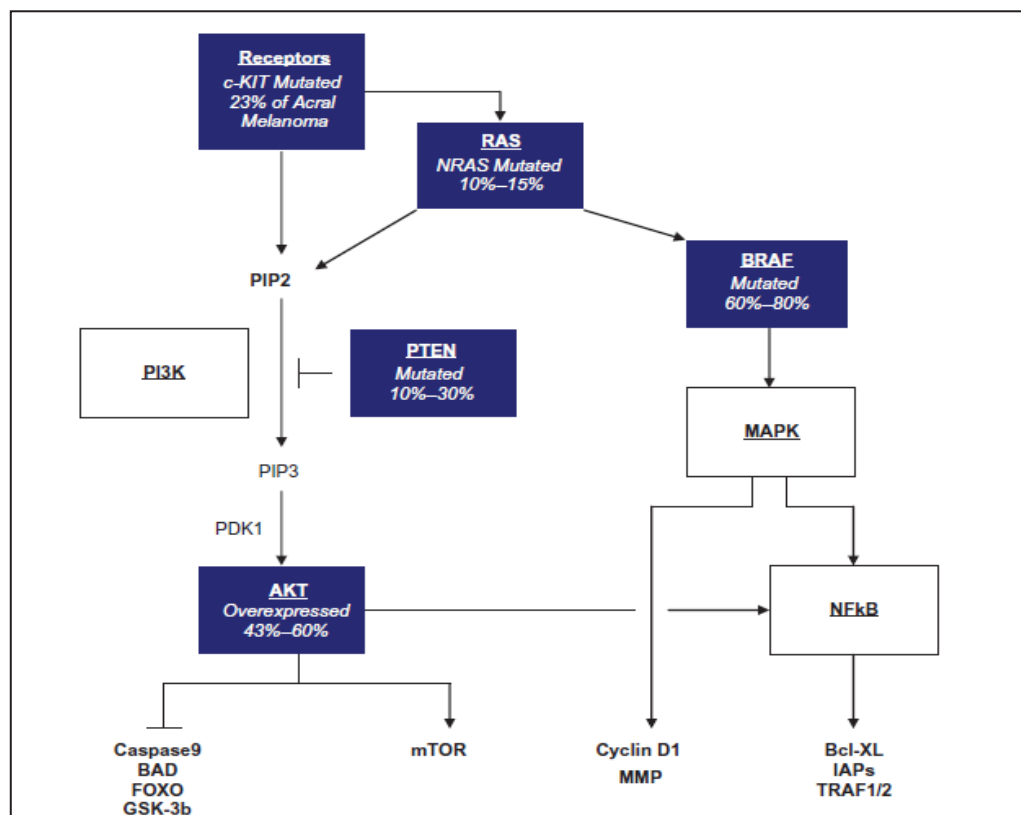


Figure 17: Les voies de signalisation activées dans le mélanome. D'après Algazi et al. 2010(154)

L'étude de Gray-Schopfer et al. de 2007 montre les différentes pistes retenues pour le développement de nouvelles molécules en accord avec les voies de signalisation altérées dans le mélanome (tableau 6) (20) :

- les inhibiteurs de la voie BRAF/MEK/ERK,
- les inhibiteurs de la voie PI3K/Akt/mTOR,
- les inhibiteurs multi-kinases.

Drogue	Fonction	Cible(s)	Phase d'étude
BAY 43-9006 (sorafenib)	Inhibiteur de Kinase	VEGFR, PDGFR, Raf Kinases	II
CHIR-265	Inhibiteur de Kinase	Raf Kinases, VEGFR	I
PD0325901	Inhibiteur de Kinase	MEK	I/II
AZD6244	Inhibiteur de Kinase	MEK	II
Oblimersen	Antisens d'oligonucléotide	BCL-2	III (+ dacarbazine)
SU5416 (semaxanib)	Inhibiteur de Kinase	VEGFR	II
PD0332991	Inhibiteur de Kinase	Cdk4/6	I (neoplasms, non-Hodgkin's lymphoma)
CCI-779 (temsirolimus)	Inhibiteur de m TOR	Voie de signalisation m TOR, PTEN/PI(3)K/AKT	II
RAD001 (everolimus)	Inhibiteur de m TOR	Voie de signalisation m TOR, PTEN/PI(3)K/AKT	I
R115777 (tibifamib)	Inhibiteur de Farnesyl transferase	Ras	Préclinique
PS-341 (bortezomib, velcade)	Inhibiteur de Proteasome	NF-KB	II
BMS-345541	Inhibiteur de Kinase	I κ B	Préclinique
Vitaxin	Anticorps humanisé de α 1, β 3	Integrin α 1 β 3	II
EMD 121974 (cilengitide)	Inhibiteur d'angiogenèse	Integrin	II
17AAG	Inhibiteur de Hsp90	Hsp90	II
ZSTK474	Inhibiteur de PI(3)K	PI(3)K	Préclinique
FLT3, FMS-Like Tyrosine Kinase 3. PDGFR, PDGF receptor. VEGFR, VEGF receptor			

Tableau 6 : Molécules sélectionnées pour la thérapie ciblée anti-mélanome. D'après Gray-Schopfer et al. 2007 (20)

1.4.1.1.2.1 Les inhibiteurs de la voie BRAF/MEK/ERK

La mutation BRAF V600E étant la plus fréquemment retrouvée dans les mélanomes, de nombreux inhibiteurs de la voie BRAF/MEK/ERK sont en développement, seuls ou le plus souvent en association.

Trois inhibiteurs : RXDX-105 (inhibiteur de RET et BRAF) en phase I, PLX8394 en phase I/II, et Encorafenib (LGX818) en phase III qui devrait prochainement être approuvé par la FDA. Des exemples des inhibiteurs de la voie BRAF/MEK/ERK, anti MEK, anti ERK et des associations sont indiqués dans le tableau 7.

Drogue	Fonction	Cible(s)	Phase d'étude
selumetinib	Inhibiteur de kinase	MEK	III (mélanome uvéale) (155)
GDC-0994	Inhibiteur de kinase	ERK	I
Association LGX818 Avec Binimetinib	Inhibiteur de kinase Inhibiteur de kinase	BRAF MEK162	II

Tableau 7 : Exemples des inhibiteurs de la voie BRAF/MEK/ERK

1.4.1.1.2.2 Les inhibiteurs de la voie PI3K/Akt/mTOR

La voie de la PI3Kinase s'avère aussi être un bon candidat pour le traitement du mélanome. Des agents dirigés contre PI3K, PKB ou d'autres effecteurs situés en aval de cette cascade de signalisation comme mTOR ont été développés. Le fait que les voies Ras-ERK et PI3K/PKB contribuent toutes les deux à la survie de la cellule pourrait en partie expliquer la résistance du mélanome aux cytotoxiques classiques ou aux anti-BRAF.

Le GSK2141795, un inhibiteur de Akt, est actuellement en développement associé au Dabrafenib, et au Trametinib dans les mélanomes de grade IIIC-IV (phase I/II), et associé au trametiniben phase II.

1.4.1.1.2.3 Autres thérapies ciblées

Plusieurs essais internationaux tentent de traiter les cancers, dont le mélanome, selon leur(s) altération(s) moléculaire(s) (MPACT par exemple). Les traitements proposés peuvent donc avoir été développés initialement dans un autre cancer que le mélanome. Ce type d'essai permet d'augmenter considérablement le nombre de molécules disponibles.

Par ailleurs, de nombreuses et diverses thérapies ciblées sont en développement spécifiquement dans le mélanome (tableau 8).

Drogue	Cible(s) et fonction	Phase d'étude
Hydroxychloroquine associée au trametinib et dabrafenib	Inhibiteur d'autophagie	II (L'autophagie est souvent responsable de résistance, notamment aux anti-BRAF, dans le mélanome)
Hydroxychloroquine associée au vemurafenib	Inhibiteur d'autophagie	I
AT13387	Inhibiteur de Hsp90	I
Ganetespib (STA-9090)	Inhibiteur de Hsp90	II
AMG 232	Inhibiteur de MDM2	Ib/IIa
Navitoclax associé au dabrafenib et trametinib	Inhibiteur de BCL2	Ib/IIa
BB1608	Inhibiteur de STAT3	I/II
WP1066	Inhibiteur de JAK2	I
panobinostat	Inhibiteur d'histone désacétylase (HDAC)	I (il est le premier inhibiteur d'HDAC qui a reçu l'AMM en 2015 pour le traitement du myélome multiple, et est actuellement en essai de phase I en association à l'ipilimumab dans le traitement du mélanome).

Tableau 8 : Autres thérapies ciblées

1.4.1.1.2.4 Les inhibiteurs multi-kinases

1.4.1.1.2.4.1 Les inhibiteurs de RAF

Bien que BRAF soit la cible préférentielle des drogues dirigées contre les RAF kinases développées dans le mélanome (vemurafenib, dabrafenib, ...), il ne faut pas négliger l'importance de CRAF. En effet, dans certains cas, ce n'est pas BRAF mais CRAF qui active les MEKs suggérant alors que les thérapies anti-RAF non spécifiques seraient de meilleurs agents anti-mélanome que les molécules inhibant spécifiquement BRAF (20).

L'inhibiteur multi-kinase Sorafenib (BAY 43-9006), conçu initialement pour inhiber BRAF et CRAF, semble également bloquer les récepteurs tyrosine-kinase au VEGF et au PDGF. En monothérapie, l'activité anti-mélanome du Sorafenib reste modeste. Actuellement, un essai de phase I étudie l'association Riluzole plus Sorafenib dans le mélanome.

Le TAK-580 (ou MLN 2480), un inhibiteur pan-RAF, est actuellement en essai de phase I.

1.4.1.1.2.4.2 Les inhibiteurs de tyrosine kinase

L'ibrutinib, un inhibiteur de Tec, ErbB4, Hck, Yes, et BTK, approuvé en 2016 pour le traitement de la leucémie lymphoïde chronique par la FDA, est actuellement testé en phase II dans les mélanomes de grade IV réfractaires.

1.4.1.1.2.5 Les thérapies ciblées pour des populations de mélanome spécifiques

Dans les plus petits sous-ensembles de mélanome, des mutations activatrices peuvent se produire dans NRAS (15% -20%), c-KIT (28% -39% des mélanomes sur peau exposée chroniquement au soleil ou des mélanomes muqueux et acral) et CDK4 (<5%), et GNAQ qui est fréquemment muté dans le mélanome de la choroïde. Des molécules mises au point pour cibler les voies activées par ces mutations sont actuellement en essais cliniques.

1.4.1.1.2.5.1 Les inhibiteurs de c-KIT

Les premières données (essais de phase II avec l'imatinib) suggèrent que les mélanomes muqueux ou acral avec mutations activatrices ou amplifications de c-KIT peuvent être sensibles aux inhibiteurs de c-KIT(156–158). Des essais de phase II et III des essais sont en cours pour les patients de stade III non résecable ou de stade IV porteurs d'une mutation c-KIT.

Il n'existe pas de molécules ciblant spécifiquement c-KIT. Les molécules à l'essai (Imatinib, Masatinib et Dasatinib) sont toutes des inhibiteurs multi-kinases qui inhibent l'ensemble des récepteurs tyrosine kinase. Ces molécules sont habituellement indiquées dans d'autres pathologies tumorales comme la leucémie lymphoïde chronique ou les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST).

1.4.1.1.2.5.2 Les inhibiteurs de CDK4/6

Le LEE011 (ribociclib) associé à MEK162 est actuellement testé en phase Ib/II.

1.4.1.1.2.6 Les agents anti-angiogéniques.

Les données précliniques suggèrent que l'augmentation de la production du facteur de croissance endothéliale vasculaire peut être impliquée dans la résistance aux inhibiteurs de BRAF(159). Ainsi, l'axitinib, le pazopanib, et le bevacizumab, principalement utilisés en association à des immunothérapies ou chimiothérapies (paclitaxel), sont en cours de développement (essais de phase II). Le Ziv-afercept et le MEDI3617 (anti-angiopoïétin-2) sont en essai de phase I.

I.4.1.2 Les immunothérapies

Après le succès des anticorps anti-CTLA-4 (ipilimumab, 2011) et des anti-PD-1 (nivolumab, 2014) de nombreuses thérapies immunomodulatrices sont en cours de développement.

I.4.1.2.1 Immunothérapie locale

L'administration locale d'immunomodulateurs a conduit à la régression des métastases cutanées dans plusieurs essais de phases II. L'interleukine-2 intra-lésion a également été administrée en association avec de l'imiquimod (agoniste du Toll-like récepteur 7) donnant une régression complète dans 40,7% des lésions traitées (160).

I.4.1.2.2 Anticorps Immunomodulants (tableau 9)

Drogue	Cible(s) et fonction	Phase d'étude
tremelimumab	Anti-CTLA-4	III
durvalumab, l'atezolizumab et le MPDL3280A	Anti- PD-1L	I (en association soit avec des anti-CTLA4, soit avec des anti-BRAF/MEK)
PDR001	Anti-PD-L1 et PD-L2	I/II
ipilimumab plus nivolumab	Association d'anti PD-1 et d'anti-CTLA-4	III (Les lymphocytes T co-exprimant plusieurs récepteurs, il pourrait être intéressant de les inhiber de façon concomitante)

Tableau 9 : Anticorps anti-CTLA-4, anti-PD1 et ses associations.

I.4.1.2.3 Les Cytokines immuno-stimulatrices

L'Interleukine 2 est une cytokine capable de stimuler le système immunitaire. Les fortes doses d'IL2 ont été approuvées aux Etats-Unis pour le traitement du mélanome (161), mais pas en France. Elle est actuellement à l'essai (phase II) en association avec l'ipilimumab. De fortes doses d'interféron Alfa-2b, en association à l'ipilimumab, sont en essai de phase III. L'IL15 est en essai de phase I.

I.4.1.2.4 Les autres immunomodulateurs (tableau 10)

Drogue	Cible(s) et fonction	Phase d'étude
Omaveloxolone (RTA 408)	immunomodulateur agirait directement par un effet sur NF-kappa B dans les cellules tumorales	I/II (Il lèverait l'inhibition du système immunitaire vis-à-vis du mélanome)
Varlilumab	Anti-CD27	I/II
BMS-986016	Anti-LAG-3	I/II
APX005M (l'anticorps monoclonal)	Agoniste CD40	Cet anticorps est actuellement étudié en association avec des anticorps bloquant la molécule

		CTLA-4 (162) (CD40 molécule à la surface des cellules CD8)
MGN1703	Agoniste TLR9	I

Tableau 10 : Autres immunomodulateurs.

I.4.1.2.5 Le transfert adoptif de cellules T et de cellules dendritiques:

Un essai de phase II étudie le transfert de cellules T autologues (CD8+) en association avec le cyclophosphamide, l'aldesleukine, et l'ipilimumab dans le traitement de patients atteints de mélanome métastatique. D'autres essais sont en cours.

I.4.1.2.6 Les Vaccins

Plusieurs essais étudient la faisabilité d'une vaccination anti-mélanome. Ce sont par exemple des vaccins fabriqués à partir de cellules et de protéines tumorales d'un patient dans le but de développer une réponse immunitaire efficace pour tuer les cellules tumorales (phase I). Un autre essai test un vaccin développé à partir de Coxsackievirus A21 (injection intratumoral, CAVATAK™) associé à l'ipilimumab.

I.4.1.2.7 La Bio-chimiothérapie

La biochimiothérapie est une immunothérapie utilisée en association avec la chimiothérapie. De nombreux essais cliniques évaluent actuellement ce type d'association :

- Dabrafenib et Trametinib suivi par Ipilimumab et Nivolumab ou Ipilimumab et Nivolumab suivi par Dabrafenib et Trametinib (phase III),
- Nivolumab plus Ipilimumab suivi par Nivolumab en monothérapie (phase II),
- Nivolumab plus Ipilimumab (phase III)

I.4.2 Le lymphome T de l'adulte

Parmi les traitements alternatifs à la chimiothérapie récemment publiés, plusieurs approches donnent des résultats intéressants et ont été utilisés. Ainsi, parce que la leucémie à cellules T de l'adulte / lymphome est une maladie rare, donc pour trouver suffisamment de patients pour les essais cliniques s'avère difficile. Toutefois, plusieurs nouveaux médicaments en essais cliniques pour d'autres lymphomes T sont en train de devenir traitements potentiels pour ATLL.

I.4.2.1 Transplantation allogénique de cellules souches

Comme la plupart des patients la rechute après chimiothérapie conventionnelle, la transplantation allogénique de cellules souches « alloSCT » semble être une option attrayante en tant que traitement de consolidation. La plupart des rapports viennent

du Japon. Un certain nombre d'études rétrospectives ont confirmé qu'« alloSCT » utilise soit un conditionnement myéloablatif (MAC) ou un conditionnement d'intensité réduite (RIC) comme une option de traitement possible pour les patients atteints d'ATL. La plus grande étude rétrospective a été rapportée récemment(163). Cette étude inclut 386 patients allogreffés entre 1995 et 2005. Après un suivi médian de 41 mois, la survie globale était de 33%(164). Cependant, le nombre de patients atteints d'ATL admissibles à alloSCT est très limitée en raison de faible taux de RC en particulier dans la forme aiguë, l'état de mauvaise performance, sévère immunosuppression, à l'âge du malade (âge médian de survenue: 60 ans), et une faible probabilité de trouver des donneurs compatibles chez des patients issus d'une minorité ethniques.

1.4.2.2 Interféron alpha et (Zidovudine) AZT

Même si cette association de traitement est souvent appelée à "un traitement antiviral", son mécanisme d'action n'est pas entièrement encore compris. La combinaison de la zidovudine (AZT) et l'interféron alpha (IFN) a été signalé en premier dans 2 études de phase II(165–167). Le taux de réponse élevé a été observé en particulier dans ATL aiguë non préalablement traitées. L'efficacité de cette combinaison a été confirmée dans un essai français en utilisant l'AZT / IFN chez 19 patients nouvellement diagnostiqués d'ATL, et dans un essai clinique au Royaume-Uni en utilisant l'AZT / IFN chez 15 patients ATL(168,169). Dans une récente étude prospective de phase II aux Etats-Unis, 19 patients ATL ont reçu la chimiothérapie en perfusion (EPOCH régime) jusqu'à avoir une réponse maximale, suivie par un traitement antiviral au quotidien (AZT, la lamivudine et l'IFN). Toutefois, en raison de la progression de la maladie, seulement 6 patients ont reçu un traitement antiviral(170).

Les résultats de la méta-analyse internationale indiquent que le traitement antiviral (AZT et IFN) seul en première ligne est moins efficace que la chimiothérapie de première ligne dans les formes lymphomateuses(171).

Enfin l'addition de l'AZT et de l'IFN, ou d'autres nouveaux traitements, tels que les inhibiteurs de HDAC, à la chimiothérapie pourrait améliorer le taux de rémission et la survie des patients(164,172,173).

1.4.2.3 Les inhibiteurs des histones deacétylases (vorinostat, romidepsine)

Les inhibiteurs des histones deacétylases (HDAC) sont une nouvelle classe de composés destinés à agir au niveau transcriptionnel en interférant avec la modification épigénétique de la chromatine et la desacétylation des histones. Ils peuvent également augmenter l'acétylation d'autres protéines, telles que les

facteurs de transcription nucléaires et cette dernière fonction assure la majorité de leur activité antitumorale.

Deux inhibiteurs d'HDAC (vorinostat et romidepsine) sont approuvés par la FDA pour le traitement des lymphomes T cutanés récidivants et réfractaires. Le taux de réponse est d'environ 30 % (30 % pour le vorinostat et 34 % pour la romidepsine) (174,175). A notre connaissance, ces médicaments n'ont pas encore été évalués dans l'ATL, soit en monothérapie soit en association avec d'autres médicaments pendant le traitement d'induction.

Cependant, une étude récente a utilisé l'association de l'AZT, de l'IFN et de l'acide valproïque (un autre inhibiteur de HDAC) comme traitement d'entretien chez 13 patients atteints d'ATL(176). Un patient avait une réponse positive (diminution de la maladie ATL clonale par PCR). Les cellules fraîches de ce patient ont été traitées ex vivo avec le vorinostat, et une augmentation de l'expression d'HTLV-1 et une induction de l'apoptose ont été démontrées. Cependant, l'induction d'une réponse immunitaire contre les cellules infectées par le virus n'a pas été abordée dans cette étude. En effet, les auteurs ont proposé que l'inhibition de l'HDAC pourrait réactiver le virus HTLV-1 latent dans les cellules ATL qui ont intégré un provirus intact, et donc pourrait aider à éliminer la maladie résiduelle(176).

1.4.2.4 Le trioxyde d'arsenic (AsO₃)

Le trioxyde d'arsenic en synergie avec l'IFN a pour but d'induire l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose dans les cellules infectées par HTLV-I et les cellules ATL fraîches à travers l'inhibition de la voie NF-κB comme effet secondaire à la dégradation du Tax par le protéasome(177–179). Bien qu'il ait été démontré que l'arsenic et l'IFN coopèrent pour guérir l'ATL murin dérivé de Tax transgéniques par le biais d'élimination sélective de l'activité des cellules leucémiques initiatrices (LIC). Cela suggère fortement que l'activité de LIC est dépendante de l'expression continue de l'oncogène Tax. Par conséquent, l'addition de l'arsenic à l'AZT / IFN, grâce à l'élimination de l'activité LIC, peut entraîner l'éradication des maladies à long terme et la guérison éventuelle(180). Une étude récente prospective de phase II a évalué l'efficacité et l'innocuité de la combinaison de l'arsenic, l'IFN, et de l'AZT chez 10 patients ATL chronique nouvellement diagnostiquée. Le taux de réponse a été de 100% dont 7 CR, 2 CR, mais avec plus de 5% de circulation des lymphocytes atypiques, et une réponse partiel. Les effets secondaires étaient hématologiques et surtout modérée(179). Bien que ces résultats sont préliminaires, ces observations suggèrent néanmoins que chez les patients ATL arsenic/IFN cible efficacement l'activité LIC d' ATL et peut être utile en tant que traitement de consolidation pour les patients obtenant une réponse satisfaisante au traitement d'induction.

1.4.2.5 Anticorps Monoclonal Spécifique

Les cellules ATL expriment CD25 (chaîne alpha du récepteur IL2). Un premier essai a rapporté l'utilisation d'anticorps anti-CD25 sur 19 patients(181). Des Auteurs ont obtenus 6 réponses (deux CR, quatre PR) qui a duré à partir de 9 semaines à plus de 3 ans(182). Un anticorps monoclonal neutralisant à la transferrine récepteur (mAb A24) a été conçu et induit l'apoptose des lignées cellulaires ATLL et des cellules primaire ATL(183).

1.4.2.6 Anti-CC Chemokine Receptor 4 (CCR4)

Cellules ATL expriment le récepteur des chimiokines CC 4 (CCR4). KW-0761 est un anticorps humanisé défucosylé qui se lie à CCR4. Une étude de phase I rapporte 13 patients présentant CCR4 aboutit à un rechute de ATL après traitement avec KW-0761. Le taux global de réponse était de 31%: 2 RC et 2 rémission partielle (RP) (183). Les effets indésirables étaient d'intensité légère à modérer.

1.4.2.7 Agents efficaces sur ATL hors l'infection par HTLV-1

Actuellement, il n'est pas encore clair la lymphoprolifération des cellules T associée à l'infection HTLV-1 qui est, en ce qui concerne les mécanismes oncogéniques, différente des autres lymphomes à cellules T et peuvent bénéficier de médicaments approuvés dans le traitement de lymphome T. A noter, le bénéfice potentiel de cinq agents actuellement développés dans le traitement des lymphomes T:

- Les agents ayant un effet potentiel cytotoxique (Pralatrexate et Bendamustine) ;
- Les immunothérapies ciblées les cellules T (Alemtuzumab) ;
- Les agents en interaction avec les grandes voies de signalisation cellulaire et / ou avec l'homéostasie virale (inhibiteurs d'histones déacétylase, Lénalidomide)(174,175,184–188).

Nous avons vu dans les paragraphes précédents que de nombreuses molécules ciblées sont en cours de test et/ou d'amélioration soit pour le mélanome ou pour le lymphome T. Néanmoins, les molécules qui obtiennent une autorisation de mise sur le marché sont peu nombreuses, ainsi des autres ont montré des rechutes. Dans la perspective de l'élaboration de thérapies combinatoires, il est donc important d'identifier de nouvelles molécules candidates. Les composés nouvellement synthétisés peuvent présenter des effets bénéfiques pour la santé humaine. Ainsi face à la faible efficacité d'une grande majorité d'anticancéreux classiques dans le traitement de cancers tels que la prostate, le colon, le sein, le mélanome, et encore le lymphome, les recherches s'orientent vers de nouvelles stratégies thérapeutiques. En effet, réussir à contourner les problèmes de résistances et de métastases, rencontrés de plus en plus souvent dans ce type de maladie, représente un défi important pour la recherche. La présente invention concerne des composés imidazo[1,2-a]quinoxaline pour le traitement des cancers ainsi que les compositions pharmaceutiques comprenant ces composés et leurs utilisations en thérapie. L'invention a également pour objet l'utilisation de composés dérivés d'imidazo[1,2-a]quinoxaline pour la préparation de médicaments pour le traitement des cancers et en particulier pour le traitement des mélanomes et des lymphomes à cellules T.

I.4.3 Les Imidazoquinoxalines : une nouvelle classe de composés à activité anticancéreuse

I.4.3.1 Généralités

Depuis plusieurs années, les imidazoquinoxalines constituent une nouvelle série de composés, particulièrement prometteuse en chimiothérapie anticancéreuse du mélanome et des lymphomes T. Ces dérivés imidazoquinoxaliniques et pyrazoloquinoxalines (figure 18) sont synthétisés par le laboratoire de chimie organique de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Montpellier 1 (UM1) et des études ont montré l'efficacité de la série des composés imidazo[1,2-*a*]quinoxaline par rapport aux autres. Le rationnel de développement établi en collaboration avec le Centre Régional de Lutte contre le Cancer (CRLC, Montpellier) et l'Université Américaine de Beyrouth (AUB, Liban) consiste dans le développement d'une nouvelle série de molécules présentant à la fois des activités fortes et complémentaires en tant qu'agents pro-apoptotiques et anti-inflammatoires (189–191).

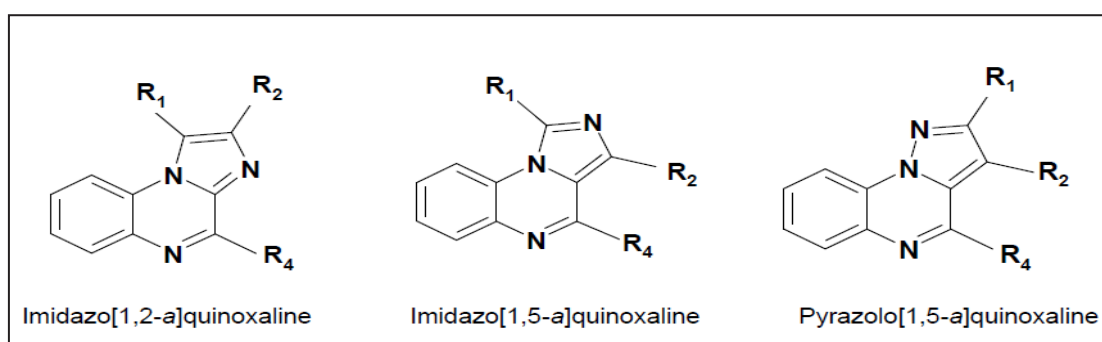


Figure 18: les trois séries chimiques développées

Les résultats particulièrement encourageants obtenus dans la phase initiale de développement des Imiquialines qui ont été valorisés dans un certain nombre de publications internationales (synthèse chimique, activité in vitro et in vivo, pharmacocinétique) et une série de brevets nationaux, européens et internationaux (tableau 7) déposés conjointement par les trois partenaires UM1, CRLC, et AUB. Notre équipe s'intéresse donc à la recherche de nouveaux dérivés imidazo[1,2-*a*]quinoxalines dans le domaine du cancer avec un nombre conséquent de publications et peu d'équipes concurrentes travaillant sur cette série chimique dans le domaine du cancer, comme la montre la figure 19.

Auteurs	Titre	Numéro de brevet	Nature de brevet
Deleuze-Masquefa, C., G. Moarbess, P.-A. Bonnet, F. PINGUET, and A. BAZARBACHI	Imidazo[1,2-a]quinoxalines et dérivés pour le traitement des cancers	dépôt 07066928 3/octobre 2007	dépôt national
Deleuze-Masquefa, C., G. Moarbess, P.-A. Bonnet, F. PINGUET, A. BAZARBACHI and F. BRESSOLLE	Imidazo[1,2-a]Quinoxalines et dérivés pour le traitement des cancers	PCT/EP2008/063290 3 octobre 2008	international
Deleuze-Masquefa, C., G. Moarbess, P.-A. Bonnet, F. PINGUET, A. BAZARBACHI and F. BRESSOLLE	Imidazo[1,2-a]Quinoxalines et dérivés pour le traitement des cancers	suite au dépôt de PCT 3 avril 2010	Passage en phases nationales et régionales (Europe, Etats-Unis, Canada, Japon)

Tableau 11 : Les différents brevets acquis national et international pour l'imidazo[1,2-a]quinoxaline.

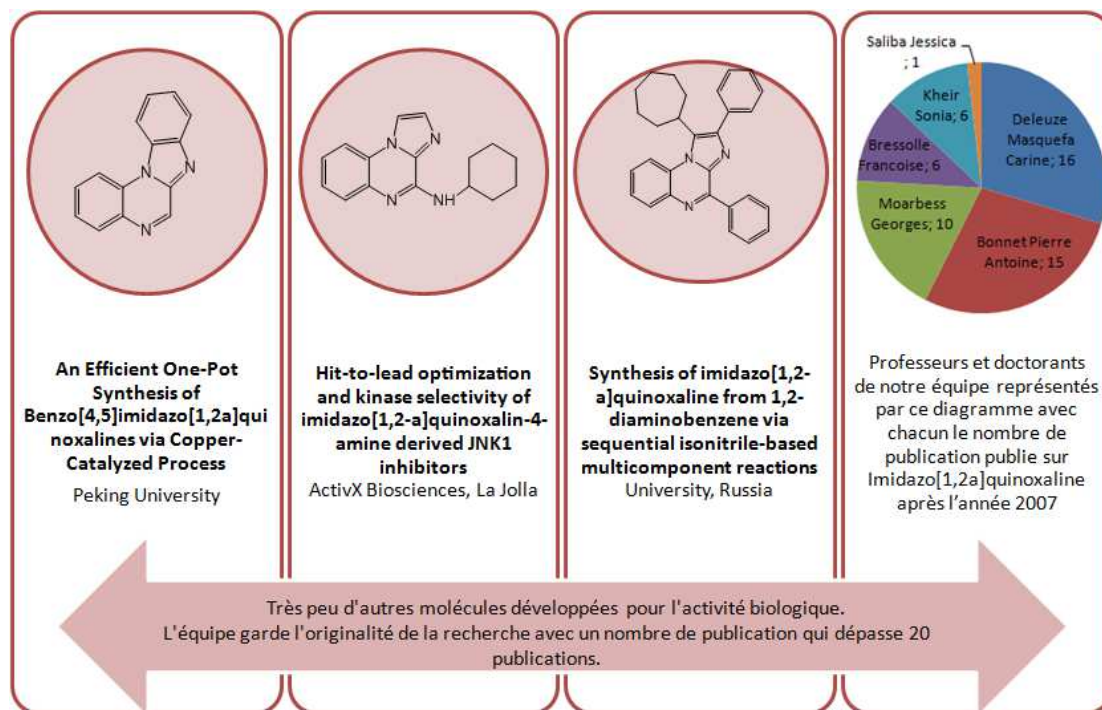


Figure 19 : Recherche des résumés des publications concernant les imidazo[1,2-a]quinoxalines dans les 10 dernières années d'après pubmed(192–194) . La dernière colonne correspond aux publications de notre équipe, elles représentent 50% du nombre total des publications concernant la série imidazo[1,2-a]quinoxaline.

Les imidazoquinoxalines, molécules tricycliques azotées, analogues structuraux de l'imiquimod, sont susceptibles de posséder un mode d'action innovant, par analogie avec l'imiquimod (cytotoxique direct par apoptose associé à un effet sur la stimulation du système immunitaire). Ces composés ont été testés sur différents modèles *in vitro*, notamment pour évaluer leur activité cytotoxique sur différentes lignées cellulaires tumorales, leur effet sur la production de cytokines, leur effet sur un panel de kinases, leur induction de l'apoptose, et leur effet sur les tubulines. De nombreux composés, différemment substitués et appartenant à la série imidazo[1,2-*a*]quinoxaline, ont été synthétisés. Des résultats préliminaires ont également été obtenus dans deux d'autres séries : imidazo[1,5-*a*]quinoxaline et pyrazolo[1,5-*a*]quinoxaline (figure 18). Les méthodes de synthèse ont été optimisées et décrites par notre équipe dans plusieurs publications (195). Une stratégie commune pour les trois séries nous donne la possibilité d'atteindre une grande variété de composés avec des substituants différents.

Les parties qui suivent, « activités antitumorales *in vitro* et *in vivo* » et « pharmacocinétique et toxicité » sont référées aux différents articles (195–199)

1.4.3.2 Activités antitumorales *in vitro* et *in vivo*

Les activités cytotoxiques des composés ont été évaluées *in vitro* (tableau 12), sur des lignées tumorales de mélanome humain, de colon, du sein et de leucémies. Deux molécules leaders appartenant à la série imidazo[1,2-*a*]quinoxaline ont été identifiées, **EAPB0203** et **EAPB0503** (figure 20), et leurs activités d'inhibition sur la croissance cellulaire ont été évaluées sur un panel de 60 lignées tumorales par le National Cancer Institute (NCI).

Tumeur	Mélanome			Sein	Colon					Leucémie chronique Myéloïde (CML)			
	Cell lines	A375	M4Be		RPMI7591	MCF7	LST174T	HCT116	HT29	SW480	T84	K562	LAMA
Dacarbazine	>350	>350	>350										
Fotémustine	173	326	125										
Imiquimod	70	33	53	145									
EAPB0203	1.5	2.5	4.2	1	4.1	0.8	0.3	2.6	0.3	5	3	0.5	
EAPB0503	0.15			0.35	0.01	0.03	0.03	0.08	0.01	1	0.5	0.1	

Tableau 12 : Concentrations inhibitrices 50% (CI₅₀) en μM des molécules leaders et des molécules de référence sur différentes lignées cellulaires issues de plusieurs types de cancer.

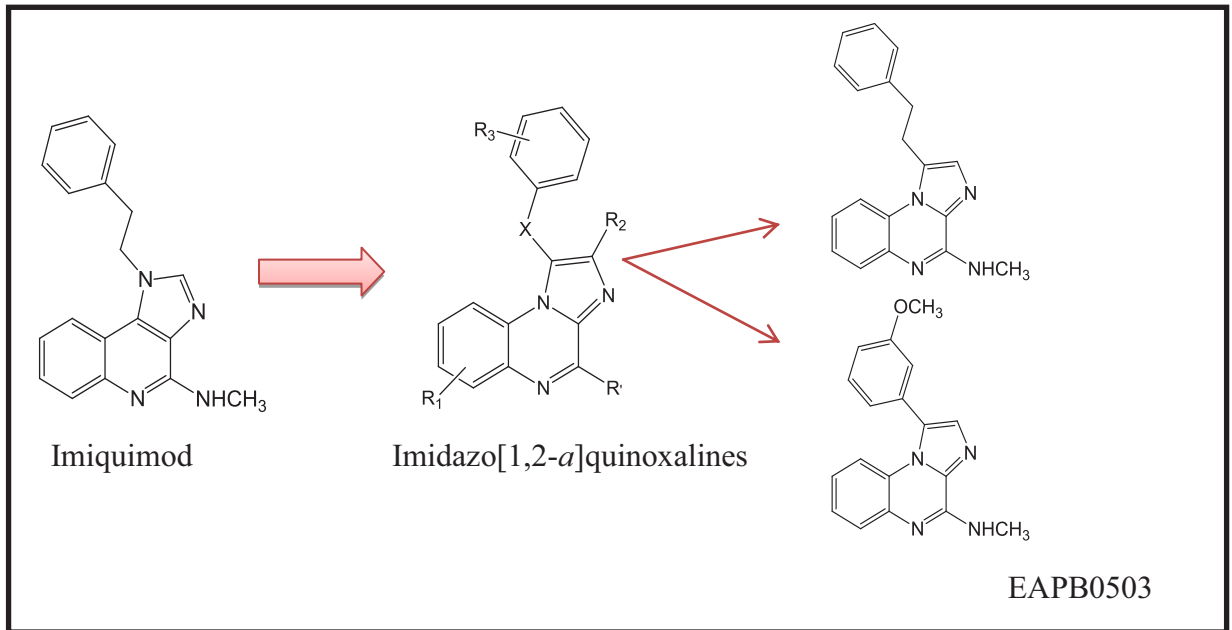


Figure 20 : structure chimique de l'imiquimod, de la série imidazo[1,2-a]quinoxaline et des deux molécules leader **EAPB0503** et **EAPB0203**.

Dans un modèle de xéno greffe chez la souris swiss nude avec des cellules de mélanome M4Be, **EAPB0203** retarde la croissance tumorale dans une plus large mesure que la fotémustine, médicament administré en clinique dans le traitement de mélanome (figure 21).

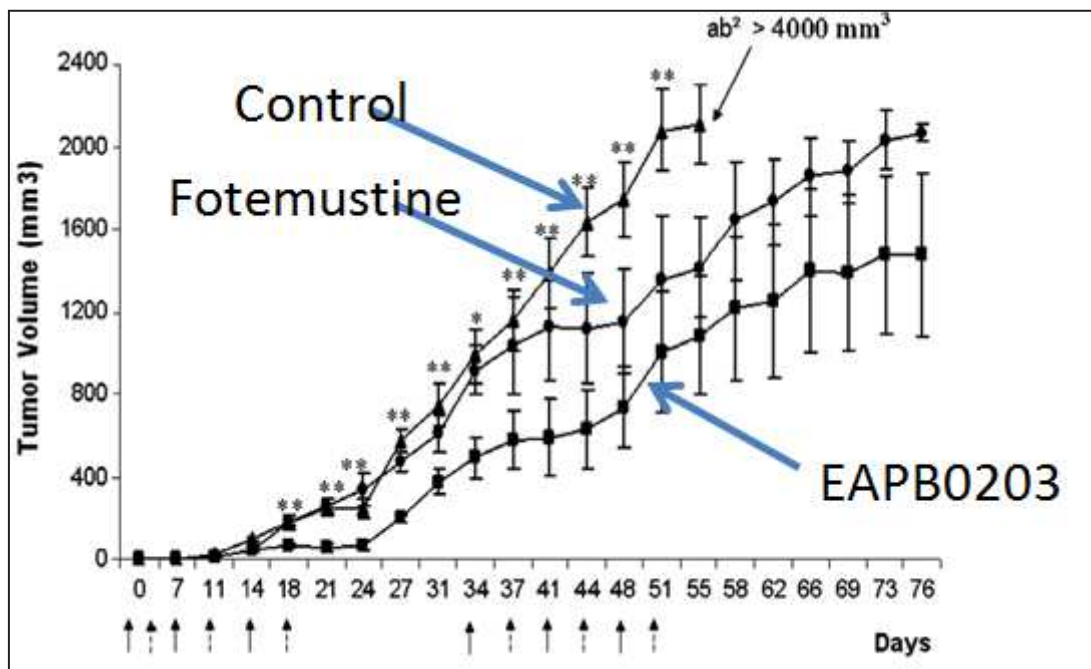


Figure 21: Effet des traitements par **EAPB0203** et fotémustine sur la croissance tumorale.

*Des souris swiss nude ont été xénotransplantées avec des cellules de mélanome M4Be puis traitées par **EAPB0203** 20 mg / kg deux fois par semaine, ou par fotémustine 20 mg / kg une fois par semaine (en raison de la toxicité de la fotémustine).*

1.4.3.3 Pharmacocinétique et toxicité

Les profils pharmacocinétiques de **EAPB0203** et **EAPB0503** ont été étudiés chez le rat après administration intraveineuse unique (3 et 5 mg/kg, respectivement) puis la quantification des composés a été réalisée dans les fluides biologiques. Des métabolites issus de réactions de déméthylation sur les molécules parents ont été quantifiés dans le sang de rat. Ces métabolites présentent des activités cytotoxiques similaires à celles des molécules parents. Le métabolisme implique principalement l'enzyme CYP3A. Les imiqualines sont fortement liées à l'albumine plasmatique. Les principaux paramètres pharmacocinétiques ont été déterminés (clairance, volume de distribution, demi-vie, biodisponibilité par voie intrapéritonéale). Pour la toxicité aiguë, la dose létale 50% (DL₅₀), déterminée après administration intraveineuse chez le rat, est de 15 et 8 mg/kg pour **EAPB0203** et **EAPB0503** respectivement. Des études de toxicité subaiguë ont été réalisées chez le rat après des administrations répétées des composés (**EAPB0203** et **EAPB0503**, 5 et 3 mg/kg respectivement, administrés en iv dans la veine de la queue, une fois par jour pendant 5 jours consécutifs). Pour les deux molécules, le traitement a été bien toléré sans perte de poids ni diminution de consommation de prise de nourriture et d'eau par rapport aux souris témoins. Aucune toxicité hématologique ni décès associés aux traitements n'ont été observés. L'examen anatomo-pathologique des principaux organes (foie, cœur, cerveau, reins) n'a pas révélé d'anomalies.

1.4.3.4 Mécanismes d'action théoriques

Les Imiqualines sont des analogues structuraux de l'imiquimod. L'imiquimod est une molécule tricyclique azotée, de la famille des imidazoquinolines. C'est une molécule à activités antivirale et anticancéreuse dont le mécanisme d'action apparaît être double : direct par apoptose et indirect par stimulation du système immunitaire. (200–203).

I.4.3.4.1 Effets sur les kinases

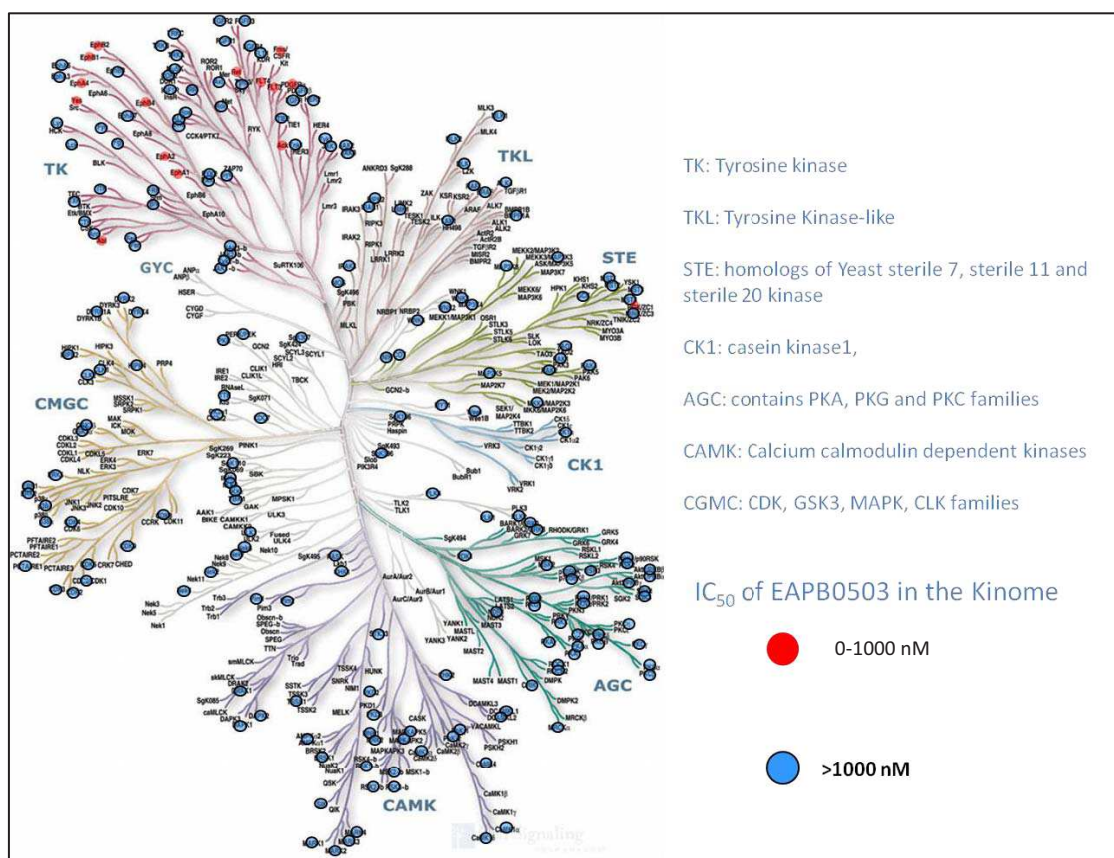


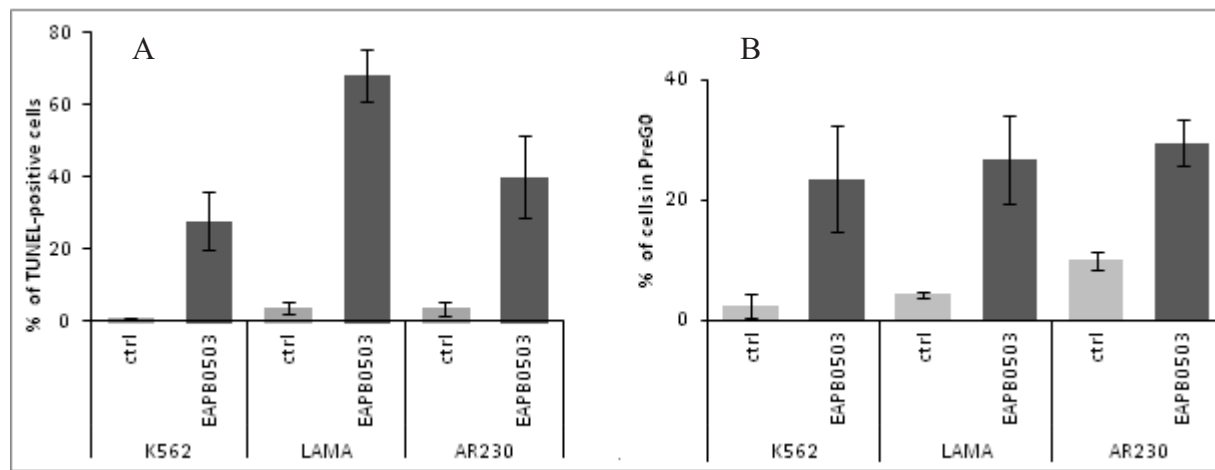
Figure 22: Profil d'inhibition sur un panel de 196 kinases pour **EAPB0203** et **EAPB0503** (Screening CEREP).

EAPB0203 et **EAPB0503** ont testé dans un panel de 196 kinases, et n'ont pas démontré une grande efficacité sur ces kinases. Néanmoins, certaines tyrosines kinases devraient être affectées aux concentrations plus élevée (figure 22).

I.4.3.4.2 Effets sur l'apoptose

Dans les leucémies/lymphome T de l'adulte (ATLL) HTLV-I positives ou négatives, **EAPB0203** inhibe la prolifération cellulaire, induisant l'apoptose avec un arrêt de cycle cellulaire en G2/M alors que les lymphocytes T normaux ne sont pas affectés. Par ailleurs, **EAPB0203** inhibe presque entièrement la croissance des cellules ATL fraîchement isolées à des concentrations de 1 à 10 μ M. Le traitement par **EAPB0203** entraîne une diminution des protéines anti-apoptotiques c-IAP-1 et BCL-XL, et entraîne une perte significative du potentiel de membrane mitochondriale, la libération cytoplasmique du cytochrome c, et une induction apoptotique caspase dépendante (199). Cependant, la cible cellulaire spécifique de **EAPB0203** reste à

identifier. Ainsi les mêmes effets ont été observés avec **EAPB0503** sur des lignées de leucémie myéloïde chronique (CML) (figure 23). **EAPB0503** induit l'apoptose sur les lignées CML en augmentant la population PreG0 (figure 23A) et en augmentant le pourcentage d'ADN fragmenté (figure 23B) (204).



*Figure 23 : **EAPB0503** induit l'apoptose sur les lignées cellulaires CML. (A) Pourcentage des cellules TUNEL-positives des différents lignées cellulaires CML (K562, LAMA, AR230). Les cellules ont été traitées avec **EAPB0503** à la dose de 0.20µM (correspondant à la CI_{50}) et récoltées après 48 ou 72 heures après traitement. (B) La coloration par iodure de propidium (PI) et l'analyse du cycle cellulaire montrent une augmentation du pourcentage de cellules de LMC en PreG0 après traitement avec **EAPB0503** pendant 48 heures (204).*

Dans les cellules de mélanome A375, il a récemment été montré que **EAPB0203** et **EAPB0503** entraînent également un blocage du cycle cellulaire en phase G2/M (données en cours de publication).

I.4.3.4.3 Effets sur les tubulines

EAPB0203 et **EAPB0503** inhibent la polymérisation de tubuline purifiée in vitro (figure 24) et perturbent le réseau de microtubule in cellulo. Les Imiqualines induisent une polymérisation anormale de la tubuline (forme bouclée), différente de celle de la colchicine (figure 25).

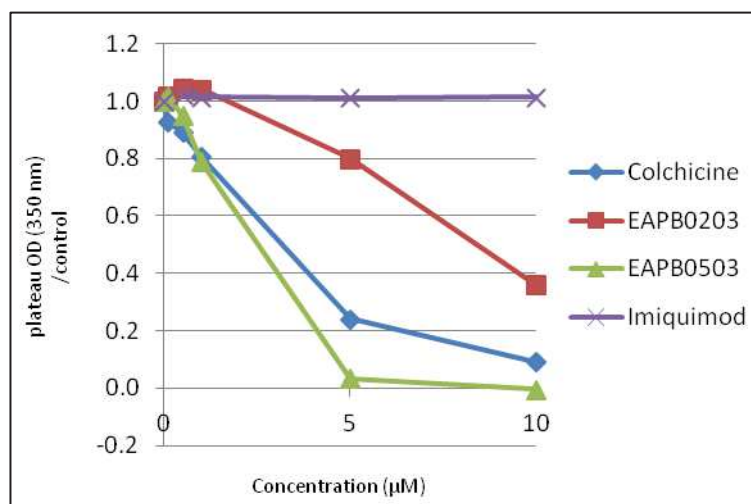


Figure 24 : **EAPB0503** inhibe fortement la polymérisation des tubulines purifiées à des concentrations supérieures ou égales à 5 µM.

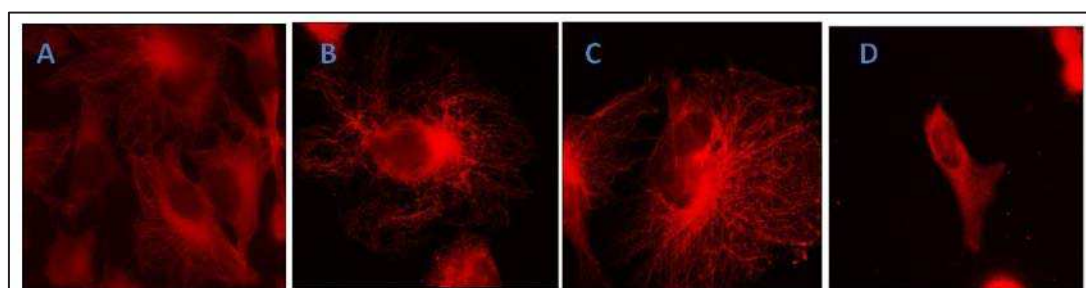


Figure 25: Immunofluorescence sur les cellules A375 à l'aide des anticorps anti-tubuline.

(A) Control (B) **EAPB0203** (3.14 µM) (C) **EAPB0503** (0.20µM) (D) Colchicine 1µM.

Par ailleurs notre équipe a montré que les Imiqualines inhibent les enzymes phosphodiesterases nucléotides cycliques de type 4 (205), entraînant une augmentation du taux d'Adénosine Mono Phosphate cyclique (AMPC) intracellulaire et que ces composés activent la voie p38 MAPK et inhibent la voie PI3K(206).

L'objectif de notre projet est de développer des Imiqualines pour le traitement de différentes formes de cancer, notamment le mélanome et l'ATLL. Les résultats obtenus in vitro et in vivo (efficacité, tolérance, pharmacocinétique) sont prometteurs. Le développement de la diversité chimique, l'optimisation de l'activité anticancéreuse in vitro et in vivo et la détermination des mécanismes d'action directs et/ou indirects sont les objectifs spécifiques de ce projet, l'objectif final étant de pouvoir proposer un candidat pour le développement clinique. La recherche des cibles moléculaires, pour identifier le ou les mécanismes d'action des Imiqualines, a été réalisée par la technique de puce à ADN au cours de cette thèse. C'est l'une des techniques moléculaires à grande échelle qui est expliqué dans le chapitre suivant.

I.5 Chapitre 5 : puces à ADN et analyse du transcriptome

I.5.1 Les technologies haut débit dans l'étude des cellules tumorales

I.5.1.1 Introduction

Depuis la fin des années 1970, où les premiers oncogènes ont été découverts (207,208), les techniques d'analyses en biologie moléculaire ont incroyablement évolué, notamment en matière de préparation, d'identification et séquençage d'ADN, d'ARN et de protéines et de stockage et d'analyse des données.

A partir des années 1990, les techniques dites « haut débit », ont fait leur apparition. Ces technologies permettent de rechercher des variations sur des milliers de gènes simultanément et donc de réaliser des études de génome entier. Une vue globale et intégrée d'un ensemble complet de molécules biologiques impliquées dans des procédés biologiques complexes commence à apparaître. De nouvelles disciplines scientifiques à suffixe «-omique» sont en train de se développer (209). La génomique structurale, la transcriptomique et la protéomique sont suivies par la métabolomique et l'interactomique entre autres, et à un niveau encore plus élevé de complexité, la biologie des systèmes(210). L'étude de la complexité biologique est une nouvelle frontière, qui requiert une technologie moléculaire à haut débit, une vitesse et une mémoire d'ordinateur élevées, de nouvelles approches à l'analyse des données et l'intégration de compétences interdisciplinaires.

Les «omiques» ouvrent l'ère d'un nouveau défi à la génomique, l'ère post génome, et s'inscrivent également comme de nouveaux outils de diagnostics. Ils font de plus, grâce aux informations précieuses qu'ils apportent, naître de grands espoirs pour le criblage de molécules et l'identification de médicaments. L'étude de l'ensemble de ces variations génétiques présente de nombreux intérêts cliniques et constitue la base des projets de recherche en génomique à travers, notamment, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques, l'identification de biomarqueurs moléculaires permettant l'amélioration des méthodes nécessaires au diagnostic, à la prédiction de la réponse thérapeutique ou du pronostic.

En cancérologie l'approche de puce à ADN a permis d'améliorer la classification des tumeurs, d'étudier les voies d'oncogenèse (211–213) , d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de prédire la survie des patients (214–219). Le nouveau défi qui est lancé aux biologistes est maintenant le transfert de ces résultats de recherche en oncologie biomédicale afin d'améliorer la prise en charge des patients atteints de cancer.

L'une de ces nouvelles techniques est la puce à ADN, ou microarray (220,221). Depuis sa création, la puce à ADN a bien évolué, principalement en termes de taille, de résolution et de supports utilisés (membrane de nylon, de verre, de plastique ou de silicium), mais le principe sous-jacent est le même. Cette technologie repose sur le principe de l'hybridation moléculaire décrite par Southern(222,223) qui est à la base du southern blot. Les sondes, choisies pour être spécifiques d'un transcript, sont fixées sur la puce, un support solide miniature (Figure 26). Les cibles (ici ARNm), sont extraites des cellules tumorales étudiées, marquées puis hybridées sur la puce. La détection des cibles hybridées peut se faire par mesure de radioactivité ou de fluorescence



Figure 26: Exemple d'une puce Affymetrix R

Dans ce chapitre, nous allons détailler les différentes technologies de puces et l'ensemble des altérations qu'il est possible d'étudier au niveau transcriptome.

1.5.1.2 Principe général

Les méthodes d'analyse des produits de l'expression des gènes, que ce soit les ARN (transcriptome) ou, in fine, les protéines (protéome), reposent sur la détection d'interactions spécifiques entre deux biomolécules. Le principe de fonctionnement des puces à ADN se fonde plus précisément sur la propriété d'hybridation spécifique entre deux séquences complémentaires d'acides nucléiques. Le cas de puce à ADN s'agit d'un jeu ordonné de plusieurs milliers de séquences d'ADN, ADN complémentaire (ADNc) ou oligonucléotides de synthèse, est immobilisé sur une surface solide (figure 27). Chaque emplacement de séquence est soigneusement annoté (la position $x_i; y_i$ correspond au gène i). Par la suite, les acides nucléiques à étudier, préalablement marqués, sont hybridés sur ce support solide. L'intensité du signal au niveau d'une séquence donnée sera proportionnelle à la quantité de gènes cibles dans l'échantillon analysé(224).

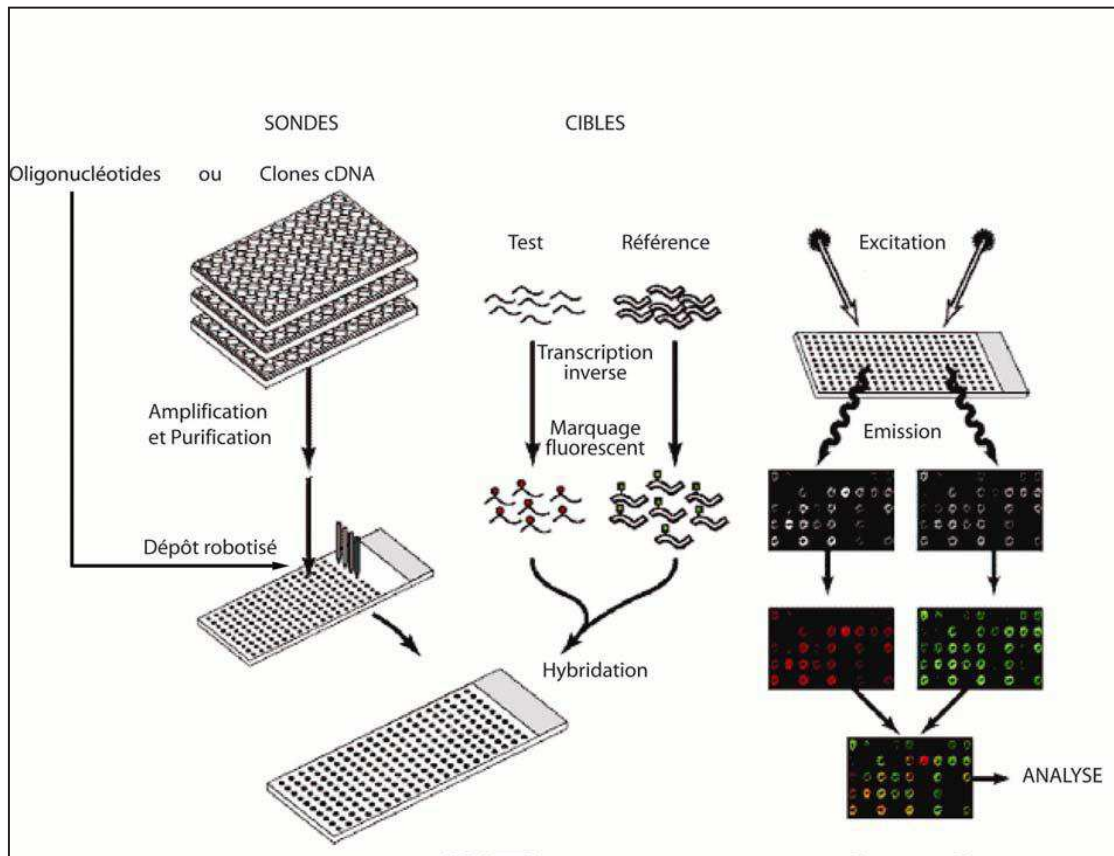


Figure 27 : Schématisation de la technique d'analyse du transcriptome par la technologie des puces à ADN (224).

Cette méthode peut être utilisée aussi bien pour quantifier l'expression des gènes avec l'ARN comme substrat de départ que pour mesurer le nombre de copies d'un gène avec de l'ADN génomique comme substrat. Les principes et les méthodes d'analyse restent globalement les mêmes, seuls les produits immobilisés et les produits cibles varient. Dans ce chapitre, nous nous limiterons à la description des puces qui permettent l'analyse du transcriptome, c'est-à-dire les puces sur lesquelles des séquences ciblant spécifiquement les transcrits sont immobilisées sur le support solide et où l'échantillon à analyser est de l'ARN purifié.

Dans la littérature, le terme de « sonde » désigne soit les séquences immobilisées sur le support solide, soit les ARNm marqués. Dans ce chapitre, ce terme de sonde désignera la séquence immobilisée sur le support solide et le terme de « cible » l'ARNm marqué dans l'échantillon testé. Enfin, et bien que le terme de « puce à ADN » désigne essentiellement une technique, il est important d'aborder plusieurs notions indispensables pour organiser et interpréter les données obtenues. L'utilisation des puces à ADN peut être déclinée en trois phases (figure 28) :

- la phase pré-analytique qui inclue la fabrication ou le choix du type de technologie, la conception de l'expérience, le choix des références, la préparation et le contrôle de qualité des échantillons ;

- la phase analytique qui correspond au marquage des échantillons (ou sondes), à leur hybridation, à l'acquisition et à l'analyse des images ;
- la phase post-analytique qui comprend la normalisation des données, le recueil des résultats dans des bases de données, l'analyse biostatistique et l'interprétation de ces données.

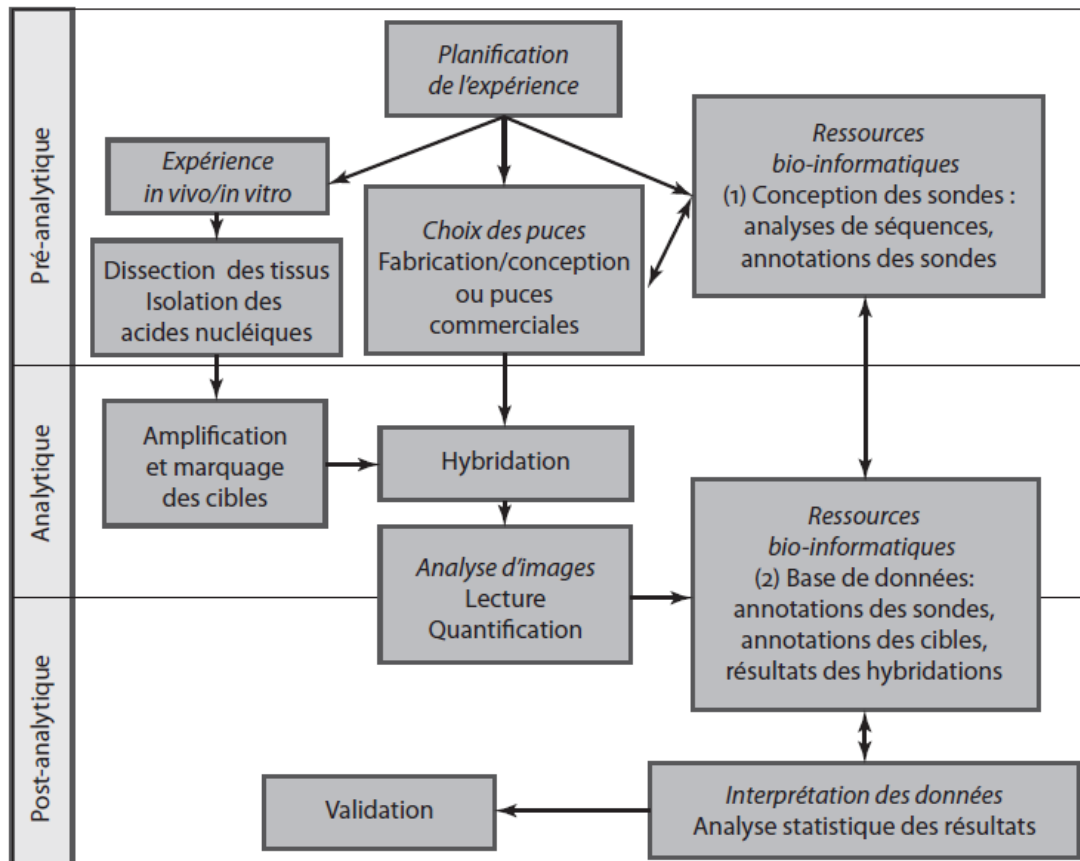


Figure 28: les trois phases de la technique des puces à ADN

1.5.1.3 Les différents types de puce à ADN

On distingue deux grands types de puces à ADN : les puces par dépôt et les puces à oligonucléotides synthétisés *in situ* (Figure 29). Parmi ces 2 types de puces, on peut ensuite différencier celles qui permettent d'analyser deux échantillons co-hybridés (et sont donc des puces à deux canaux de fluorescence) et celles à un seul canal où un échantillon à la fois peut être analysé.

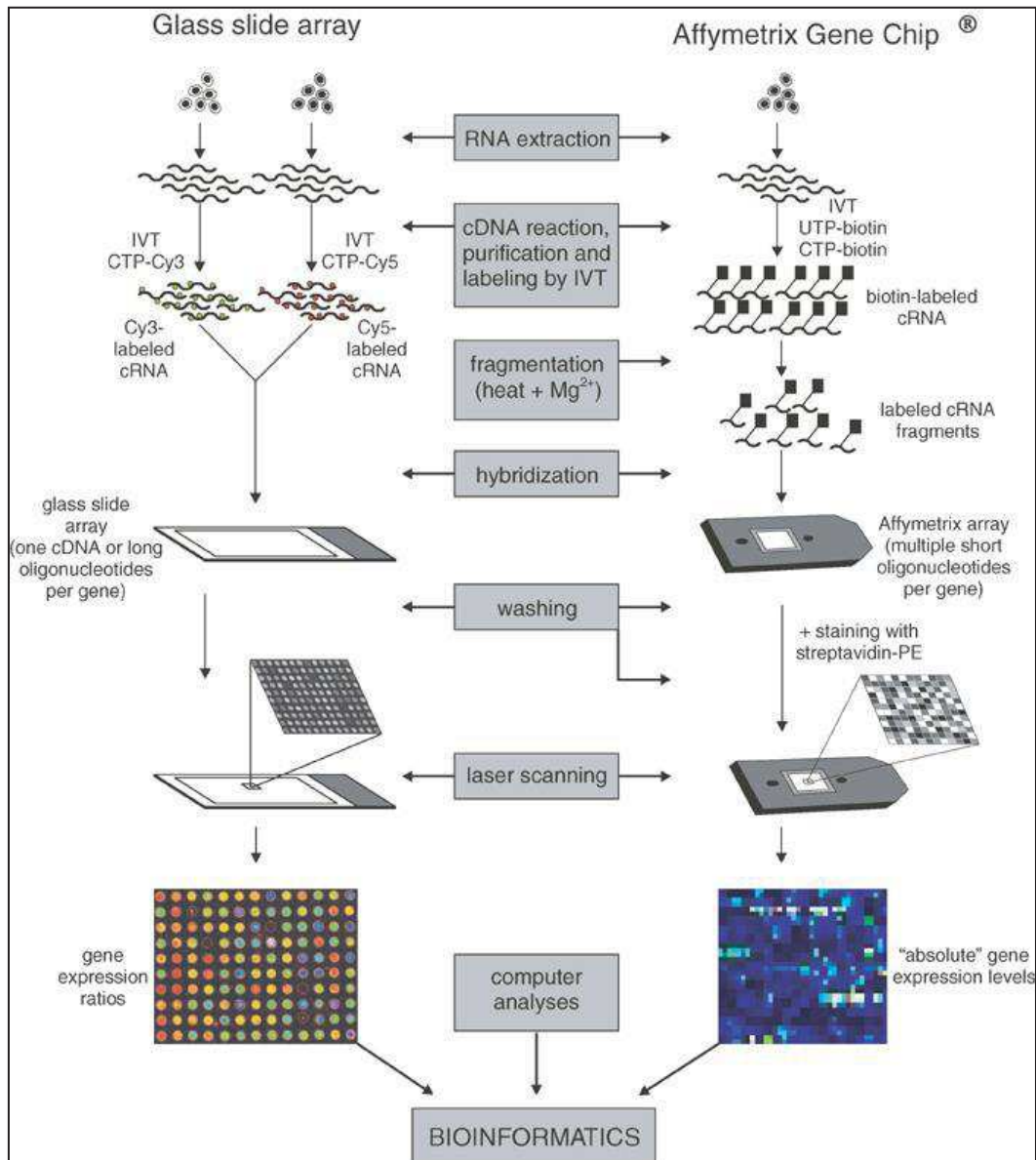


Figure 29 : Principes des biopuces « double couleur » et « simple couleur » (Affymetrix)(227).

Double couleur : les deux populations de cellules, par exemple malades et normales, sont isolées, l'ARN est extrait, l'ADNc préparé puis une transcription in vitro (IVT) avec Cy3 (vert) ou Cy5 (rouge) est réalisée pour marquer les ARNc. Les deux échantillons d'ARNc marqués sont mélangés de façon stoechiométrique et hybridés sur un ensemble de lame de verre. La lame est balayée par un laser, puis chaque spot de l'image est analysé par ordinateur pour donner des intensités signal. Simple couleur (exemple des biopuces Affymetrix) : une seule population de cellule est utilisée comme matière de départ. L'ARN total est extrait et l'ADNc est préparé. L'ADNc est utilisé dans une réaction d'IVT pour générer de l'ARNc biotinylé. Après fragmentation, cet ARNc est hybridé à une biopuce, qui est ensuite lavée et incubée avec un conjugué streptavidine - phycoérythrine (PE), et ensuite scannée par un laser.

1.5.1.3.1 Les puces à ADN par dépôt

Les sondes présentes sur ces puces peuvent être des oligonucléotides, des cDNA ou encore des fragments de PCR qui correspondent aux cibles d'intérêt. Les sondes sont synthétisées avant d'être déposées sur le support puis y sont fixées. La grille de sondes ainsi obtenue est prête à être hybridée avec les ADNc des cibles extraites des échantillons à étudier. L'expérience consiste à réaliser une hybridation compétitive (Figure 29) entre les sondes de la puce et les cibles de deux conditions différentes, marquées avec deux fluorochromes distincts (usuellement la cyanine 3 qui émet dans le vert et la cyanine 5 qui émet dans le rouge). Après lavage pour éliminer les cibles non hybridées, la puce est scannée deux fois pour mesurer les intensités de fluorescence pendant qu'un laser excite spécifiquement les deux fluorochromes dans leur longueur d'onde d'excitation. Les intensités de fluorescences associées à chaque sonde sont transformées en valeur numérique. Le rapport des intensités pour chaque sonde correspond au signal relatif des deux conditions entre elles afin d'identifier les gènes sur ou sous-exprimés(225) par rapport à la condition de référence.

1.5.1.3.2 Les puces à ADN à oligonucléotides synthétisés *in situ*

Le terme oligonucléotides synthétisés *in situ* fait référence à la technique de fabrication de ces puces. En effet, ici les sondes sont produites directement sur le support solide de la puce. Les méthodes de synthèse et la longueur des sondes varient selon les fabricants. Les sondes peuvent être longues (environ 60-mer pour les puces Agilent) ou plus courtes (25-mer pour les puces Affymetrix ; figure 30). Plus les sondes sont longues plus elles sont spécifiques d'un gène cible, plus les sondes sont courtes plus la densité de couverture est importante sur la puce et plus le coût de fabrication est moindre. La précision avec laquelle les sondes sont fixées sur le support permet de s'affranchir de la variabilité de la quantité de sondes déposées.

Avec cette technologie, un seul échantillon marqué est déposé par puce et la lecture de l'intensité de fluorescence par un scanner est directement liée à la quantité de cibles présentes dans l'échantillon qui s'hybrident avec les sondes. Cependant cette mesure ne révèle pas une quantité absolue des cibles mais plutôt une quantité relative qu'il faut comparer aux autres gènes et autres conditions de l'expérience (Figure 29).

Un des plus gros avantages de cette technologie, mis à part la résolution, est la très bonne reproductibilité(226). De plus, un échantillon aberrant ne peut affecter la totalité des données brutes de l'expérience puisqu'il ne sera pas co-hybridé sur une puce. Il suffira de le supprimer de l'analyse. En termes de limite, comparé aux puces à deux canaux de fluorescence, deux fois plus de puces sont nécessaires pour comparer des échantillons dans une expérience.

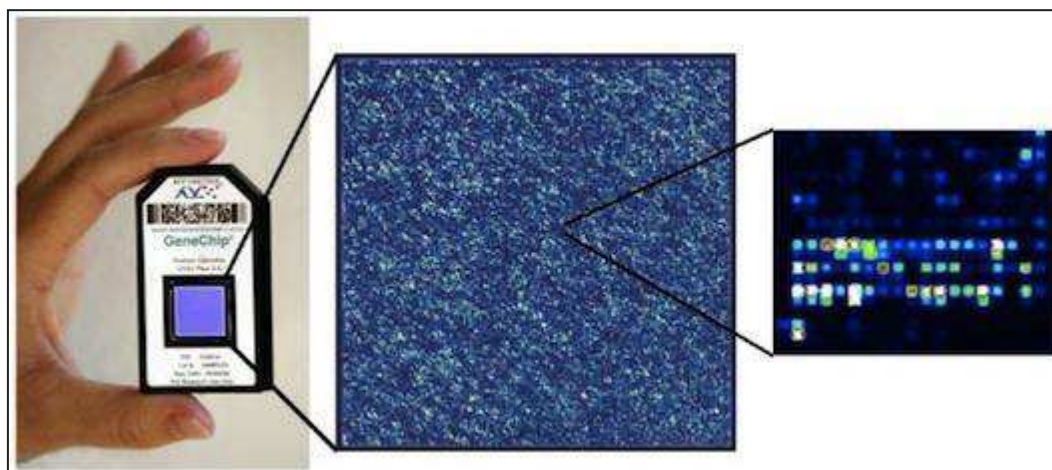


Figure 30 : Biopuce Affymetrix : image après scan.

Source <http://www.stemcore.ca/services/microarrays>

I.5.1.3.3 Système de détection

La fluorescence est la méthode la plus répandue car elle présente une bonne sensibilité de détection du signal, tout en étant facile et non contraignante à manipuler, contrairement à la radioactivité. Deux types d'approches sont envisagés en fonction de l'utilisation d'un ou de deux marqueurs :

- l'approche à deux marqueurs fluorescents, dite *double marquage (dual-channel)* permet d'hybrider compétitivement deux échantillons (par exemple, tissu normal versus tissu tumoral) (figure 31A). Cette approche a été utilisée dès les premières expériences sur lame de verre. Elle limite les variations expérimentales puisque chaque échantillon est comparé à une même référence. Les résultats obtenus ne sont pas des intensités d'hybridation mais des rapports d'expression entre deux échantillons (ou avec une référence). Cette approche est beaucoup plus sensible pour des comparaisons directes, mais reste limitée pour comparer des projets ayant des références différentes. Il existe généralement un biais lié à l'incorporation de marqueurs différents, mais celui-ci peut être compensé par une hybridation avec inversion des marqueurs ou *dye-swap*. Cette stratégie de double marquage est utilisée pour la plupart des puces de fabrication « maison » et par de nombreux constructeurs ;

- dans l'approche à un seul marqueur, dite *simple marquage (one-channel)*, le signal (intensité) est proportionnel à l'expression du gène correspondant (figure 31B). Ce signal est généralement normalisé soit par rapport au bruit de fond de la puce, soit par rapport à un étalon interne ou encore par rapport à des gènes de référence. Les puces produites par Affymetrix ou Applied Biosystems, par exemple, utilisent une stratégie de simple marquage mais c'est également le cas des

méthodes utilisant un marquage radioactif. En théorie, ces méthodes permettent de mesurer l'expression de chaque gène dans un échantillon, puis de comparer les échantillons entre eux. C'est une stratégie puissante pour comparer des échantillons issus d'origine et de projets différents. Cependant, la variabilité entre deux expériences peut être importante et limiter ainsi la puissance de comparaison d'échantillons appariés(228).

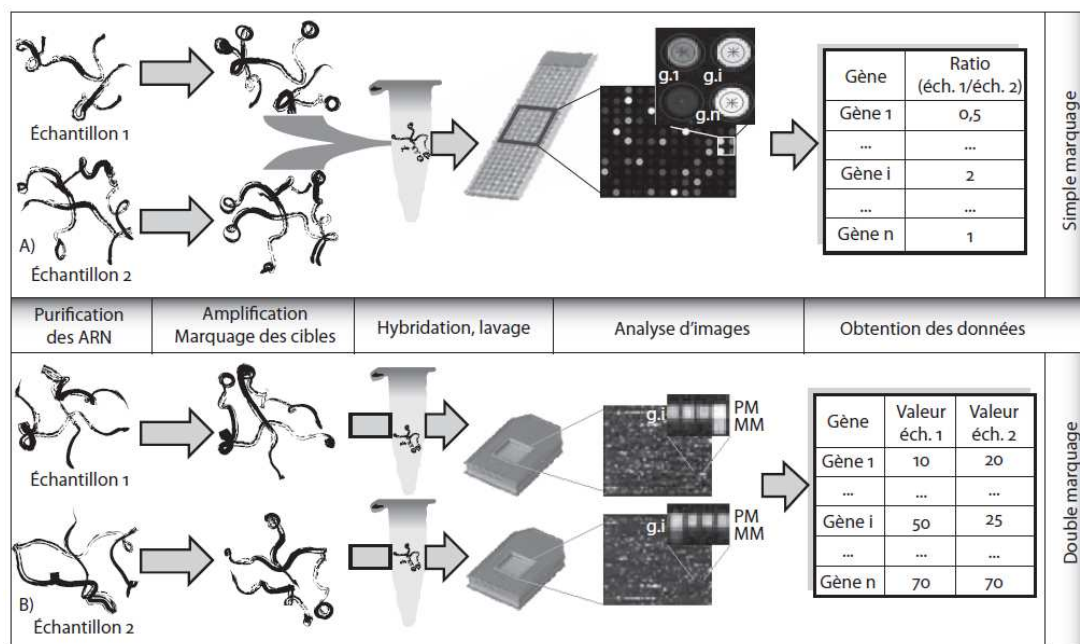


Figure 31: comparaison des protocoles d'utilisation des puces à ADN avec simple (A) ou double (B) marquage(228).

1.5.1.4 Préparation des échantillons, amplification, marquage et hybridation des cibles (228,229)

1.5.1.4.1 Préparation des échantillons d'acides nucléiques

Pour l'étude du transcriptome, l'ARN doit tout d'abord être purifié afin de limiter la contamination par l'ADN génomique, les protéines et les débris cellulaires qui peuvent perturber les différentes étapes enzymatiques d'amplification ou de marquage ainsi que l'hybridation. Le contrôle de qualité des échantillons est la dernière étape pré-analytique et doit inclure une quantification précise (absorbance à 260 nm) et une mesure de pureté (ratio absorbance 260 nm/280 nm supérieur à 1,8). Les conditions de manipulation liées au recueil de l'échantillon peuvent modifier le profil transcriptionnel d'un échantillon, par exemple au cours de l'exercice d'une tumeur, les processus de nécrose, de coagulation et d'hypoxie. En conclusion, l'étape pré-analytique est une étape essentielle qui conditionne la qualité des résultats.

I.5.1.4.2 Amplification et marquage des cibles

En règle générale, 1 à 5 µg d'ARN total sont suffisants. Le marquage des cibles peut être réalisé directement lors de la réaction de transcription inverse (reverse transcription ou RT) par incorporation de cytosine marquée (fluorescence ou radioactivité) dans les acides nucléiques néosynthétisés. Cependant, ce type de marquage nécessite une quantité de matériel de départ importante. Le protocole d'amplification linéaire ou transcription *in vitro* (IVT) en deux étapes permet de réduire la quantité d'ARN. La première étape est une RT utilisant des amorces spécifiques des ARNm (oligo-dT) ayant un site promoteur pour une T7 ARN polymérase. La deuxième étape permet la néosynthèse d'ARN complémentaire (ARNc) par la T7 ARN polymérase à partir de l'ADN complémentaire double brin. En effet, en fonction de leur encombrement stérique, la transcriptase inverse incorpore avec une efficacité variable les différents fluorophores, typiquement les cytosines comportant une cyanine 3 (Cy3) ou une cyanine 5 (Cy5). Bien que moins important, ce biais existe aussi avec la T7 ARN polymérase. Il pourra alors être compensé par une double hybridation avec inversion des marqueurs *dye-swap*. Le *dye-swap* correspond à la réalisation d'un duplicata d'hybridation mais en inversant les fluorophores. Si le différentiel de fluorescence (ratio Cy5/Cy3 < ou > 1) n'est présent que dans l'une des deux hybridations, il est dû au biais de marquage. Le marquage peut aussi être effectué après l'amplification en incorporant un nucléotide biotinylé qui sera ensuite marqué via l'interaction avec une streptavidine. Cette méthode peut aussi être utilisée pour du marquage simple.

I.5.1.4.3 Hybridation et lavage

Durant l'hybridation, chaque cible se lie spécifiquement à sa sonde complémentaire. Les paramètres essentiels pour limiter toute hybridation non spécifique sont la durée d'hybridation, la température, la stringence du tampon, la concentration de la sonde, l'encombrement stérique des sondes, la densité des dépôts et la séquence des sondes. L'hybridation est généralement réalisée sous agitation à 60 °C, pendant 10 à 17 heures, dans un tampon de haute stringence, afin d'éliminer toute fixation non spécifique. Pour les puces à oligonucléotides, les cibles sont préalablement fragmentées chimiquement pour être compatibles avec la taille des sondes.

Le lavage des puces permet d'éliminer toutes les cibles non hybridées ou hybridées non spécifiquement, visant à éliminer les nombreux signaux ou taches non spécifiques. Le lavage consiste en une immersion dans une série de tampons. Plusieurs protocoles automatisés existent pour cette étape. D'une façon générale, ces étapes sont assez simples à réaliser mais nécessitent une attention particulière avec de nombreux points de contrôle afin d'éviter tout biais dans la synthèse des sondes, l'incorporation des marqueurs ou la présence de taches et de bruit de fond altérant la sensibilité et la reproductibilité des expériences, donc des résultats.

1.5.1.5 Analyse bio-informatique et biostatistique

La bio-informatique et la biostatistique sont des outils indispensables pour le traitement et l'analyse des milliers de données générées par les puces à ADN.

1.5.1.5.1 Acquisition des images

L'acquisition des images est réalisée avec des scanners de haute précision, adaptés aux marqueurs utilisés. Pour le marquage fluorescent, cas le plus fréquent, l'image est acquise avec un scanner à laser confocal dont le pouvoir résolutif est compris entre 5 et 10 μm . La taille d'une zone (spot ou feature), où est hybridée une sonde donnée, mesure environ 100 μm (18 à 11 μm pour les puces Affymetrix). L'intensité du signal de fluorescence pour chaque couple gène/sonde est proportionnelle à l'intensité d'hybridation, donc à l'expression du gène ciblé.

1.5.1.5.2 Normalisation, filtrage et représentation des données

À ce stade, les résultats sont représentés sous la forme d'un tableau comportant autant de lignes que de sondes (plusieurs dizaines de milliers pour les puces pangénomiques) et autant de colonnes que d'échantillons à analyser (de 2 à plusieurs centaines). Deux paramètres sont associés à chaque sonde : la valeur d'intensité ou de ratio (souvent sous forme logarithmique, dite « log-ratio », représentant l'expression ou le différentiel d'expression) et la valeur de *p-value* donnant la significativité statistique du signal par rapport au bruit de fond et la significativité du ratio entre les deux marqueurs ou de l'algorithme PM/MM.

Avant d'être analysés, les résultats sont généralement « normalisés ». La normalisation permet de gommer les différences entre les diverses puces liées aux variations de quantité de départ, aux biais de marquage ou d'hybridation, aux variations de bruit de fond, etc. Transformer le fichier brut en fichier de données, et normaliser les données. Deux types de logiciels peuvent être utilisés(230): les logiciels dédiés (Microarray Suite version 5.0 (MAS5) pour les biopuces Affymetrix pangénomiques), et les logiciels institutionnels pouvant exploiter les données issus de nombreuses biopuces (Robust Multi-array Average (RMA) étant le plus utilisé). Ces deux logiciels se basent sur des algorithmes différents et fournissent des résultats substantiellement différents. R est un outil d'analyses statistiques et graphiques qui possède son propre langage de programmation. Ce logiciel, gratuit et *open-source*, offre de nombreuses possibilités d'analyses et de développement. R et sa suite BioConductor qui utilise la méthode RMA, dédiée aux méthodes d'analyse des données de génomiques, sont actuellement les outils les plus utilisés pour le développement de procédures mathématiques et statistiques en génomique. D'autre exemple des logiciels, comme Microsoft Excel®, Matlab® ou R15(231) sont aussi utilisés. Les principaux avantages de ces logiciels sont leur souplesse et leur

interopérabilité avec d'autres outils informatiques comme les banques et les bases de données accessibles sur le Web. Ils offrent ainsi de nombreuses possibilités d'analyses avec une perspective d'intégration des diverses sources de données pour une meilleure interprétation. Néanmoins, aucun algorithme n'a pu démontrer sa supériorité et même, de nombreuses méthodes permettent de normaliser ces données, mais aucune n'est optimale, et leur choix dépend essentiellement du type de puce utilisé et du biais attendu ou observé(232,233).

Les listes de gènes sont ensuite filtrées afin d'éliminer les résultats les moins fiables. Cette procédure permet généralement de soustraire tous les gènes ayant une faible variation, dont l'intensité est trop proche du bruit de fond ou pour lesquels on suspecte une hybridation non spécifique. Les critères les plus fréquemment utilisés sont un niveau de variation (fold-change) supérieur à 2 fois et une *p value* associée aux spots inférieure à 0,01. La normalisation, le filtrage ou toute autre transformation doivent cependant être utilisés avec prudence car ils peuvent introduire un biais et avoir un effet non négligeable sur l'interprétation des résultats.

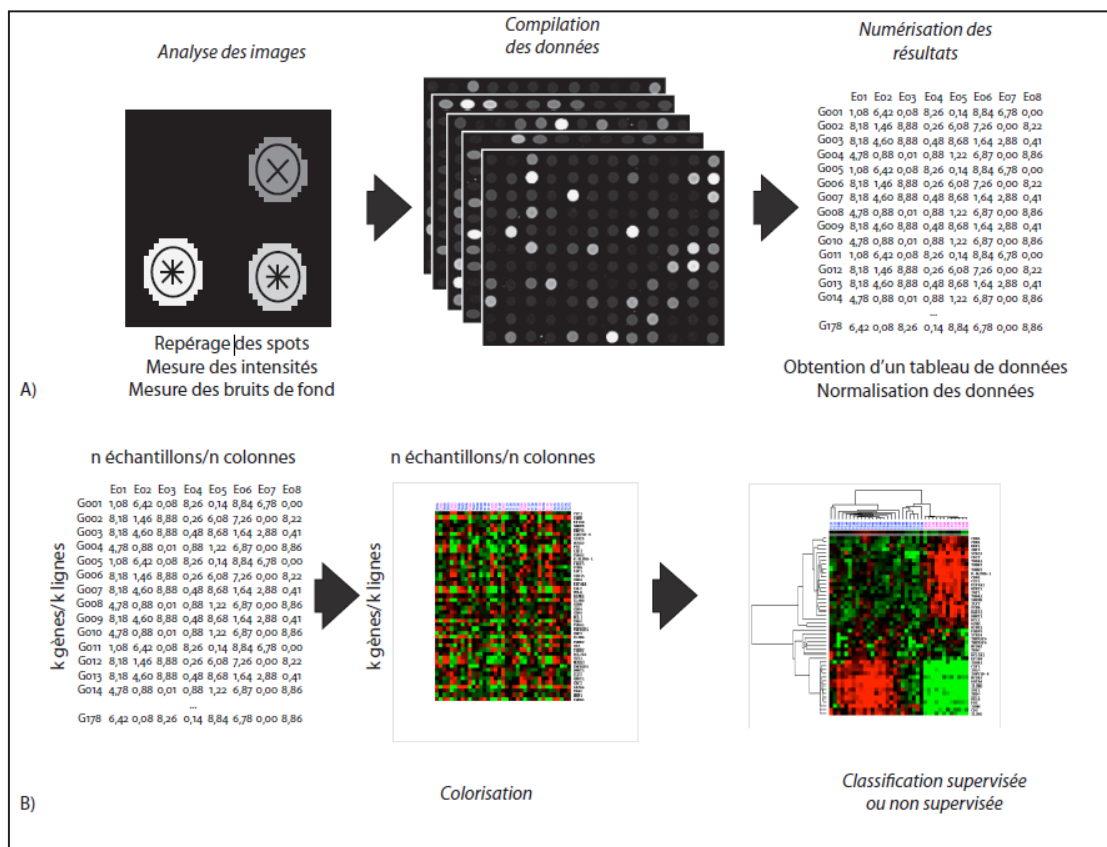


Figure 32: Principes de représentation des données de puces à ADN.

A) Traitement de l'image. B) Analyse statistique des résultats (234)

Une fois normalisées, filtrées et transformées, les valeurs sont regroupées sous forme de matrice avec une ligne par couple gène/sonde et une colonne par échantillon, dont la lecture est souvent difficile. Afin de faciliter leur représentation et de permettre une vision globale de l'ensemble des résultats, M. Eisen a proposé une méthode de visualisation qui repose sur le remplacement des valeurs par des couleurs variant sur une échelle d'intensité allant le plus souvent du vert (faible expression) au rouge (forte expression) en passant par le noir (expression moyenne) (figure 32). Cependant, n'importe quelle couleur peut être utilisée (rouge et jaune, rose et bleu...). Cette représentation permet de faciliter la représentation des regroupements de gènes et/ou d'échantillons ayant des comportements similaires (co-expression) après l'analyse statistique.

1.5.1.5.3 Analyse biostatistique des données d'expression génique

1.5.1.5.3.1 *La biostatistique dès l'étape pré-analytique*

Les expériences de *micro-array* fournissent une quantité considérable de données (plusieurs milliers de résultats par échantillon) dont le traitement et l'interprétation sont complexes et la puissance statistique très variable en fonction de l'analyse réalisée. Par exemple, dans une comparaison directe de deux échantillons avec une puce comportant 10 000 sondes et un seuil de signification fixé à 95 % ($p < 0,05$), 500 gènes seront retenus comme présentant une variation d'expression significative alors que leur variation sera uniquement due au hasard.

Le plan de l'étude doit prendre en compte les variabilités analytique et biologique des échantillons. Le choix d'un échantillon de référence est également crucial. Plusieurs choix sont possibles : comparer un échantillon d'un tissu « pathologique » à celui d'un tissu « non pathologique » (ou traité versus non traité), comparer chaque échantillon à un pool de tous les échantillons, utiliser des pools de lignées cellulaires (« maisons » ou commerciaux). En fait, aucune solution n'est idéale. L'échantillon de référence doit toujours être établi en fonction de la technologie utilisée et de la question posée(235).

1.5.1.5.3.2 *La biostatistique en post-analytique*

L'étape de normalisation permet de rendre les différentes expériences comparables et le filtrage d'éviter de se noyer dans la masse considérable de données. L'analyse biostatistique permet de regrouper les gènes et/ou échantillons en fonction de leur profil d'expression ou d'identifier les gènes dont l'expression est la plus modifiée entre deux types d'échantillons. Deux grands types d'analyses sont possibles :

1.5.1.5.3.2.1 Les approches non supervisées

Les approches non supervisées, ou analyses de classes (*cluster analysis*) sont des méthodes qui visent à regrouper les gènes et/ou les échantillons en fonction de leur ressemblance. Dans ce type d'analyse, les groupes préalablement connus (type histologique, données cliniques...) ne sont pas pris en compte dans l'algorithme servant à classer les échantillons. Les deux mesures les plus fréquemment utilisées pour déterminer la similarité/proximité entre deux gènes/échantillons sont la distance euclidienne et le coefficient de corrélation de Pearson. Différents algorithmes sont ensuite utilisés pour déterminer les groupes comme la classification hiérarchique, la classification par les nuées dynamiques (K-means), les cartes de Kohonen (self organizing map ou SOM). Les gènes co-exprimés ou co-réprimés sont regroupés dans une même classe et les échantillons co-exprimant ou co-réprimant les mêmes gènes sont également regroupés dans une même classe. Ces méthodes sont utilisées quand aucune information préliminaire n'est disponible sur les groupes d'échantillons ou pour analyser les profils moléculaires indépendamment de ces informations. Suivant l'algorithme utilisé, on peut ou non choisir le nombre de classes. Ce type d'approche est adapté à l'identification de nouvelles classes moléculaires ou de gènes régulant une même voie biologique. Le principe de ces analyses est fondé sur l'existence de réseaux géniques où les regroupements fonctionnels sont souvent associés à des mécanismes de co-régulation. Toutefois, déterminer l'implication ou la pertinence d'un tel groupe dans un contexte clinique ou biologique nécessite une grande expertise. Toute découverte de nouvelle classe demande une validation indépendante(236,237).

1.5.1.5.3.2.2 Les approches supervisées

Les approches supervisées, ou analyses discriminantes de classes ou prédictions de classes, sont des méthodes qui permettent d'identifier les gènes exprimés différemment entre plusieurs groupes d'échantillons prédéfinis, comme par exemple des tumeurs de bon pronostic et des tumeurs de mauvais pronostic. Les différents algorithmes utilisés sont complexes pour les non-initiés. De plus, aucune méthode ne fait l'unanimité et chaque auteur tend à démontrer la supériorité de sa méthode et les points faibles des autres. Les tests utilisés les plus simples sont fondés sur le test de Student afin de comparer deux classes et l'analyse de variance pour comparer un nombre plus important de classes. Ce type d'analyse nécessite à la fois une bonne annotation des échantillons pour pouvoir déterminer correctement les classes ou comparer les survies et un effectif important pour établir une signature moléculaire statistiquement valide avec un nombre limité de faux positifs(238). Cependant, dans la plupart des cas, plus de deux conditions sont testées et une analyse de la variance est nécessaire(239). Dans certains cas, un test non paramétrique doit être utilisé. Par ailleurs, l'utilisation d'algorithmes plus complexes,

tel que la méthode *Rank Difference Analysis of Microarrays* (RDAM) intégrant la sensibilité du test et le *false discovery rate* (FDR), permet d'extrapoler des données et ainsi de sortir les différences significatives d'expression du bruit de fond des signaux(240).

1.5.1.5.3.2.3 Les enrichissements fonctionnels

Les approches fonctionnelles visent à déterminer les fonctions biologiques les plus représentées dans un profil d'expression. Ce type d'analyse peut être appliqué directement sur les données normalisées/filtrées ou sur les listes de gènes sélectionnés par les méthodes citées ci-dessus. À partir des fonctions répertoriées pour chaque gène dans les banques de données publiques telles : Gene Ontology(GO)(241). GO est issu du principal consortium international pour l'intégration des connaissances en génétique et biologie. Les données de GO sont des « termes », c'est-à-dire des groupes de gènes définis par leur appartenance à une fonction biologique. GO est le reflet de la complexité du vivant : cette base de connaissances comporte trois bases de données (*biological processes, molecular functions et cellular components*), chaque base de données hiérarchise les termes selon 12 niveaux du plus général au plus particulier. Les données contenues dans GO présentent donc un taux élevé de chevauchement ce qui rend difficile le questionnement « gène-à-gène » de cette base de connaissances. C'est pourtant la façon dont procèdent un grand nombre d'algorithmes contenus dans les logiciels dédiés à l'interrogation de GO (comme FatiGO(242)). Pour réellement tirer parti du nombre d'informations contenues dans GO des algorithmes plus complexes basés sur des approches mathématiques bayésiennes doivent être utilisés (par exemple l'algorithme *model-based gene set analysis*, MGSA(243), du logiciel Ontologizer(244)). Le logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA) est une alternative à l'utilisation de GO. La force de ce logiciel réside dans ses multiples bases de données internes et dans la puissance des algorithmes mathématiques utilisés. Dans la littérature, il est possible de regrouper les gènes par grandes fonctions et de déterminer si ces fonctions sont plus représentées dans une signature moléculaire que ne le voudrait le hasard. Ce type d'analyse est de plus en plus utilisé pour étudier l'effet biologique d'un médicament ou d'une anomalie moléculaire.

1.5.1.5.3.2.3.1 Exemples de bases de données

Bases de données de séquences de nucléotide primaire, bases de données Meta, bases de données génomiques, bases de données protéomiques, bases de données de fonction de la protéines et de la voie métaboliques (KEGG PATHWAY, Reactome Navigable map), bases d'ARN, protéine-protéine et d'autres interactions

moléculaires (STRING), et bases de données de la voie de transduction du signal (Signal Link, WikiPathways) (245).

I.5.1.5.3.2.3.2 Serveur Web

Des serveurs Web gratuits ont été utilisés en plus pour amener des nouvelles informations en améliorant la présentation des différents data obtenues comme ;

REVIGO (REduce and VIsualise les termes GO)(246) est un serveur Web qui résume une longue liste de termes GO incompréhensibles par trouver un sous-ensemble représentatif des termes en utilisant un algorithme de clustering simple qui repose sur des mesures de similarité sémantique. Ainsi la méthode définie par Resnik(247) pour calculer la similarité sémantique de deux termes GO, Resnik utilise la valeur du niveau d'information du plus proche parent commun aux deux termes.

GeneMANIA a permis de mettre en évidence, via la fonctionnalité « génération des réseaux et analyse fonctionnelle », des réseaux intermoléculaires à partir de gènes différemment exprimés (soit surexprimés soit sous exprimés) entre les traitements étudiés, et de les associer à leurs fonctions.

PATHAW LINKER identifie et visualise le premier *réseau voisin inter acteur* des protéines interrogés, analyse les adhésions de la voie de signalisation des protéines dans ce sous-réseau, et fournit des liens vers d'autres ressources en ligne. La recherche biomédicale est souvent axée sur la modification des fonctions des protéines sélectionnées. Ces changements peuvent perturber les voies de signalisation de façon inattendue et non spécifiquement affecter plusieurs processus cellulaires. Pathway Linker peut aider travaux expérimentaux en liant les protéines interrogée pour les voies de signalisation par la protéine-protéine et / ou des interactions génétiques.

I.5.2 Conclusion

L'établissement de signatures moléculaires, fondées sur les puces à ADN, offre de nombreux espoirs pour améliorer les outils diagnostiques et les thérapeutiques ciblées. De plus en plus d'essais cliniques incluent des projets utilisant des puces à ADN pour identifier des profils d'expression spécifiques des pathologies étudiées, des signatures prédisant la sensibilité à un médicament, de nouvelles cibles thérapeutiques ou de nouveaux biomarqueurs. Cependant, le coût et la réalisation pratique de ces méthodes constituent encore des freins importants pour leur utilisation en biologie médicale.

Dans les années à venir, l'enjeu le plus important sera la standardisation des différentes technologies disponibles et des méthodes d'analyse afin de permettre la

comparaison des résultats, en accord certainement avec les normes déjà établies par la *Microarray Gene Expression Data Society*, ou encore la formation de consortiums internationaux visant à valider, par des études prospectives, les premiers résultats obtenus dans des études rétrospectives. Une fois validés, il est fortement probable que les profils d'expression, les combinaisons de marqueurs génotypiques ou d'autres biomarqueurs identifiés grâce à ces méthodes à haut débit, trouveront leur place dans la pratique quotidienne de la biologie médicale sous forme de puces à ADN, mais aussi de tests plus simples et peut-être mieux adaptés à la routine, comme la PCR ou la détection par immunohistochimie ou par dosage ELISA des protéines correspondantes.

Dans cette thèse, une étude transcriptomique par microarrays a été réalisée pour chercher le(s) mécanisme(s) d'action des imiquilines.

II. Objectifs de la thèse

A ce jour, de nouvelles perspectives pour les patients atteints de mélanomes malins existent grâce au développement de nouvelles thérapies ciblées et d'immunothérapie. Bien que l'arsenal thérapeutique soit en pleine expansion, le pronostic de ce cancer demeure très sombre et le mélanome métastatique reste un défi thérapeutique.

Dans le cas des lymphomes, les thérapeutiques mises en place ne permettent pas encore de guérir ces maladies et leur gravité impose, de ce fait l'élaboration de nouveaux traitements efficaces.

Dans ce contexte, les dérivés imidazoquinoxalines sur lesquels j'ai travaillé sont développés en collaboration entre l'Université de Montpellier, l'Université libanaise et l'Université Américaine de Beyrouth. Ils constituent une nouvelle série de composés, au mode d'action innovant (cytotoxique direct par apoptose, susceptible, comme pour l'imiquimod, d'être doublé d'un effet de stimulation du système immunitaire), particulièrement prometteuse en chimiothérapie anticancéreuse du mélanome et du lymphome.

Dans ma thèse il y a quatre objectifs à réaliser qui seront divisés en quatre parties.

- Partie 1- Criblage et tubuline
- Partie 2 : Analyse transcriptomique
- Partie 3 : Validation biologique du mécanisme d'action
- Partie 4 : Formulation galénique

Dans la première partie, une étude de l'activité cytotoxique in vitro de nouveaux composés synthétisés sur la lignée cellulaire A375 de mélanome et sur d'autres lignées cellulaires (lymphomes, le colon et le sein) a été réalisée.

Ces nouveaux composés sont tous des dérivés de la série imidazo[1,2-*a*]quinoxaline, synthétisés par l'équipe d'oncopharmacochimie et pharmacotoxicologie cutanée de l'IBMM UMR5247.

Dans la deuxième partie, une analyse transcriptomique a été réalisée en vue de mettre en évidence l'originalité du mécanisme d'action (étude 1) et puis d'identifier ce mécanisme d'action (étude 2).

Dans la troisième partie, nous avons cherché à valider in vitro nos hypothèses mécanistiques obtenues in silico.

Dans la quatrième partie, une formulation galénique a été créée par notre laboratoire en collaboration avec l'Institut Gerhardt afin d'étudier l'activité in vivo sur différents modèles murins.

III. Matériels et méthodes

Cette partie va présenter les différentes technologies mises à contribution dans nos travaux.

III.1 Composés chimiques, anticancéreux de référence et nanocapsules

L'ensemble des imiquinalines, la molécule leader **EAPB0503** (1-(3-méthoxyphényl)-N-méthylimidazo[1,2-*a*]quinoxalin-4-amine) et les 13 autres composés EAPB utilisés, ont été synthétisés par notre laboratoire, comme décrit par Deleuze-Masquefa et al(196). Toutes les solutions des composés chimiques et des anticancéreux de référence utilisées dans cette étude ont été préparés dans des conditions stériles, dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma-Aldrich). La concentration finale de DMSO dans la culture cellulaire ne dépasse pas 0,1%. Les solutions mères des composés sont préparées dans le DMSO à 0,01 M et sont stockées à -80° C (les molécules restent stables durant 6 mois). Les molécules d'arsenic et d'interféron ont aimablement été fournies par le Dr.El Haj du laboratoire des traitements ciblés des leucémies et des lymphomes du laboratoire du Pr.Bazarbachi de l'Université Américaine de Beyrouth. Tous les autres composés proviennent de Sigma-Aldrich (France) sauf le vémurafénib qui provient de Selleck Chemicals. Les nanocapsules utilisées dans cette thèse ont été préparées par Adrien Chouchou, doctorant en première année de thèse au laboratoire, en collaboration avec les Dr Sylvie Bégu et Dr Anne Aubert de l'équipe MACS (Institut Charles Gerhardt - UMR 5253). Deux types de nanocapsules ont été utilisés, les nanocapsules blanches, ne contenant pas de molécules à tester (NCB1), et les nanocapsules contenant **EAPB0503** (NC6).

III.2 Lignées cellulaires utilisées

Les lignées cellulaires utilisées pour les tests de cytotoxicité de nos molécules sont trois lignées adhérentes et une lignée non adhérente (en suspension).

III.2.1 Les Lignées cellulaires adhérents

III.2.1.1 La lignée de mélanome humain A375

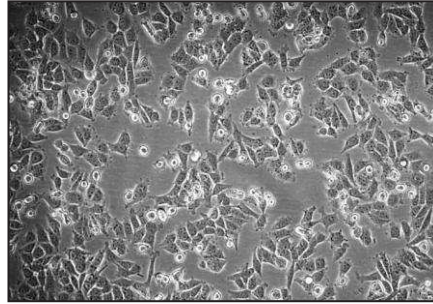


Figure 33: Microphotographie de la lignée A375

Cette lignée (figure 33) est un modèle cellulaire classique de mélanome malin humaine(248). Elle exprime la mutation BRAF V600E, rendant la kinase BRAF constitutivement active. L'ensemble des altérations moléculaires exprimées par cette lignée est répertorié dans la base de données du Broad Institute CCLE (cancer cell line encyclopedia).

III.2.1.2 La lignée de carcinome de colon LS174T

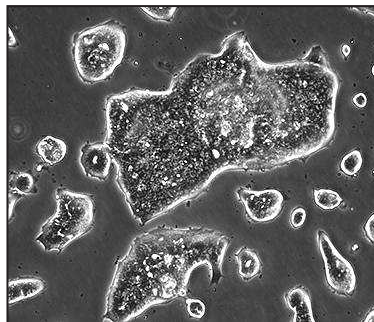


Figure 34 : Microphotographie de la lignée LS174T

C'est une lignée cellulaire humaine d'adénocarcinome colorectal de forme épithéliale (figure 34). Elle est positive pour l'expression de c-myc, N-myc, H-ras, N-ras, Myb, et Fos oncogènes(249).

III.2.1.3 La lignée de cancer de sein MCF7

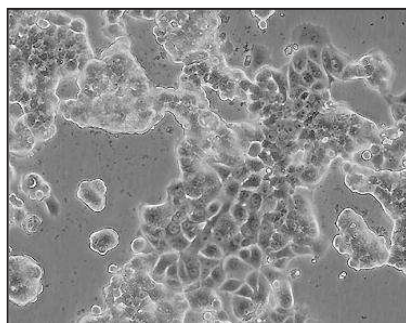


Figure 35 : Microphotographie de la lignée MCF7

La lignée MCF7 est une lignée cellulaire humaine (figure 35) d'adénocarcinome de la glande mammaire, du sein. Elle est de type épithélial dérivé à partir du site métastatique d'effusion pleurale. La lignée MCF7 conserve plusieurs caractéristiques de l'épithélium mammaire différencié y compris la capacité à traiter par l'œstradiol à l'intermédiaire des récepteurs cytoplasmiques d'œstrogènes et de la capacité de former des dômes. Les cellules expriment l'oncogène Wnt7b(250).

III.2.2 La lignée non adhérent (en suspension) de lymphome T, HUT102

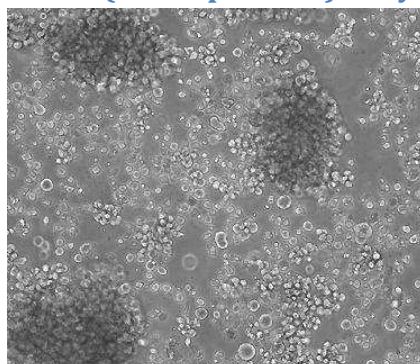


Figure 36 : Microphotographie de la lignée HUT102

C'est une lignée cellulaire de lymphome T de l'adulte (ATLL), de type lymphocyte T cutané (figure 36). Ces cellules sont en suspension et extraites à partir du sang périphérique. Elles expriment l'antigène CD4 et le gène HTLV-1 (human T cell leukemia virus de type 1).

III.2.3 Entretien des cellules

La solution utilisée comme milieu de culture et milieu de dilution des produits à tester est le RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) (LONZA) ou le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suivant la lignée cellulaire. Les cellules sont cultivées à 37°C sous 5% de CO₂ dans du milieu DMEM standard

contenant 4,5 g/l de glucose (*Lonza*, France), 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 1% de L-glutamine (200 mM) et 1% d'un mélange de pénicilline (5000 U/ml) streptomycine (5000 U/ml). Toutes les lignées cellulaires adhérentes ont été cultivées en DMEM et sauf les HUT102.

Les cultures sont repiquées deux fois par semaine.

III.3 Tests in vitro

Plusieurs tests ont été fait in vitro sur des lignées cellulaires humaines ou sur des tubulines purifiés porcines et in vivo sur des souris SCID transgéniques.

III.3.1 Test de viabilité

Les deux tests de viabilité qui sont utilisés dans mes travaux sont le test au rouge neutre et le test au MTT.

III.3.1.1 Test au rouge neutre

Ce test, qui utilise la capacité des cellules vivantes à incorporer le rouge neutre dans leurs lysosomes, fournit une estimation quantitative du nombre de cellules vivantes. Le colorant fixe dans les cellules est extrait par une solution d'éthanol acidifiée, et la mesure de l'absorbance de la solution obtenue permet d'évaluer le nombre de cellules vivantes.

Les cellules sontensemencées dans des plaques 96 puits (5000-20000 cellules/puits) suivant la nature de la lignée cellulaire et incubées à 37°C pendant 24h. Les cellules sont ensuite exposées à des concentrations croissantes d'anticancéreux et de nos drogues EAPB pendant 72 heures dans du milieu DMEM (5% SVF sans antibiotique). Après 72 heures de traitement la révélation est réalisée ensuite selon les étapes suivantes : le milieu de culture est remplacé par une solution de rouge neutre (50 µg/ml de DMEM) pendant 3 heures à 37°C. Les cellules sont lavées au PBS et le rouge neutre est extrait par une solution de désorption (1% d'acide acétique, 50% d'éthanol (95%), 49% d'eau) (v/v). L'absorbance ou Densité Optique (DO) de la solution est enfin mesurée par spectrophotométrie à 540 nm dans le lecteur de plaques *Labsystems Multiskan MSR*. Des moyennes d'absorbance sont ainsi établies pour chaque groupe de puits et comparées à celle du groupe témoin (non traité), ce qui permet d'exprimer la viabilité de chaque groupe de cellules en pourcentage relativement à la viabilité des cellules témoins ($DO\ traité / DO\ témoin \times 100$). Les données ont été traitées à l'aide du logiciel GraphPad Prism pour calculer les CI50. Chaque condition a été répétée 3 fois au minimum et les écarts types ont été calculés.

III.3.1.2 Test au MTT

La viabilité cellulaire est mise en évidence par un test colorimétrique basé sur la capacité des cellules vivantes à réduire le MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) en cristaux de formazan bleu. Ce test suit les étapes que le test au rouge neutre sauf pour la dernière étape de révélation. Après 72 heures du traitement 20 µl de MTT à 5 mg/ml sont ajoutés dans chaque puits. Après 3h d'incubation, la solution de MTT a été retirée et directement remplacée (sans lavage) par de mélange propan-2-ol/acide chlorhydrique 1N (96:4) (100µl) de dissoudre les cristaux formés. L'absorbance a été mesurée à 540 nm sur un spectrophotomètre Labsystems Multiskan. L'absorbance est proportionnelle à l'intensité de la coloration, c'est à dire au nombre de cellules vivantes.

III.3.2 Test de polymérisation de tubuline

Cette partie est bien détailler dans l'article Zahraa et al.

III.4 Test in vivo

Un test de survie a été fait sur des souris à immunodéficiences combinées sévères (SCID) à l'université Américaine de Bierut en collaboration avec Dr. Ali Bazerbachi et Dr. Hiba El Hajj.

III.4.1 Les souris SCID

Les souris SCID ont une maladie génétique d'immunodéficiences sévères qui se caractérise par l'incapacité complète du système immunitaire adaptatif à monter, coordonner et soutenir une réponse immunitaire appropriée, généralement due à des lymphocytes T et B absents ou atypiques.



Figure 37 : les souris SCID récipients

Ce modèle de souris est aimablement fourni par Dr. Ali Bazerbach et Dr. Hiba El Hajj. Pour tester l'effet de différentes thérapies ciblées, ils ont établi un modèle rapide et reproductible par injection intrapéritonéale de 10^6 cellules spléniques provenant de souris Tax transgéniques (modèle de souris ATL de Hasegawa et al)(251). Toutes les souris SCID (figure 37) ont développées rapidement une hyperleucocytose massive, une splénomégalie, une hypercalcémie, et une invasion d'organes multiples, identiques à ceux qui est observés dans les souris transgéniques(180).

Tous les protocoles murins ont été approuvés par l'Institutional Animal Care et l'Utilisation Comité de l'Université américaine de Beyrouth et l'Institut Universitaire d'Hématologie (Université Paris Diderot). Tous les animaux ont été logés dans des installations exemptes d'organismes pathogènes spécifiques. Les souris ont été maintenues sous atmosphère stérile et ont reçu de la nourriture et de l'eau aseptisées.

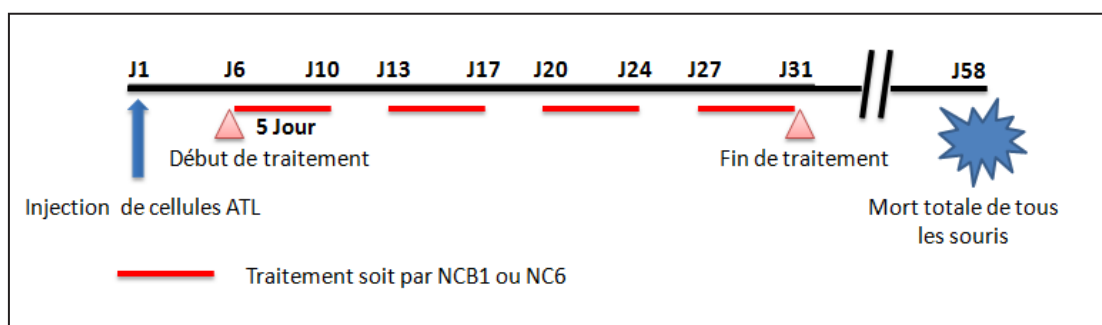


Figure 38 : Design expérimental : des souris SCID injectée par des cellules ATL au Jour 1 (J1) puis les traitements débutent dès le jour 6 jusqu'au jour 31 (traitements par injection intrapéritonéale 5 jours/semaine).

	Contrôle	Contrôle : NCB1	NC6 : EAPB0503
Nombre de souris SCID Malade par groupe	Groupe 1: 5 souris	Groupe 2: 5 souris	Groupe 3: 5 souris
Dose (mg/kg)	0	20	20
Volume (μ L)	0	400	400
Jours	0	J6, J7, J8, J9, J10 J13, J14, J15, J16, J17 J20, J21, J22, J23, J24 J27, J28, J29, J30, J31	J6, J7, J8, J9, J10 J13, J14, J15, J16, J17 J20, J21, J22, J23, J24 J27, J28, J29, J30, J31

Tableau 13 : Essai *in vivo* de NC6 et NCB1 sur des souris SCID malades. Trois groupes de souris SCID malades ont été utilisée et chaque groupe représente 5 souris. J1 : injection intrapéritonéale de 10^6 cellules de la rate provenant des souris Tax

transgéniques.

Trois groupes de souris SCID malades ont été utilisés (tableau 13). Les administrations à la dose 20 mg/kg en forme galénique nanocapsulaire de NCB (nanocapsules blanches vide), NC6 (nanocapsules EAPB0503) ont débuté au jour 6 comme la montre la figure 38. Ainsi les traitements ont été faits cinq jours par semaine pendant 31 jours soit 20 injections intrapéritonéale. Ce test de survie a été fait une seule fois et des observations journalières des souris ont été réalisée pour détecter la survie de ces souris jusqu'à la mort toutes les souris.

III.5 Extraction d'ADN

Pour la préparation des chromosomes en métaphase, le protocole utilise est référé dans la section génomique du cancer, Direction Génétique, National Institutes of Health (NCI) 2006. Les 10 premières étapes ont été utilisé pour préparer nos échantillons d'ADN des lignées cellulaires d'A375 (1, 2, 3).

1. Les cellules devraient être de 60% -80% de confluence.
2. Ajouter du Colcemid à une concentration finale de 0,1 µg / ml
3. Incuber à 37 ° C pendant 30 min à une nuit (temps varie en fonction de l'activité mitotique des cellules à analyser).
4. Retirer le milieu et le transférer dans un tube à centrifuger.
5. Laver les flasques avec du PBS stérile 5-10 ml pendant environ 5 min.
6. Retirer les contenus et les ajouter aux tubes contenant le milieu retiré plus tôt.
7. Ajouter 0,5-1 ml de trypsine pour chaque flasque.
8. Examiner les cellules avec un microscope inversé. Lorsque les cellules commencent à décoller, ajouter immédiatement 5 ml de milieu complet.
9. Transférer le contenu dans les tubes.
10. Centrifuger les tubes pendant 5 min à 1000 rpm.

Ces tubes contenant de l'ADN ont été gardé à 4°C Jusqu'à l'analyse.

III.5.1 Recherche de mutations somatiques V600 sur le gène BRAF par pyroséquençage

Ce mode opératoire décrit la prise en charge au laboratoire de biochimie de l'analyse « BRAF » effectuée dans le cadre de la plateforme INCA (OncoBioLR, site de Nîmes, Pr Alexandre EVRARD) de génétique moléculaire des cancers. Il concerne la recherche de mutations somatiques sur le codon V600 du gène BRAF. Cette recherche de mutations est obligatoire avant la prescription de certaines thérapies ciblées en oncologie (test « compagnon ») ou peut avoir une valeur pronostique pour certains cancers (colon, poumon).

Après enregistrement et extraction d'ADN, les échantillons sont analysés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) suivie d'un pyroséquençage.

Ces deux techniques PCR et pyroséquençage a été effectué sur une plate-forme au Centre Hospitalier Universitaire de Nîmes – France.

III.6 Les biopuces Affymetrix

III.6.1 Choix du modèle cellulaire

Des études transcriptomiques suggèrent que les cellules A375 peuvent être des modèles approuvés pour étudier l'expression des gènes qui sous-tendent certains processus biologiques du mélanome tels que la progression et la dissémination, ou encore le pronostic (figure 39) (252). Les modules d'expression des gènes identifiés sont ainsi considérés comme de potentiels biomarqueurs et/ou nouvelles cibles thérapeutiques.

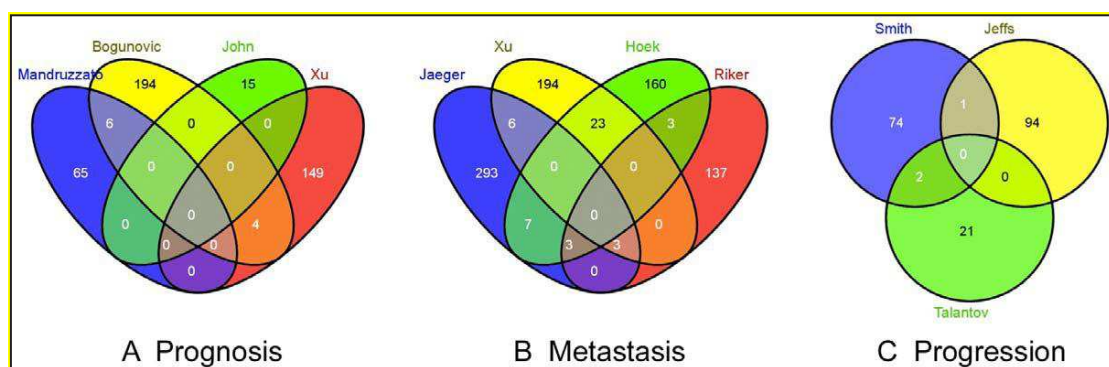


Figure 39 : Intersection entre les signatures de gènes identifiés par des études transcriptomiques sur les lignées de mélanome.

(A). Intersection entre les gènes identifiés dans quatre études de pronostic. (B). Intersection entre les gènes identifiés dans quatre études de métastases. (C) Intersection entre les gènes identifiés dans trois études de progression (252).

III.6.2 Conception de l'étude transcriptomique : préparation des échantillons

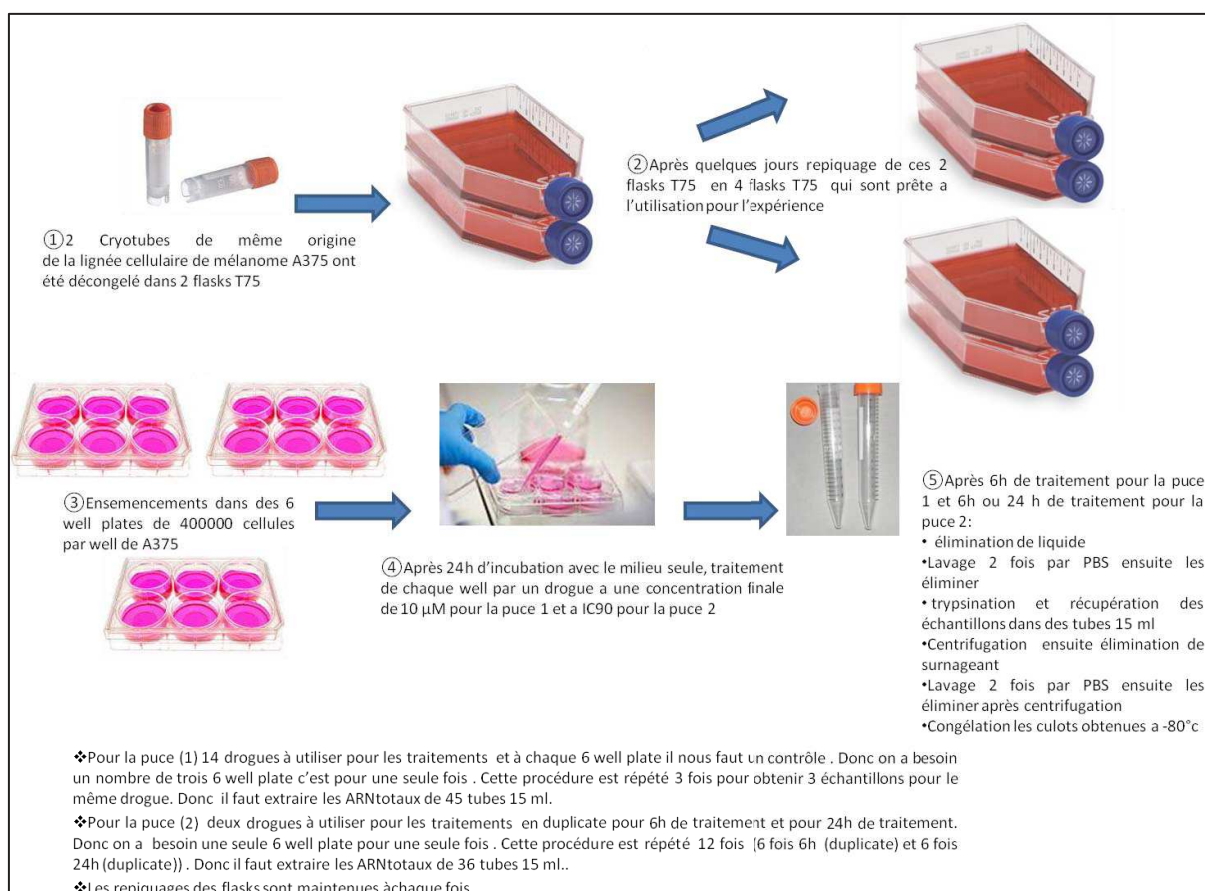


Figure 40 : Conception de l'étude transcriptomique : Les étapes nécessaires pour la préparation des échantillons à hybrider.

III.6.3 Extraction de l'ARN total

III.6.3.1 Méthode par RNeasy® Mini Kit

Les ARN totaux ont été extraits des cellules A375 puis purifiés à l'aide des kits « Quiagen QIAshredder » et « RNeasy Mini Kit » selon les protocoles du fabricant, puis quantifiés sur « eppendorf Biophotometer ».

Parallèlement, la qualité des ARN extraits a été vérifiée sur gel d'agarose à 1%. Puis les ARN totaux issus de différentes extractions ont été regroupés de façon stoechiométrique, selon le design de l'étude décrit précédemment, en une solution finale à 150ng d'ARN / μ l.

III.6.3.2 Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse est un processus consistant à soumettre la molécule nucléotidique, chargée négativement, à un champ électrique, ce qui lui permet d'acquérir un

mouvement dans le gel d'agarose vers le pôle positif du champ électrique. La distance de migration sera ainsi dépendante de la taille de la molécule (de sa charge électrique), ce qui permettra après de l'identifier par luminescence grâce à un agent intercalant (bromure d'éthidium : BET) en présence d'un marqueur de taille.

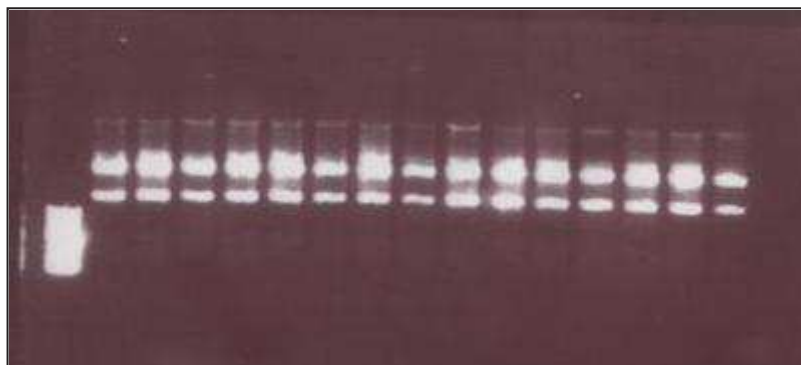


Figure 41 : visualisation sous ultra-violet des ARN totaux.

Le gel d'agarose utilisé à une concentration de 1%, avec 1% de BET. Le marqueur de taille (100 bp DNA Ladder : Invitrogen - Villebon sur Yvette, France) est déposé avec les échantillons. La migration est par la suite établie sous 100 V dans le tampon TBE 0,5X pendant 20-30 min, suivie d'une visualisation sous UV des bandes (figure 41).

III.6.4 Hybridation des biopuces

La qualité des échantillons d'ARN purifiés a été de nouveau vérifiée sur BioAnalyzer Agilent (Agilent Technologies). Une fois la qualité des ARN validée, les échantillons ont été préparés en vue de l'hybridation sur biopuce Affymetrix HG-U133 plus 2,00 PM selon le protocole du fabricant. Cette puce à ADN contient 54 656 sondes correspondant aux 47 400 transcrits humains, et permet donc d'étudier l'ensemble du transcriptome humain. Le signal des biopuces après hybridation, proportionnel à la quantité d'ARNm spécifiquement hybridé sur chaque sonde, a été analysé par scanner confocal « Affymetrix GeneChip3000 7G ». L'ensemble de ces opérations a été réalisé sur la plateforme Affymetrix de l'Institut de Recherche en Biothérapie de Montpellier (IRBM), CHRU-INSERM- UM1 (<http://irb.chu-montpellier.fr/>).

III.6.5 Analyse bioinformatique des données des puces

La méthode d'analyse des données des biopuces comportait les étapes suivantes :

- normalisation par RMA (Robust Multi-array Average),
- comparaison des profils d'expression par la méthode RDAM (Rank Difference Analysis of Microarray),
- sélection des gènes dont l'expression est la plus altérée (génération de listes de transcrits hiérarchisés selon leur degré d'altération),

- enrichissement fonctionnel des listes de gènes sélectionnés par différents logiciels et algorithmes dont MGSA (Ontologizer's model-based gene set analysis).

III.6.5.1 Analyse statistique des données des biopuces

L'analyse statistique des données des biopuces a été réalisée par Michel Bellis. Après l'hybridation, les données des puces à ADN (scan) ont été converties et normalisées par RMA, dans Bioconductor (20). Les signaux résultant ont été analysés par RDAM (21), mise en œuvre dans Matlab (<https://github.com/mbellis/RDAMm/>). Dans la première étape, les signaux ont été normalisés en remplaçant le signal par son rang sur une échelle continue de 0 à 100, ce qui permet d'éliminer le biais systématique éventuel présent sur les puces, et rend toutes les puces comparables. En deuxième étape, les variations entre deux conditions biologiques ont été calculées et exprimées comme les différences entre les rangs sur une échelle continue de -100 à 100. En troisième étape, une procédure de standardisation, Zvar, est appliquée. Zvar, qui mesure les différences entre les rangs pour pouvoir les comparer, donne le même poids à tous les signaux. On obtient alors des listes de probe sets hiérarchisés en fonction de leur différence d'expression par rapport au contrôle.

III.6.5.2 Comparaison de profils d'expression

III.6.5.2.1 Classement des probe sets selon leur variation par rapport au contrôle

Au lieu de fold change (FC) entre signaux, on utilise la différence de rang qui mesure le déplacement de signal dans la distribution. L'algorithme RDAM permet de calculer aussi bien le FDR (False Discovery Rate, c'est l'estimation des faux positifs dans la sélection obtenue) que la sensibilité. Il utilise le FDR (équivalent de P value) en absence de repliquats. Le tableau 14 indique Les conditions biologiques ou points expérimentaux référencés par rangs. Ils ont été divisés en groupes, qui servent à effectuer les comparaisons nécessaires avec FDR 1% et 10% (tableau 15). Les probe sets sont classés selon le FDR et leur variation (surexpression ou sous-expression. D'après les résultats obtenus par les différentes comparaisons, on a trouvé que le nombre de probe sets à FDR 1% sont plus raisonnables que ceux de FDR 10%. Par exemple, dans la comparaison EAPB0503 versus CONTROLE, en surexprimé (tableau 15), le nombre de probe sets a FDR 1% est 153 (i.e. 1,53 des probe sets sont des faux positifs) et 393 à FDR 10% (donc 39,3 des probe sets sont des faux positifs). Ce qui rend évident de sélectionner les probe sets a FDR 1% pour faciliter l'analyse.

	Rangs		
	Puces groupes 1	Puces groupes 2	
	traitement 6H	traitement 6H	traitement 24H
CONTROLE	1	1	2
5-FU	2		
BMS	3		
COLCHICINE	4	3	4
DACARBAZINE	5		
DOXORUBICINE	6		
EAPB0503	9	7	8
FOTEMUSTINE	10		
IMIQUIMOD	11		
MAYTANSINE	12		
METHOTREXATE	13		
PACLITAXEL	15		
SN38	16		
VEMURAFENIB	17		
VINOURELBINE	18		

Tableau 14 : Conditions biologiques utilisées avec leur rang. Contrôle : non traité

	SUREXPRIME			SOUS-EXPRIME		
	FDR1%	FDR10%	TOTAL	FDR1%	FDR10%	TOTAL
EAPB0503 versus CONTROLE	153	393	500	103	222	350
BMS versus CONTROLE	205	1652	10734	803	4753	7629

Tableau 15: Exemple de comparaisons effectuées entre les conditions biologiques. Le nombre de probe sets sélectionnés, selon le FDR et la variation SUREXPRIME ou SOUS EXPRIME, sont indiqués dans les colonnes FDR1% et FDR10%. La colonne TOTAL indique l'estimation de la variation totale.

III.6.5.2.2 Regroupement hiérarchique des transcrits par des distances Euclidiennes entre les points en utilisant le signal comme unité

Après constitution des têtes de liste selon les variations les plus significatives (i.e. choix des probe sets ayant la plus faible valeur absolue de FDR), les distances euclidiennes entre toutes les conditions biologiques ont été calculées par PCA (analyse en composantes principales). Pour calculer, par exemple, la distance entre la condition BMS et SN38, on compare les têtes de liste d'une taille donnée T des comparaisons BMS versus CONTROLE et SN38 versus CONT. Soit N, le nombre de probe sets communs à ces deux têtes de liste, la distance $d(BMS, SN38) = (1 -$

N/T)*100 et on a divisé les molécules en groupes comme c'est indiqué dans la partie résultats.

Ces distances sont représentés en matrice, qui permettent de visualiser les distances entre les profils d'expression génique (exemples : figures 42 et 43). Les couleurs bleues signifient que deux profils sont proches, les couleurs rouges que les profils sont éloignés.

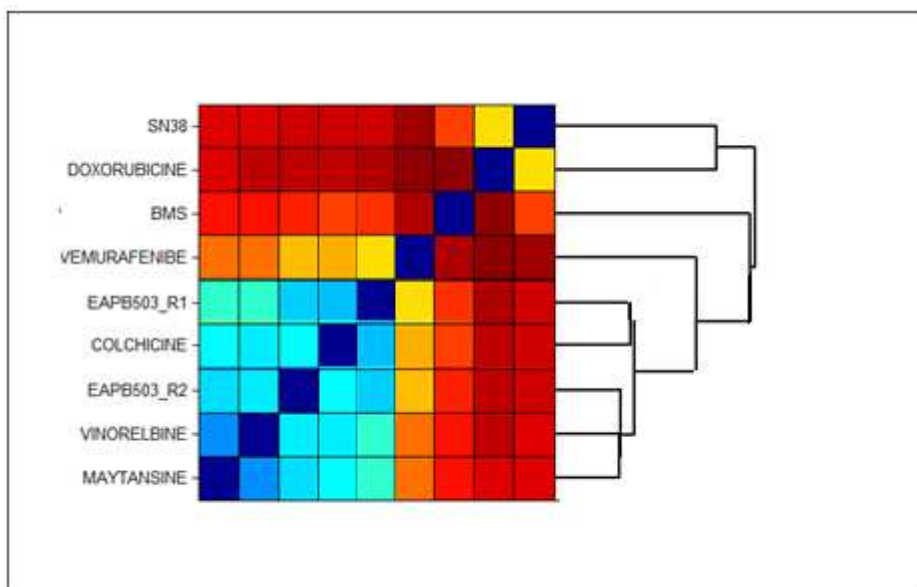


Figure 42 : Matrice de distances et dendrogramme associé pour les puces du groupe 1.

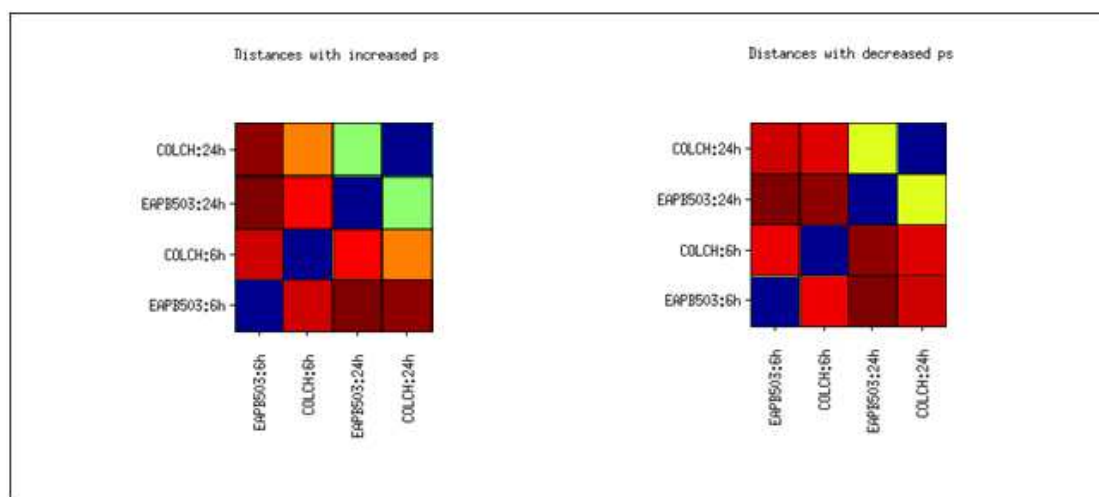


Figure 43 : Matrice de distances des puces du groupe 2.

III.6.5.3 Sélection des probe sets

Notre objectif n'étant pas de trouver un gène cible mais d'élucider le ou les mécanismes d'action de notre molécule, l'ensemble des gènes altérés (sur- ou sous-exprimés) a été sélectionné. Le bruit de fond (faux positifs) généré par de telles listes a été par la suite géré grâce à l'utilisation de logiciels permettant de réduire cette problématique (Model-based Gene Set Analysis (MGSA) entre autre).

Dans le but de déterminer précisément le(s) mécanisme(s) d'action du EAPB0503, des listes de probe sets (sur- ou sous-exprimés) ont été créées à partir de l'union ou de l'intersection de plusieurs comparaisons de « conditions biologiques » décrites dans le tableau 10. Ces comparaisons seront plus amplement décrites dans la partie résultats. Cette procédure a été faite en utilisant les opérations ensemblistes correspondantes.

III.6.5.4 Enrichissement fonctionnel

III.6.5.4.1 Model-based Gene Set Analysis (MGSA)

MGSA, est un algorithme du logiciel ontologizer, qui permet d'interroger la base de données gene ontologie (GO). MGSA a été choisi car il est robuste au bruit, il est donc inutile d'avoir une délimitation rigoureuse des gènes répondeurs(244). Basé sur un modèle mathématique Bayésien, il permet de gérer des grosses tailles de listes des gènes et la redondance dans les résultats (centaines de chevauchement possibles par une analyse classique) due à la structure de GO. On obtient en résultats des termes GO « actifs », i.e. des fonctions biologiques correspondantes aux gènes d'intérêts. Les termes GO dits « actifs » sont les termes les plus surreprésentés dans une comparaison. Les résultats significatifs sont exprimés à travers un score, Marginal Position Probability (MPP), qui correspond à la probabilité des termes GO pour être actif. Les analyses sont effectuée dix fois pour chaque liste et l'on garde les termes GO pour lesquels la moyenne de dix scores (MPP) est supérieure ou égale à 0.5 dans au moins trois analyses. MGSA est sensible à la longueur des listes de probe sets et pour couvrir le maximum des gènes on a décidé à utiliser les têtes de listes des probe sets (top listes) de longueurs croissants comme suite 50, 100, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, et 2000 au totale 12 listes. Cette démarche d'analyse a été développée et réalisée par Michel BELLIS.

III.6.5.4.2 RESN

Devant le grand nombre de termes GO générés (49 -90 termes GO) par l'analyse MGSA, en dépit de la gestion de la redondance qu'il permet, nous avons cherché à regrouper les termes GO proches afin de faciliter l'analyse ultérieure. Il n'y a pas à proprement parler de mesure de distance possible entre deux termes GO particulier.

Ce que l'on peut quantifier c'est le niveau d'information que contient un terme GO particulier par la méthode définie par Resnik(253). Cependant, le logiciel RESN ne détecte pas tous les termes GO d'intérêt. RESN n'est pas robuste et il ne nous apporte l'analyse nécessaire pour tirer des hypothèses mécanistiques de l'enrichissement fonctionnel par MGSA.

III.6.5.4.3 REVIGO

REVIGO (REduce and VISualise les termes GO, <http://revigo.irb.hr/>) a été utilisé pour pallier à ce problème. REVIGO a été développé pour résumer de longues listes de termes GO en supprimant les termes redondants. Ces termes peuvent être visualisés dans des nuages de points, des graphiques interactifs, ou des nuages de tags. Dans notre analyse j'ai utilisé les graphiques interactifs par tree map.

III.6.5.4.4 GeneMANIA

Le programme GeneMANIA (<http://www.genemania.org/>) a permis de mettre en évidence, via la fonction « génération des réseaux et analyse fonctionnelle », des réseaux intermoléculaires à partir de gènes différemment exprimés (sur-ou sous-exprimés).

III.6.5.4.5 PATHWAY LINKER

Pathway LINKER (<http://pathwaylinker.org/>) permet d'identifier et de visualiser les premiers réseaux d'interaction des protéines d'intérêt. Il analyse l'implication dans des voies de signalisation des protéines issues de ces sous-réseaux, et fournit des liens vers d'autres ressources en ligne(254). Les bases d'interactions protéiques inclues sont BioGRID (version 3.0.64), STRING (version 8.3), et HPRD (version 5) et les bases d'interactions génétiques sont l'Interactome Worm (version 8) et Droid (version 2010_08). Les voies de signalisation de références ont été établi par l'intégration des bases des données KEGG (version 53.0), Reactome (version 33), et Signalink (version 1.0). Dans chaque cas, les identifiants de gènes / protéines ont été cartographiés dans UniProt, et relié dans les différentes bases (FlyBase ID, WormBase ID, Ensembl gène et la protéine ID, etc.) (figure 44).

Cytoscape Web une jQueryUI est utilisés pour la visualisation et l'interface utilisateur. Pour estimer l'effet de la signalisation des protéines interrogés (queried proteins) et leurs premiers interacteurs voisins, PathwayLinker teste pour chaque voie de signalisation si elle est statistiquement significativement surreprésentée parmi les protéines interrogées. Premièrement, les protéines interrogés, et leurs premiers interacteurs voisins, sont répertoriés. Ensuite, pour chaque voie de

signalisation, S, PathwayLinker compte le nombre (N) de ces fonctions de protéines dans S. Dernièrement, le p-value de la surreprésentation de chaque voie est calculée en trouvant la probabilité d'observer au moins N telles protéines (par exemple, une distribution hypergéométrique est appliquée). Pour plus de détails, voir http://pathwaylinker.org/pathway_score.

PathwayLinker
Link proteins to signaling pathways · Design & evaluate experiments

Report page

Protein: CCND1
UniProt: P51817
Ensembl: ENSP00000262848
GO: annotations at QuickGO

Signaling pathways
PRKX
Apoptosis (KEGG) - Open »
Calcium (KEGG)
Cardiomyopathy (KEGG)
Chemokine (KEGG)
Cholerae infection (KEGG)
Gap junction (KEGG)
GnRH (KEGG)
Hedgehog (KEGG)
INS (KEGG)
LTP (KEGG)
MAPK (KEGG)
Melanogenesis (KEGG)
Olfactory (KEGG)
Oocyte (KEGG)
Pituit (KEGG)
Smooth muscle (KEGG)
Taste (KEGG)
WNT (KEGG)

Highlight interactions
Select from the data sources below to highlight interactions listed in at least one of all of:
BioGrid
HPRD
STRING "db"
STRING "exp"
Select all
Clear all

Network
of the selected protein and its first neighbor interactors
Protein: cdc-2
UniProt: Q98819
Signaling pathways: KEGG -
SignalLink: IGF
Interaction: cdc-25.1 - cdc-2
Source (database) | PubMed ID |
BioGrid | 17887480
STRING "exp" |
Protein: cdc-25.1
UniProt: Q44552
Signaling pathways: KEGG -
SignalLink: -
with Cytoscape.Web and JQueryUI

Highlight
Proteins by selecting their signaling pathways - Open »
Interactions by source dataset - Open »

Functions
Single proteins Select a protein --- select from 48 --- - Open »
All proteins Select a tool --- select from 2 --- - Open »
DAVID
PharmGKB

Statistics
Signaling pathways Which pathways are overrepresented among the displayed proteins? - Open »

Download
Short stable address of this report (download/email) - Open »
Report & network in another format PDF - Open »
TXT

Overrepresented signaling pathways
Here we consider all displayed proteins and all signaling pathways from the selected pathway data sources. We ask the following question: Which signaling pathways are statistically significantly overrepresented among the displayed proteins compared to the set of all *Caenorhabditis elegans* proteins?
For a detailed description of the statistical test and the definition of the P value shown in the table below see the section of this FAQ. Pathways below 0.05 are marked.

Signaling pathway	Proteins in pathway	Displayed	P-value
MAPK (KEGG)	5	15	0.0670
Dorsal-ventral (KEGG)	2	9	0.0014
HS set (KEGG)	2	15	0.0041
ErbB (KEGG)	2	25	0.0012
EGF family (SignalLink)	2	40	0.0001
JAK-STAT (KEGG)	1	10	0.03
TGF-beta (SignalLink)	1	10	0.03
EGF (SignalLink)	1	10	0.042
Hedge (SignalLink)	1	22	0.063
Oocyte (KEGG)	1	33	0.077

Highlight proteins in signaling pathways
KEGG: 09 pathways sorted by protein number -
Gap junction (29 proteins) | Adhesion (9) | Melanogenesis (11)
Sarcoplasmic muscle (10) | GPCR (1) | Wnt (1)
Reactome: 9 pathways sorted by protein number -
NGF (7 proteins) | Immune (6) | EGFR (4)
PDGF (3) | Ins receptor (2) | Opioid (2)
FGFR (1) | GPCR (1) | Wnt (1)
SignalLink: 5 pathways sorted by protein number -
EGF/MAPK (4 proteins) | WNT (4) | TGF-beta (3)
Hh (1) | JAK-STAT (1)

PathwayLinker report
This is the PDF formatted report of your PathwayLinker job (khorasabadi; February 5, 2011).

Address
Web address of report (html) <http://pathwaylinker.org/job.cgi?i=128992322696300>
Web address of report (pdf) <http://pathwaylinker.org/pdf.cgi?i=128992322696300>
Feedback and questions: <http://pathwaylinker.org/feedback>

Parameters
Organism: *Wormy elegans*
Search terms and selected proteins: CCND1
Are unannotated (UniProt/KEGG/TrEMBL) proteins allowed as interactors? no
Sources of interactions: BioGrid, HPRD, STRING "db", STRING "exp"
Sources of signaling pathways: KEGG, Reactome, SignalLink

Interactions of the selected proteins. In the right column of the table-link on the letter [P] after a protein to view the PubMed abstracts of the articles providing evidence for the interaction of that protein with the selected proteins in the left column of the same row.

Short stable address of this report (download/email)
Report & network in another format PDF - Open »
TXT

Short URL of this report
Right-click and save this link or Send the link of the report to this email address: [input] Send »

Figure 44 : « Report page » de PathwayLinker(254).

P-values: Which signaling pathways are significantly overrepresented in the set of displayed proteins containing the queried protein(s) and its (their) first neighbor interactor(s)? See detailed explanation below the table. p-values below 0.01 are marked.

Signaling pathway	Displayed proteins	All proteins of pathway	P-value
MAPK (KEGG)	84	393	7.4e-101
Cancer (KEGG)	83	502	1.1e-89
NT (KEGG)	52	187	3.8e-69
NGF (Reactome)	51	211	2.6e-64
EGF/MAPK (SignalLink)	54	388	3.5e-54
Cytokine (KEGG)	49	323	3.9e-51
Toll-like (KEGG)	38	145	1.1e-49
Chemokine (KEGG)	44	243	1.4e-49
Immune (Reactome)	49	384	2.5e-47
ErbB (KEGG)	36	145	3.6e-46
JAK-STAT (KEGG)	36	203	2e-40
CML (KEGG)	30	112	8.7e-40
TGF (KEGG)	30	112	8.7e-40
Prostate cancer (KEGG)	30	127	6e-38
GnRH (KEGG)	28	136	1.1e-33
T cell (KEGG)	30	172	1.2e-33
Pancreatic cancer (KEGG)	25	111	2.9e-31
Adhesion (KEGG)	34	312	8e-31
Ubiquitin (KEGG)	28	184	9.2e-30
Apoptosis (KEGG)	25	134	4.7e-29
Fc-epsilon (KEGG)	23	101	5.4e-29

Figure 45 : exemple de rapport après utilisation de pathwaylinker.

La figure 45 montre les différentes voies de signalisation impliquées pour les protéines d'intérêt et ses premiers voisins (Queried protéines and It first Neighbors). Les 10 premières voies de signalisation (selon leurs P-value) ont ensuite été sélectionnées. J'ai ensuite calculé des pourcentages. Pourque je puisse calculer un pourcentage j'ai gardé la puissance 101, et j'ai fait pareil pour les neufs autres voies de signalisation. Ensuite j'ai calculé la somme totale de ces puissances enfin j'ai appliqué cette règle %MAPK= 101/Totale*100.

III.7 Préparation de lysats cellulaires, extraction des protéines et ses analyses

III.7.1 Conception de l'étude pathscan : préparation des extraits protéiques

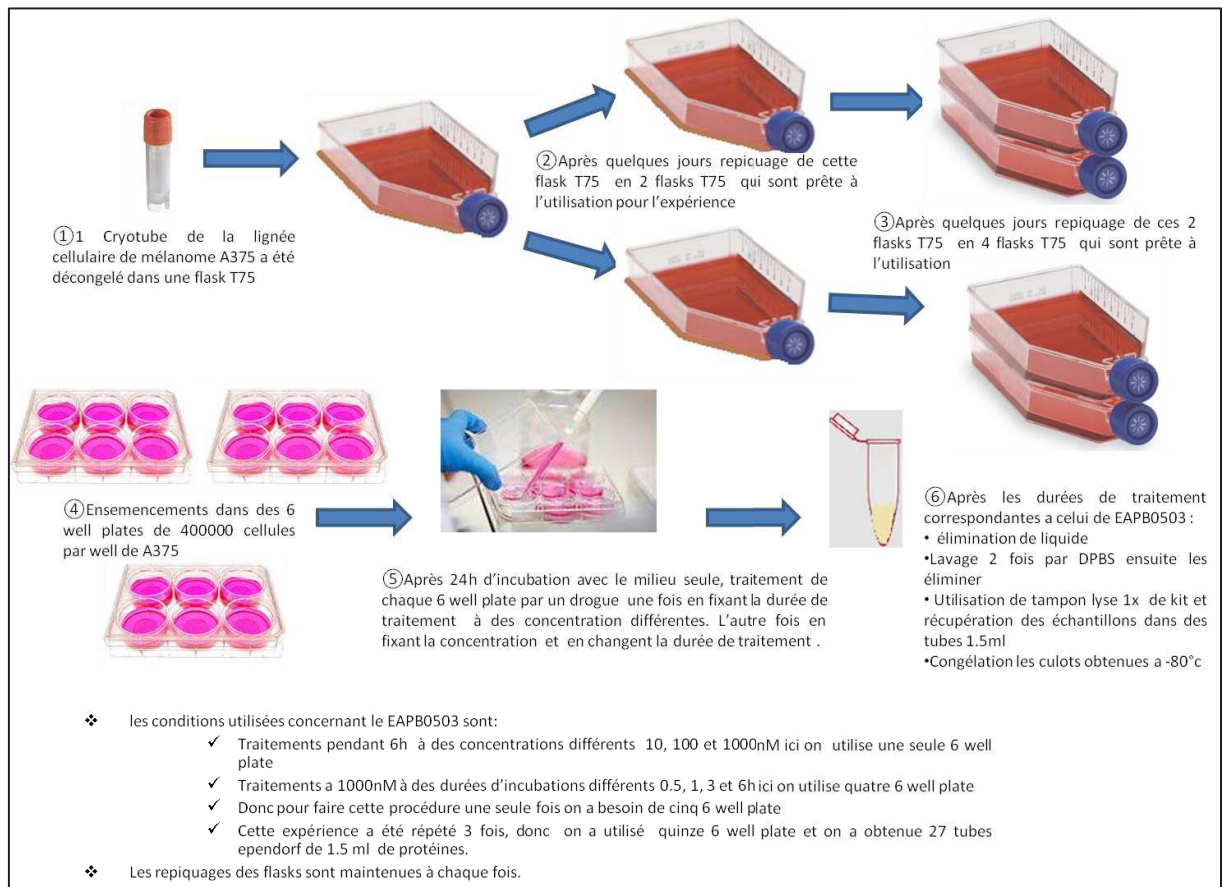


Figure 46 : Les étapes nécessaires pour la préparation des extraits protéiques à partir de la lignée cellulaire A375

Les protéines sont extraites par lyse cellulaire à l'aide du tampon lyse (cell Signaling Technology) provenant de Kit PathScan (cell Signaling Technology) (figure 46).

1. Décongeler 1X de tampon de lyse cellulaire et le bien mélanger. ajouter en plus sur ce tampon avec du fluorure de phénylméthylsulfonyl (de PMSF) jusqu'à une concentration finale de 1 mM, ou d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases tels que Protéase Inhibiteur Cocktail (100X) ou de la protéase / Phosphatase Inhibiteur Cocktail (100X). Gardez le tampon de lyse sur la glace.
2. Retirez le milieu et lavez les cellules une fois avec DPBS 1X glacée.
3. Retirer le DPBS et ajouter de tampon de lyse cellulaire froid. Pour les cellules adhérentes, en utilisant un tampon de lyse cellulaire 0,5 ml pour chaque plaque (10 cm de diamètre). Incuber sur la glace pendant 2 minutes.

4. Incliner la plaque et collecter le lysat dans un micro tube propre.
5. Etape facultative: Microcentrifuger le lysat à la vitesse maximale pendant 3 minutes à 4 ° C et transférer le surnageant dans un nouveau tube. Cette étape n'est généralement pas nécessaire, mais elle peut aider à éliminer les particules ou les gros débris cellulaires, si elle est présente. Les lysats peut être utilisé immédiatement ou conservés à -80 ° C dans des aliquotes à usage unique.
6. Immédiatement avant la réalisation du test, diluer les lysats de 0,2 à 1,0 mg / ml en Array tampon diluant. Mettez de côté sur la glace.

III.7.2 Dosage des protéines par la méthode de BSA



Figure 47 : les différents réactifs de kitDC™ (détergent compatible) protein assay (<http://www.bio-rad.com/>)

Les protéines extraites des cellules sont détectées et quantifiées par la méthode de DC™ (détergent compatible) protein assay (figure 47) est un test colorimétrique pour la concentration de protéine suivante la solubilisation avec un détergent. La réaction est similaire à l'essai Lowry, mais il a été modifié pour gagner du temps. Le dosage de protéine DC ne nécessite qu'une seule incubation de 15 minutes, et l'absorbance est lue pendant au moins 2 heures.

En utilisant la procédure standard, le dosage est utilisé avec des échantillons ayant des concentrations en protéines comprise entre 0,2 et 1,5 mg / ml et nécessite seulement 20 µl d'échantillon. Le procédé peut facilement être adapté à un microdosage de faible concentration. Le dosage de microplaques réduit le volume d'échantillon requis pour seulement 5 µl. Le dosage de la protéine DC est mesuré à 650-750 nm avec un spectrophotomètre de laboratoire standard ou un lecteur de microplaques. Les Kits de dosage de protéine DC offrent soit albumine de sérum bovin

ou de bovine γ -globuline standard sets. Ainsi, le changement d'absorbance est proportionnel à la concentration des protéines dans l'échantillon.

Nos échantillons à doser ont été faites comme suivant :

1. Préparation de réactif de travail A' qui est constitué de 20 μ l de réactif S avec 1 mL de réactif A.
2. Préparer 3-5 dilutions d'une protéine standard ayant des concentrations en protéines comprise entre 0,2 et 1,5 mg / ml. Une courbe d'étalonnage est établie grâce à cette protéine standard par ce spectrophotomètre.
3. Pipette 20 μ l de standard (tampon lyse) et des échantillons dans des eppendorf 1.5 mL propres et sec.
4. Ajouter 100 μ l de réactif A' pour chaque eppendorf puis vortexer.
5. Ajouter 800 μ l de réactif B pour chaque tube à tester et les vortexer immédiatement.
6. Après 15 minutes, L'absorbance de chaque dilution est mesurée à 750nm par la suite dans un spectrophotomètre (*Eppendorf BioPhotometer*). Une courbe d'étalonnage est déjà établie ainsi par ce spectrophotomètre.

III.7.3 Analyse des protéines d'intérêt

Deux analyses ont été réalisées pour les protéines d'intérêts, la première c'est l'analyse avec le pathscan et le deuxième par western blot.

III.7.3.1 Pathscan Séparation et transfert des protéines

III.7.3.1.1 Description

Le PathScan® Intracellular Signaling Array Kit (Lecture Chemiluminescent) est une lame base d'Array d'anticorps fondée sur le principe sandwich immunassay. Le kit d'Array permet la détection simultanée de 18 molécules importantes et bien caractérisés dans la signalisation lorsqu'ils sont phosphorylée ou clivé. Les anticorps spécifique de capture de la cible ont été repérés en double exemplaire sur les lames de verre enduit de nitrocellulose. Chaque kit contient deux lames 16-pad par lame, permettant à l'utilisateur de tester jusqu'à 32 échantillons et générer 576 points de données en une seule expérience. Le lysat cellulaire est incubé sur la lame suivie d'un cocktail d'anticorps biotinylé de détection (antibody cocktail). La réactif streptavidine conjuguée à de peroxydase HRP et-LumiGLO® sont ensuite utilisés pour visualiser la détection d'anticorps lié par chimioluminescence. Une image de la lame peut être capturée soit avec un système d'imagerie numérique ou argentique chimioluminescent standard. L'image peut être analysée visuellement ou les intensités ponctuelles quantifiée en utilisant un logiciel d'analyse de réseau.

III.7.3.1.2 Spécificité

Le PathScan® Intracellular Signaling Array Kit (Lecture Chemiluminescent) détecte les protéines cellulaires indiquées et les nœuds de signalisation uniquement lorsqu'ils sont phosphorylés ou clivés au niveau des résidus spécifiés. (Voir tableau Target Map figure 48).

Intracellular Signaling		
Target	Phosphorylation Site	Modification
1	Positive Control	N/A
2	Negative Control	N/A
3	LRK1/2	Thr202/Tyr204
4	Stat1	Tyr701
5	Stat3	Tyr705
6	Akt	Thr308
7	Akt	Ser473
8	AMPK α	Thr172
9	S6 Ribosomal Protein	Ser235/236
10	mTOR	Ser2448
11	HSP27	Ser78
12	Bad	Ser112
13	p/11 S6 Kinase	Thr389
14	PRAS40	Thr246
15	p53	Ser15
16	p38	Thr180/Tyr182
17	SAPK/JNK	Thr183/Tyr185
18	PARP	Asp214
19	Caspase-3	Asp175
20	GSK-3 β	Ser9

Figure 48 : Target map de PathScan® Intracellular Signaling Array Kit (Lecture Chemiluminescent) #7323

Aucune réactivité croisée significative n'a été observée entre les cibles. Ce kit est optimisée pour les lysats de cellules dilués à une concentration totale en protéines comprise entre 0,2 et 1 mg / ml (voir le protocole du kit).

III.7.3.1.3 Procédure de dosage

1. Apportez des lames de verre et un tampon de blocage à la température ambiante avant utilisation.
2. Préparer 1X Array Wash Buffer en diluant 20X Array Wash Buffer dans de l'eau déminéralisée. Conserver à température ambiante. Diluer 1 ml 20X Array Wash Buffer avec 19 ml d'eau déminéralisée. Étiqueter comme 1X Array Wash Buffer
3. Préparer 1X Détection cocktail d'anticorps comme suit:
 - ✓ Pour exécuter seulement 1 lame: Diluer 150 μ l de 10X Détection Antibody Cocktail avec 1350 μ l d'Array Diluent Buffer.
 - ✓ Pour exécuter 2 lames: Diluer 300 μ l de 10X Détection Antibody Cocktail avec 2700 μ l d'Array Diluent Buffer. * Garder sur la glace.

4. Préparer 1X HRP-streptavidine liée comme suit:
- ✓ Pour exécuter seulement 1 lame: Diluer 150 μl de 10X HRP-streptavidine liée avec 1350 μl d'Array Diluent Buffer.
 - ✓ Pour exécuter 2 lames: Diluer 300 μl de 10X HRP-streptavidine liée avec 2 700 μl d'Array Diluent Buffer. * Garder sur la glace.
5. Fixez le multi-puits joint à la lame de verre (voir figure49 ci-dessous):

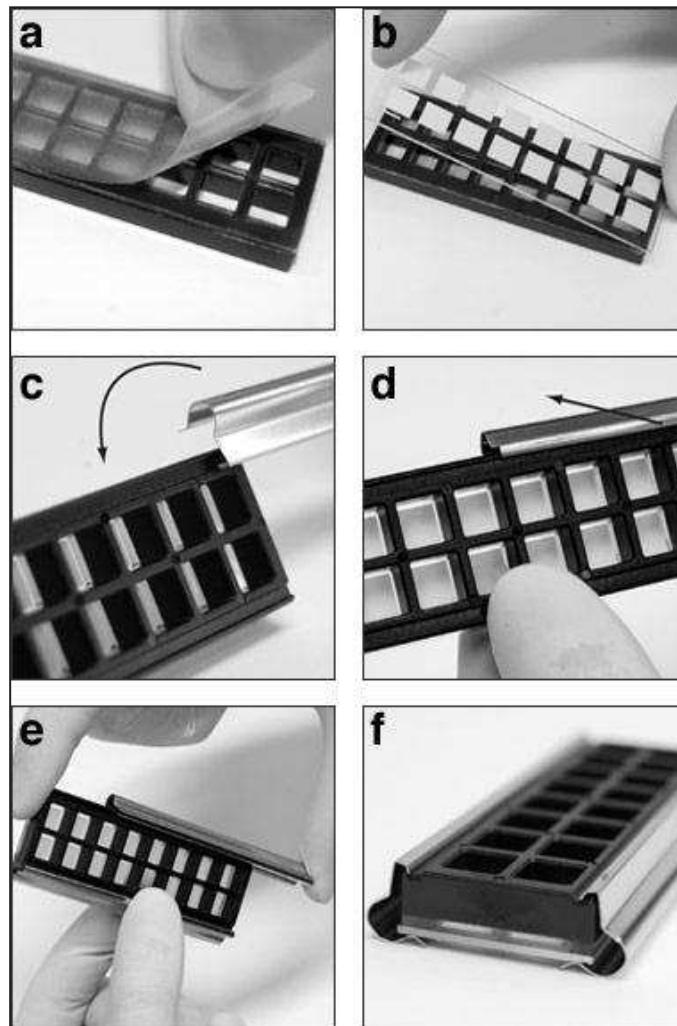


Figure 49 : les Différents étapes nécessaires pour monter la plaque multi-puits.

a. Placez la plaque multi-puits face vers le bas sur la paillasse (la couche de silicone doit être orientée vers le haut). Retirer le film plastique de protection.

b. Placez soigneusement la lame de verre en dessus de la plaque à puits multiples avec les plots de nitrocellulose vers le bas tout en alignant les plots avec les ouvertures dans la plaque. La ligne d'orientation devrait apparaître dans le coin supérieur gauche lorsque la lame est orientée verticalement.

c. Insérer le clip de métal dans la gorge de la plaque et tourner le clip dans la position verrouillée. Assurez-vous que le clip se trouve sur le même côté que la ligne d'orientation de la diapositive.

d. Faire glisser le clip en place.

e. Enclencher le second clip de métal à l'autre côté de l'ensemble de la même manière et le glisser en place.

f. L'Array assemblée est prêt à utiliser.

6. Ajouter 100 µl Blocking Buffer dans chaque puits et couvrir avec du Sealing tape. Incuber pendant 15 minutes à température ambiante sur un agitateur orbital.

Remarque: Ne laissez pas les électrodes se dessécher à tout moment au cours de l'essai.

7. Décanter l'Array Blocking Buffer en effleurant doucement le liquide dans un évier ou tout autre réceptacle à déchets approprié. Ajouter 50 -75 µl lysat dilué dans chaque puits et couvrir avec du Sealing tape. Incuber pendant 2 heures à la température ambiante (ou pendant une nuit à 4 ° C) sur un agitateur orbital).
8. Décanter le contenu des puits en tapotant doucement le liquide dans un évier ou tout autre réceptacle à déchets approprié. Ajouter 100 µl (1X) Array Washing Buffer dans chaque puits et incuber pendant 5 minutes à température ambiante sur un agitateur orbital. Répétez trois fois. Décanter bien le contenu.
9. Ajouter 75 µl (1X) Détection Antibody cocktail à chaque puits et couvrir avec du Sealing tape. Incuber pendant 1 heure à température ambiante sur un agitateur orbital.
10. Laver 4 X 5 minutes avec 100 µl (1X) Array Wash Buffer comme dans l'étape 8.
11. Ajouter 75 µl (1X) HRP-streptavidine liés à chaque puits et couvrir avec du Sealing tape. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante sur un agitateur orbital.
12. Laver 4 X 5 minutes avec 100 µl (1X) Array Wash Buffer comme dans l'étape 8.
13. Enlever la plaque multi-puits en tirant le bas des clips métalliques loin du centre de la lame, puis peler la lame et la plaque à part.
14. Placez la surface de la lame dans un plat en plastique (une boîte de pointe couverture de pipette propre fonctionne bien). Laver rapidement avec 10 ml (1X) Array Wash Buffer.
15. Diluer et combiner LumiGLO® et le réactif peroxyde immédiatement avant l'emploi (pour faire 10 ml d'une solution 1X, combiner 9 ml d'eau déminéralisée avec 0,5 ml de 20X LumiGLO® et 0,5 ml de peroxyde 20X). Remarque pour les utilisateurs de films Kodak Biomax: Cette dilution de LumiGlo® / peroxyde peut

nécessiter de très courtes durées d'exposition (2-3 secondes) pour certaines cibles. Pour des temps d'exposition plus pratiques (20-30 secondes) Ajouter 20 ml d'eau déminéralisée pour le 10 ml LumiGlo® / peroxyde pour faire un mélange 3 fois plus diluée de réactif chimioluminescent.

16. Décanter Array Wash Buffer et couvrir la lame avec LumiGLO® réactif / peroxyde.
17. Transférer la lame en assurant qu'elle est toujours couverte par LumiGLO® réactif / peroxyde (ajouter une petite quantité sur le dessus de la lame).
18. Immédiatement capturer une image de la lame à l'aide d'un système d'imagerie numérique apte à détecter des signaux chimioluminescents. Si vous le souhaitez, quantifier les intensités de chaque spot à l'aide des logiciels d'analyse d'image disponible dans le commerce et dans notre cas on a utilisé « l'image G ». Alternativement, le film chimioluminescent peut être utilisé. Exposer le film pour 2-30 seconds. Développer le film en utilisant un développeur de film automatisé.

Remarque: Si les deux lames sont utilisées, il est recommandé de ne pas les exposer simultanément dans la même cassette de développement. Dans ce cas, laisser la deuxième lame dans le Wash Buffer (étape 12) tout en procédant à des étapes 13-18 en utilisant la première lame. Après que la première lame est terminée, suivez les étapes 13-18 en utilisant la deuxième lame en diluant fraîchement le LumiGLO® réactif / peroxyde.

III.7.3.1.4 Analyse des images par l'image G

La révélation des lames a été réalisée à l'aide d'un d'imager CHEMIDOC (Biorad). L'intensité de chimioluminescence de chaque dot a été quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ (National Institute of Health, NIH). Pour chaque puits, il y a 3 contrôles positifs (dot 1, figure 50) et 3 contrôles négatifs (dot 2, figure 48). La valeur moyenne des dots 2 (bruit de fond) sera ôtée de toutes les autres valeurs. La valeur moyenne des dots 1 correspond au 100% de la révélation. Toutes les valeurs de nos conditions seront alors exprimées en pourcentage par rapport contrôle positif (100%, dot 1).

Les données sont alors représentées sous forme de graphiques avec des écarts types à 5% d'erreur.

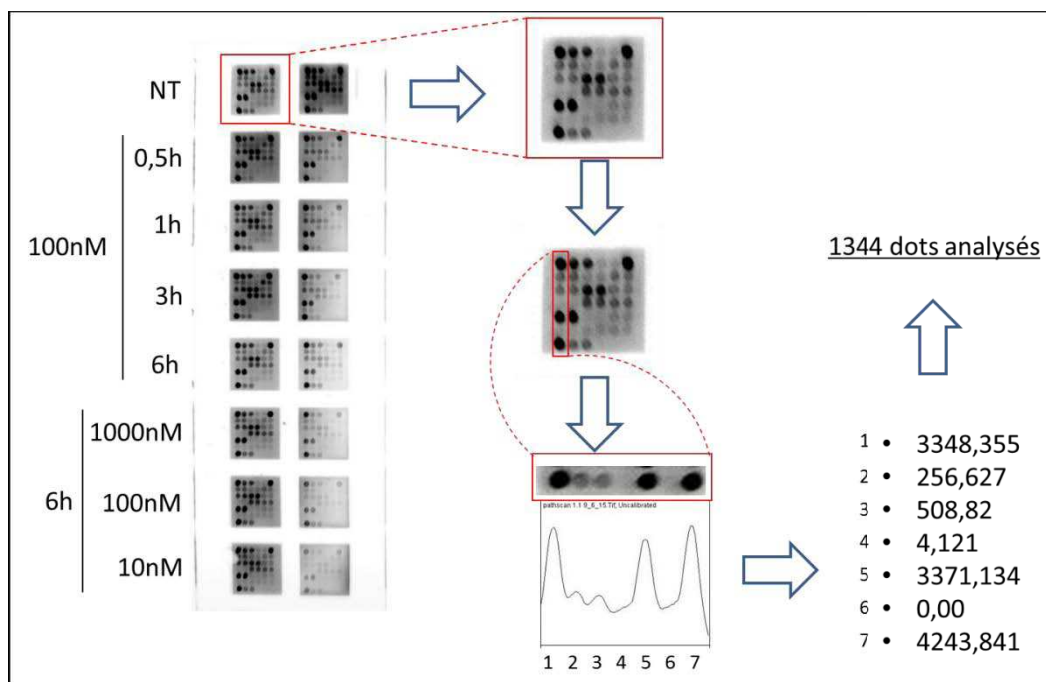


Figure 50 : Détermination des voies métaboliques activées ou inhibées à l'aide du kit PathScan® Intracellular Signaling Array Kit. L'intensité des signaux chimioluminescent est déterminée à l'aide du logiciel ImageJ (NIH, <https://imagej.nih.gov/ij/>).

III.7.3.2 Analyse par Western Blot (WB)

Les cellules ont été lavées avec du PBS puis incubées dans du tampon de lyse (cell Signaling Technology) pendant 3 min à température ambiante. Les lysats ont ensuite été centrifugés à 8000g pendant 10min à 4°C, et le surnageant a été congelé à - 80°C. Les protéines purifiées ont été quantifiées par la méthode de Lowry (246), à l'aide du kit DC Protein Assay (Biorad). Dans un premier temps, les protéines sont dénaturées par chauffage à 75°C pendant 5 min dans du *Laemmli* (Sigma-Aldrich - St Quentin-Fallavier, France). Ces protéines (20 à 50 µg) sont ensuite déposées dans un gel à 12 % d'acrylamide. Par la suite, les protéines sont séparées par électrophorèse (85 V pendant 90 min) SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose (100 V pendant 60 min), puis visualisées par coloration au rouge Ponceau.

La membrane de nitrocellulose renfermant les protéines transférées est incubée toute la nuit à 4°C, sous agitation dans un tampon de blocage qui contient 5% de lait écrémé ou de BSA (Sigma-Aldrich; St Quentin-Fallavier, France). Le lendemain, les membranes ont été lavées 3 fois par une solution de TBS-Tween (TTBS) 20 (0,1%), puis incubée durant deux heures, à 4°C et sous agitation, en présence de l'anticorps primaire dilué dans une solution à 5% de lait ou de BSA dans le TTBS. Ses solutions contenant les anticorps polyclonaux de lapin ou de souris (Sigma-Aldrich) spécifiques des protéines codées par les gènes étudiés, ou anti- β-actine (contrôle) dilués respectivement au 1/250, et 1/1000. Puis, les membranes ont été lavées 3 fois par

une solution de TBS-Tween 20 (0,1%), suivi par une incubation pendant 1h à température ambiante dans une solution contenant l'anticorps secondaire polyclonal anti-lapin ou anti-souris couplé à HRP (Sigma-Aldrich), dilué au 1/200000. Enfin, les membranes ont été lavées à l'aide d'une solution de TBS-Tween 20 (0,1%), et la fixation des anticorps a été révélée par autoradiographie à l'aide du kit de détection de chimioluminescence ECL (Amersham). Les anticorps (primaires et secondaires) utilisés dans nos travaux sont indiqués dans le tableau.

IV. D. Les Résultats

IV.1 Partie 1- Criblage et tubuline

IV.1.1 Introduction

Un criblage *in vitro* de l'activité antitumorale des molécules imidazo[1,2-*a*]quinoxalines a été réalisé sur la lignée cellulaire de mélanome humain A375. Pour le composé le plus actif, son activité a été également testée sur d'autres lignées cellulaires tumorales humaines, de sein, colon et lymphome. A l'exception du lymphome pour lequel les cellules sont en suspension, toutes les lignées sont adhérentes.

IV.1.2 Criblage *in vitro* des Imidazoquinoxalines : détermination des CI_{50} sur la lignée de référence (A375) puis sur d'autres types de lignées cancéreuses.

IV.1.2.1 Caractérisation de la lignée cellulaire choisie

Depuis 2010, l'évaluation de la cytotoxicité de nombreux dérivés de la série imidazoquinoxaline (imiqualines) a été réalisée sur la lignée cellulaire tumorale de mélanome humain (A375), utilisée comme lignée de référence(195,196,199,255,256).

Dans ma thèse, la lignée A375 de mélanome humain est la lignée cellulaire choisie pour le criblage de l'activité cytotoxique des imiqualines (dérivés d'**EAPB0503**). Cette lignée sera aussi utilisée lors des études de transcriptomique développées dans le cadre de la recherche du mécanisme d'action des imiqualines.

La lignée cellulaire A375 a la particularité d'être une lignée BRAF mutée. Les mutations de BRAF ont été signalées dans plusieurs types de cancer, y compris le mélanome (70% des cas), la thyroïde (30-70%), l'ovaire (15-30%), et le cancer colorectal (5-20%). Le gène BRAF muté a une activité de kinase constitutive et provoque une hyperactivation de la protéine kinase BRAF par une voie mitogène (50). Les mélanomes sont caractérisés par une grande hétérogénéité moléculaire. Cette hétérogénéité est notamment observée au niveau du gène BRAF qui est muté dans 50% des mélanomes. L'hétérogénéité moléculaire des mélanomes est l'une des causes du génotypage de BRAF. L'identification de la mutation BRAF V600 dans les mélanomes métastatiques est indispensable pour définir la prescription d'une thérapie ciblant cette mutation.

Les lignées cellulaires tumorales pouvant être instables génétiquement, nous avons voulu caractériser les 3 lignées présentes au laboratoire afin de sélectionner la lignée

cellulaire homozygote pour BRAF V600. Cette lignée sera ensuite utilisée dans mes différents travaux de thèse.

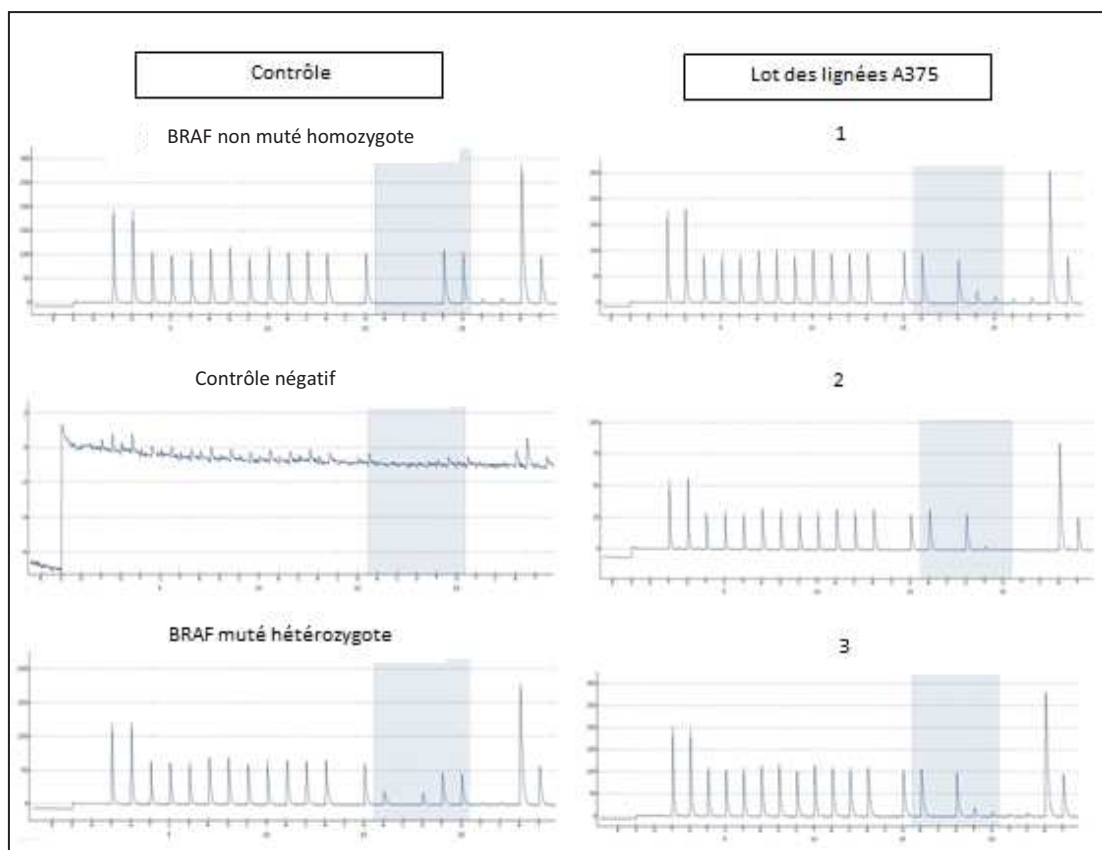


Figure 51 : Statuts de la mutation de BRAF sur 3 lots des lignées A375 par rapport aux contrôles.

Analyse par pyroséquençage de séquences BRAF mutées sur le codon 600 d'une même lignée cellulaire du mélanome malin A375 de différentes provenances. Dans chaque panel, la séquence codon 600 est indiquée par la zone colorée en bleu.

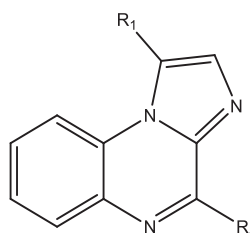
L'ADN génomique a été isolé d'une même lignée cellulaire du mélanome malin A375 de différentes provenances. L'analyse par pyroséquençage de séquences BRAF mutées sur le codon 600 a été réalisée. La séquence du BRAF non muté homozygote en codon 600 est GTG. En revanche celle codon pour BRAF^{V600E} est GAG. La séquence de BRAF^{V600E} hétérozygote contient un mélange de GAG et GTG. D'après la figure 51, les résultats montrent que les différentes origines d'A375 (1, 2, et 3) sont homozygotes pour la séquence BRAF^{V600E}. Dans mes études j'ai choisi de travailler avec la lignée A375 notée 3 puisque d'autres travaux avaient précédemment été réalisés sur cette même lignée pour le même projet. L'évaluation de la cytotoxicité des Imiquinalines a donc été réalisée sur cette lignée notée 3.

IV.1.2.2 Cytotoxicité des composés EAPB synthétisés

Les Cl_{50} moyennes de trois expériences indépendantes et les écarts types correspondants de chaque produit testé *in vitro* sur la lignée A375 de mélanome sont présentés dans le tableau 16. Ces résultats montrent que toutes les molécules testées ont une activité cytotoxique supérieure à celle de l'imiquimod (Cl_{50} , 70 μ M), de la dacarbazine (Cl_{50} , 323 μ M), et de la fotémustine (Cl_{50} , 173 μ M). Seul **EAPB0803** (Cl_{50} , 122 μ M) présente une activité cytotoxique inférieure à celle de l'imiquimod. Tous les composés testés ont une activité cytotoxique inférieure à la colchicine (Cl_{50} , 0,01 μ M) et équivalente ou supérieure à celle du vémurafénib (Cl_{50} , 0,14 μ M).

EAPB0503 (Cl_{50} , 0,2), qui correspond au composé leader de notre étude, a une activité supérieure de l'ordre de 2, 10, et 100 fois à celle de la plupart des autres composés synthétisés. Seuls, **EAPB0502** (Cl_{50} , 0,2) et **EAPB01803** (Cl_{50} , 0,22) présentent une activité équivalente à celle d'**EAPB0503**. **EAPB02903** (Cl_{50} , 0,08) présente une activité 2,6 fois supérieure à celle d'**EAPB0503**. **EAPB0502** et **EAPB02903** sont des métabolites identifiés d'**EAPB0503**(256,257). Ces trois molécules (**EAPB0503**, **EAPB0502** et **EAPB02903**) ont une activité 350, 865 et 1750 fois supérieure respectivement à celle de l'imiquimod, fotémustine et dacarbazine. Leur activité est semblable à celle du vémurafénib et 20 fois inférieure à celle de la colchicine.

Formules générales des Imqualines :



Composés	R1	R4	Formule Brute	CI ₅₀ (μM) (A375)
EAPB0503	3-OCH ₃ -C ₆ H ₄ -	CH ₃ -NH-	C ₁₈ H ₁₆ N ₄ O	0,20 ± 0,020
EAPB0803	2-OCH ₃ -C ₆ H ₄ -	CH ₃ -NH-	C ₁₈ H ₁₆ N ₄ O	122 ± 25
EAPB0703	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄ -	CH ₃ -NH-	C ₁₈ H ₁₆ N ₄ O	0,37 ± 0,400
EAPB0603	3-OH-C ₆ H ₄ -	CH ₃ -NH-	C ₁₇ H ₁₄ N ₄ O	1,25 ± 0,180
EAPB0502	3-OCH ₃ -C ₆ H ₄ -	H ₂ N-	C ₁₇ H ₁₄ N ₄ O	0,20 ± 0,002
EAPB0602	3-OH-C ₆ H ₄ -	H ₂ N-	C ₁₆ H ₂₂ N ₄ O	2,40 ± 0,600
EAPB02003	2,3-di-OCH ₃ -C ₆ H ₄ -	CH ₃ -NH-	C ₁₉ H ₁₈ N ₄ O	5,90 ± 0,300
EAPB02203	3,4-di-OCH ₃ -C ₆ H ₄ -	CH ₃ -NH-	C ₁₉ H ₁₈ N ₄ O	0,30 ± 0,003
EAPB01803	3,5-di-OCH ₃ -C ₆ H ₄ -	CH ₃ -NH-	C ₁₉ H ₁₈ N ₄ O	0,22 ± 0,005
EAPB02403	3,6-di-OCH ₃ -C ₆ H ₄ -	CH ₃ -NH-	C ₁₉ H ₁₈ N ₄ O	1,20 ± 0,044
EAPB02903	2-OH-3-OCH ₃ -C ₆ H ₄ -	CH ₃ -NH-	C ₁₈ H ₁₆ N ₄ O ₂	0,08 ± 0,005
EAPB02603	2,3,4-tri-OCH ₃ -C ₆ H ₄ -	CH ₃ -NH-	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₃	1,50 ± 0,300
EAPB02703	3,4,5-tri-OCH ₃ -C ₆ H ₄ -	CH ₃ -NH-	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₃	1,80 ± 0,380
EAPB02803	2,4,6-tri-OCH ₃ -C ₆ H ₄ -	CH ₃ -NH-	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₃	2,30 ± 0,090
Colchicine	Formules chimiques en annexe			0,01 ± 0,002
Dacarbazine				>323
Fotémustine				173 ± 24
Imiquimod				70 ± 3
Vémurafénib				0,063 ± 0,003

Tableau 16 : Dérivés imidazo[1,2-a]quinoxalines, leur formule chimique et leur CI₅₀: concentration inhibitrice 50 ou concentration de la molécule qui inhibe 50% de la croissance cellulaire de cellules traitées par rapport la croissance cellulaire de cellules non traitées. Les valeurs de CI₅₀ sont calculées à l'aide du logiciel PRISM (GraphPad) à partir de trois expériences indépendantes.

En conclusion, **EAPB0502**, **EAPB01803** et **EAPB0503** présentent une activité antiproliférative remarquable sur la lignée A375 avec une CI₅₀ de l'ordre de 0,20 μM alors que le **EAPB02903** présente la plus forte activité cytotoxique avec une CI₅₀ de 0,08 μM. Tous ces composés ont une activité cytotoxique nettement supérieure à celles de l'imiquimod, la fotémustine et la dacarbazine et globalement équivalente à celle du vémurafénib.

L'influence de différents paramètres structuraux sur la cytotoxicité sera étudiée par la suite.

IV.1.2.3 Etude de la relation structure/activité

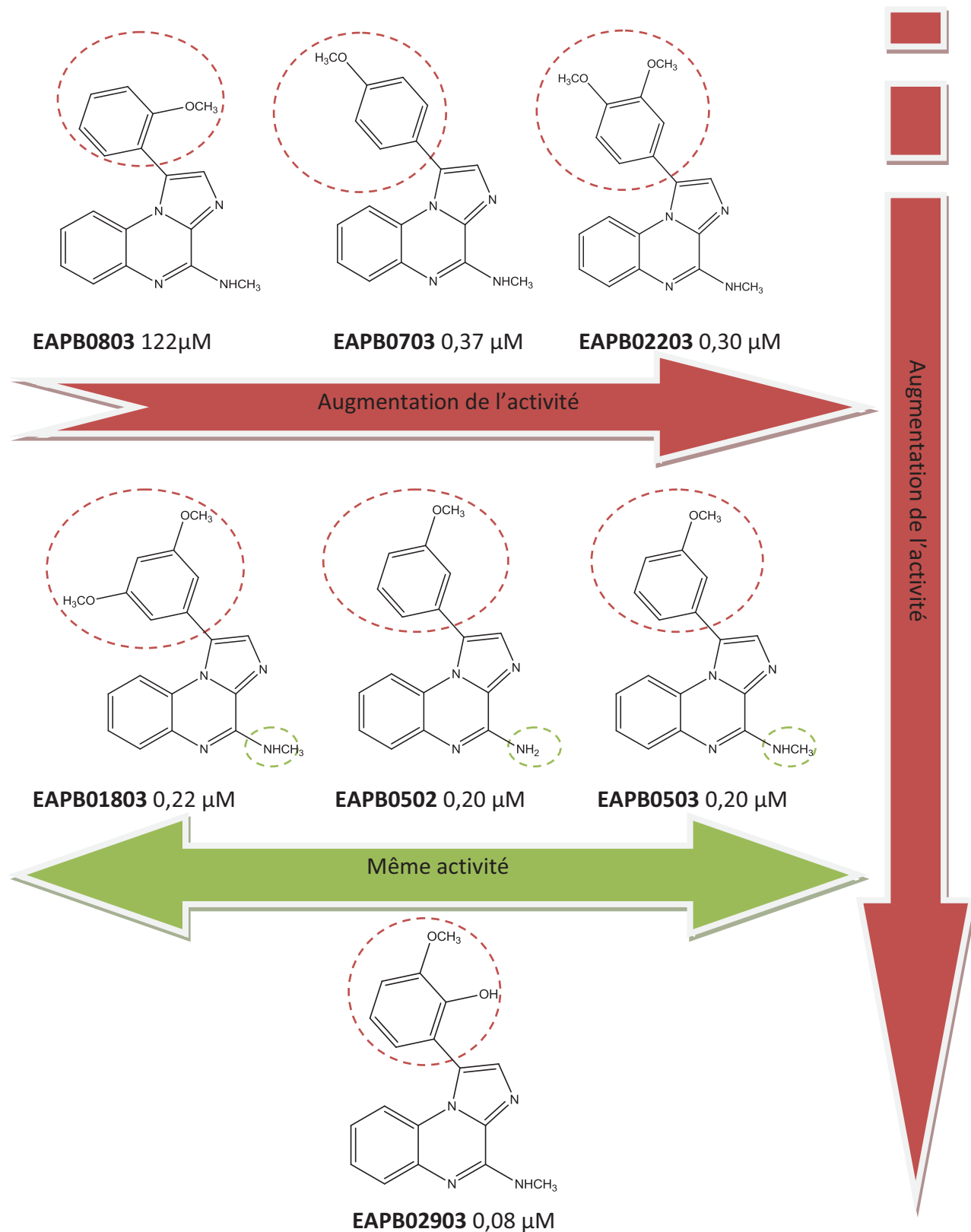


Figure 52: Relation entre la structure et l'activité au niveau du cycle imidazole de la série imidazo[1,2-a]quinoxaline

Les tests de cytotoxicité menés sur toutes les molécules présentées nous ont permis d'étudier l'influence de la nature des substituants en position R1 et R4 dans le but d'envisager certaines relations entre structure et activité.

L'équipe de chimie organique pharmaceutique a constaté, après une comparaison faite sur l'activité des molécules de chaque série, qu'en position R4, l'encombrement de l'amine diminuait fortement l'activité.

Dans la série imidazo[1,2-*a*]quinoxaline, nous avons étudié différentes substitutions en position R1, un noyauphényle substitué par un ou deux groupes méthoxy et/ou hydroxy sur différentes positions, afin de comparer leur effet sur l'activité des composés portant un substituant méthylamino ou amine en position R4.

En fait, d'après les résultats montrés par la figure 52, **EAPB0502**, avec un méthoxy en position méta du phényle en R1 et une amine en R4, présente la même activité que **EAPB0503** qui possède une méthylamine en R4. On constate que malgré la modification du groupement méthylamine en groupement amine en R4, on conserve une activité cytotoxique équivalente.

En revanche, la modification de la position du groupement méthoxy sur le phényle en R1 joue un rôle très important sur l'activité. La Figure 52 montre que lorsque le méthoxy est en position ortho sur le phényle, comme pour **EAPB0803** (122 µM), on diminue fortement l'activité par rapport aux composés possédant le groupement méthoxy en position para, comme **EAPB0703** (0,37 µM), ou deux groupements méthoxy en méta et en para comme **EAPB02203** (0,30 µM). Dans le cas où nous avons deux groupements méthoxy en méta, **EAPB01803** (0,20 µM), ou un seul groupement méthoxy en méta, comme **EAPB0503** (0,20 µM), on augmente 1,5 fois l'activité par rapport au composé qui présente deux groupements méthoxy en méta et para, **EAPB02203**. De plus l'addition d'un deuxième groupement méthoxy en méta, **EAPB01803**, n'améliore pas l'activité au regard de **EAPB0503** qui présente un seul groupement méthoxy en méta. Les positions ortho et para pour le groupement méthoxy semblent donc diminuer l'activité cytotoxique.

La meilleure activité est observée lorsque la molécule porte un méthoxy en position méta et un hydroxy en ortho comme **EAPB02903** (0,08 µM).

A partir de ces résultats, nous nous sommes aperçus qu'il existait une synergie entre les groupements méthoxy en position méta et hydroxy en position ortho puisqu'ils conféraient au composé **EAPB02903** la plus grande activité. Ce composé est un composé identifié comme métabolite de **EAPB0503**(257).

La suite des études a été faite avec **EAPB0503**. Ce composé présente une des meilleures activités cytotoxiques. Les autres composés présentant une activité identique, **EAPB0502**, ou supérieure, **EAPB02903**, sont des métabolites de

EAPB0503. De plus, **EAPB0503** est la molécule leader étudiée au laboratoire depuis plusieurs mois et de nombreux résultats ont pu être accumulés. (195,196,199,255,256).

IV.1.2.4 Cytotoxicité d'EAPB0503 sur différentes lignées cancéreuses

Le composé leader **EAPB0503** a été testé sur d'autres lignées cellulaires : lignée de cancer du côlon (LST174T), lignée de cancer du sein (MCF7), et lignée de lymphome T de l'adulte (HUT102). Selon le type de cancer, la molécule de référence était la colchicine, irinotecan, doxorubicine, arsenic-interféron, fotémustine ou vémurafénib.

Lignées cellulaires cancéreuses	Composés	CI ₅₀ (μM)	
Lignée A375 (Mélanome)	EAPB0503	0,20	±0,02
	Doxorubicine	0,46	±0,05
	Fotémustine	173	±24
	Vémurafénib	0,063	±0.003
Lignée MCF7 (cancer du sein)	EAPB0503	0,22	±0,02
	Doxorubicine	0,13	±0,01
Lignée LST174T (cancer du côlon)	EAPB0503	0,33	±0,02
	Irinotecan	1,16	±0,07
Lignée HUT102 (lymphome T)	EAPB0503	0,64	±0,20
	Arsenic-Interféron	0,50	±0,10

Tableau 17 : les CI₅₀ de **EAPB0503**, colchicine, irinotecan, doxorubicine, arsenic-interféron, fotémustine et vémurafénib sur les lignées cancéreuses humaines A375 (mélanome), MCF7 (cancer du sein), LST174T (cancer du côlon), HUT102 (lymphome T).

Comme nous pouvons le voir sur le tableau 17, **EAPB0503** présente des activités cytotoxiques entre 2 et 900 fois supérieures à celles des molécules comme doxorubicine, fotémustine et vémurafénib sur une lignée humaine de mélanome malin A375. Ainsi, il présente des activités cytotoxiques à peu près équivalentes à celles de la doxorubicine sur une lignée humaine de cancer du sein MCF7, et 3 fois supérieures à celles de l'irinotecan sur une lignée humaine de cancer du côlon LST174T. En plus, il présente des activités cytotoxiques importantes comparables à celle de la combinaison de drogues Arsenic-Interféron sur une lignée humaine de lymphome T HUT102.

De manière générale, **EAPB0503** présente une activité cytotoxique de l'ordre du micromolaire. Cette activité est importante sur les différentes lignées cellulaires cancéreuses, en comparaison avec les molécules de référence.

IV.1.3 Etude de l'activité d'EAPB0503 et ses dérivés sur la polymérisation de la tubuline purifiée

Après le criblage in vitro de l'activité antitumorale des molécules imidazo[1,2-*a*]quinoxalines sur la lignée cellulaire de mélanome humain A375 et afin de déterminer si l'activité cytotoxique des composés sont liées ou non à l'interaction avec la tubuline, nous avons évalué l'activité potentielle des molécules sur l'inhibition de la polymérisation de la tubuline. Cette évaluation a été réalisée à partir de tubulines purifiées issues de cerveau de porc traitées selon le protocole décrit dans la partie « matériels et méthodes ». Ce test a pour but de déterminer l'effet des molécules sur la polymérisation de la tubuline et de les comparer à celui de la colchicine, inhibiteur naturel de la polymérisation de la tubuline et utilisé comme molécule de référence.

Les résultats sur la polymérisation de la tubuline ont été illustrés dans le tableau 18.

Composés	CI ₅₀ (μ M) sur A375(a)	% d'inhibition de polymérisation de tubuline / DMSO 5 μ M(b)	
Colchicine	0,01 \pm 0,002	52	\pm 5,0
EAPB02903	0,08 \pm 0,005	90	\pm 7,7
EAPB0503	0,20 \pm 0,020	84	\pm 3,2
EAPB0502	0,20 \pm 0,002	41	\pm 7,8
EAPB01803	0,22 \pm 0,005	99	\pm 4,0
EAPB02203	0,30 \pm 0,003	63	\pm 8,0
EAPB0703	0,37 \pm 0,400	99	\pm 3,4
EAPB02403	1,20 \pm 0,044	3	\pm 2,4
EAPB0603	1,25 \pm 0,180	0	
EAPB02603	1,50 \pm 0,300	0	
EAPB02703	1,80 \pm 0,380	0	
EAPB02803	2,30 \pm 0,090	0	
EAPB0602	2,40 \pm 0,600	11	\pm 6,3
EAPB02003	5,90 \pm 0,300	0	
EAPB0803	122 \pm 25	0	

Tableau 18 : Dérivés imidazo[1,2-*a*]quinoxalines, CI₅₀: concentration de composé nécessaire pour inhiber la croissance cellulaire de A375 de 50% ;

(a) Valeurs calculées à l'aide du logiciel PRISM à partir de trois expériences indépendantes, et l'écart type a été calculé. (b) Valeurs exprimées en pourcentage,

obtenues à partir de trois expériences indépendantes et l'écart-type a aussi été calculé, chaque composé a été testé à une concentration de 5µM.

Le tableau 18 montre que les composés **EAPB0703**, **EAPB01803**, **EAPB02903**, et **EAPB0503** ont des activités très efficaces dans leur aptitude à inhiber l'assemblage de la tubuline avec des pourcentages de valeurs d'inhibition de 99 %, 98 %, 90% et 84 %, respectivement. Ces composés présentent une puissance élevée sur l'inhibition de la tubuline en comparaison avec la colchicine, qui fait preuve d'un pourcentage allant jusqu'à 52 % d'inhibition. L'effet élevé sur l'inhibition de la polymérisation de la tubuline est en corrélation avec leur puissant effet cytotoxique sur la lignée cellulaire de mélanome humain.

EAPB0703 et **EAPB02203** sont moins actifs qu'**EAPB0503** en ce qui concerne leurs effets antiprolifératifs sur la lignée cellulaire de mélanome A375. **EAPB01803** et **EAPB02903** ont une activité d'inhibition de la polymérisation de la tubuline supérieure à **EAPB0503**. Seul **EAPB0502**, qui est l'un des métabolites de **EAPB0503**, présente une activité antiproliférative identique à celle de **EAPB0503** avec une activité d'inhibition de la polymérisation de la tubuline inférieure à celle de ce dernier.

Idéalement, nous souhaiterions cibler nos recherches sur une molécule provoquant un effet antiprolifératif élevé sur lignées tumorales et une inhibition de la polymérisation de la tubuline faible. En effet, l'inhibition de la polymérisation de la tubuline peut déclencher une activité antiproliférative non spécifique sur l'ensemble des cellules en phase de multiplication, entraînant ainsi un certain nombre d'effets secondaires importants. La molécule répondant le mieux à nos critères serait **EAPB0502**, un des métabolites de **EAPB0503**. D'autres études menées au laboratoire ont montré que **EAPB0503** est la molécule chef de file de la série Imiqualine pour l'étude de nouvelles molécules anticancéreuses.

Malgré l'effet important d'inhibition de la polymérisation de la tubuline de **EAPB0503**, ce composé ne semble pas agir principalement par ce mode d'action, comme le fait par exemple la vinorelbine.

La figure 53 représente les résultats obtenus par le National Cancer Institute (NCI) concernant l'inhibition de la croissance cellulaire 50 (GI₅₀) sur un panel de 60 lignées cellulaires tumorales par les deux molécules, **EAPB0503** et vinorelbine. Sur cette figure, pour chaque composé, la ligne verticale représente la moyenne des GI₅₀ observées sur l'ensemble des lignées cellulaires tumorales testées. Pour chaque composé, et pour chaque lignée, est représenté un segment horizontal situé à gauche de la ligne verticale si la lignée cellulaire est plus sensible que la moyenne des lignées, ou situé à droite de la ligne verticale si la lignée cellulaire est moins

sensible que la moyenne des lignées. A partir de ces résultats, nous constatons que **EAPB0503** présente une activité spécifique en fonction des lignées tumorales : i) certaines lignées apparaissent très sensibles, comme la lignée SR des leucémies, la lignée MDA-MB-435 du mélanome ou l'ensemble des lignées du cancer du côlon ; ii) d'autres sont peu sensibles, comme les lignées MALME-3M ou UACC-257 du mélanome. La vinorelbine présente elle une activité beaucoup plus homogène, voire non spécifique, sur les lignées tumorales qui répondent. Seules certaines lignées répondent mal, comme SK-MEL-28 du mélanome ou HCT-15 du cancer du côlon par exemple. **EAPB0503** présente donc un profil d'activité beaucoup plus spécifique sur certaines lignées tumorales que celui d'un composé à activité antitubuline comme la vinorelbine. Ce résultat permet de penser que l'inhibition de la polymérisation de la tubuline ne constitue pas le mécanisme d'action principal de **EAPB0503** mais pourrait représenter seulement un mécanisme d'action secondaire à un mécanisme beaucoup plus spécifique qu'il nous reste à identifier.

L'ensemble de mes résultats et de ceux obtenus au laboratoire m'ont donc conduit à sélectionner **EAPB0503** pour la poursuite de mes travaux concernant l'identification du mécanisme d'action des imiquinalines.

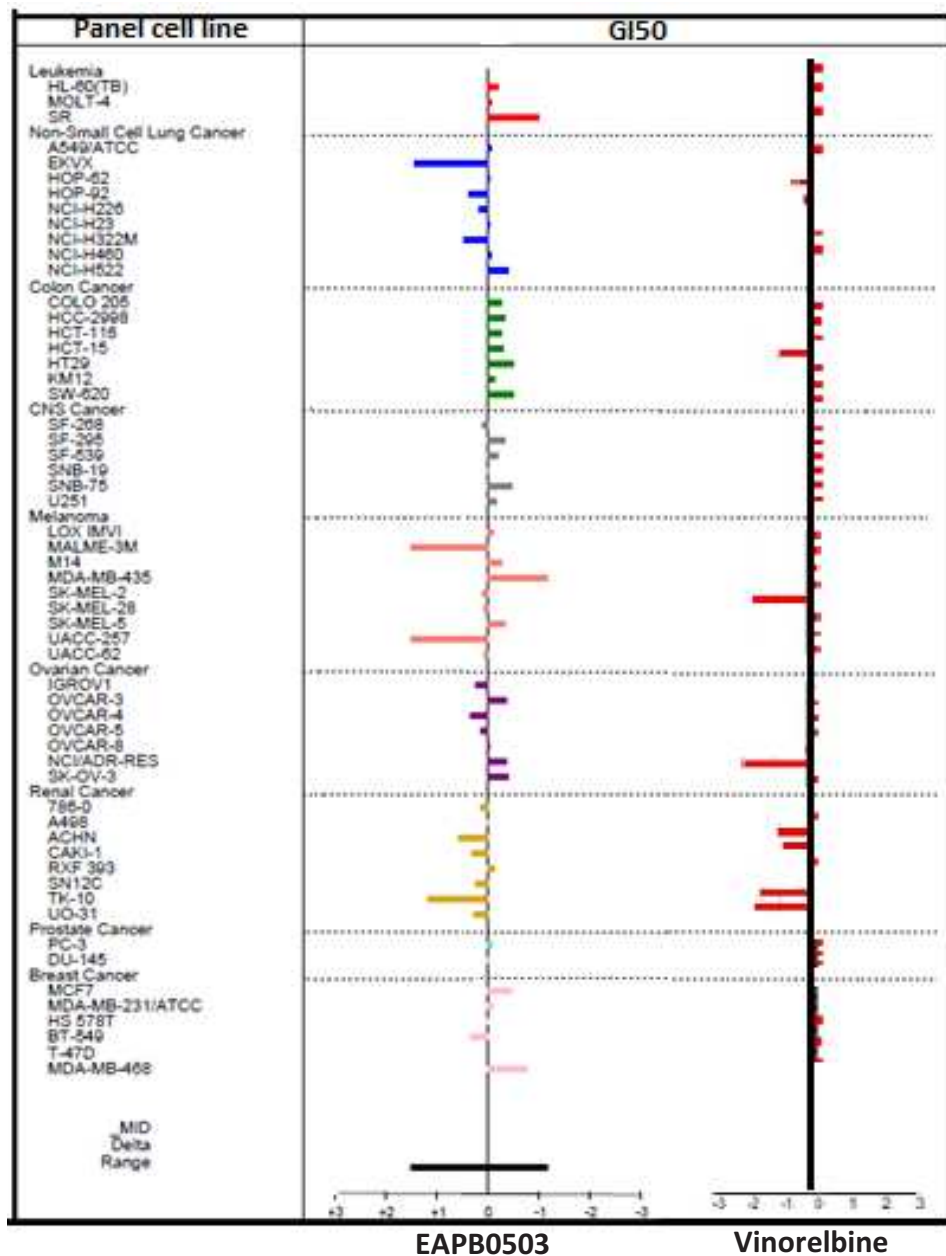


Figure 53: Criblage d'inhibition de la prolifération cellulaire sur 60 lignées cellulaires tumorales traitées par *EAPB0503* ou vinorelbine, réalisé par le National Cancer Institut (NCI).

L'ensemble de ces résultats montre que les imiquialines sont des composés à activité antiproliférative et antiméiotique. Afin d'étudier l'interaction potentielle entre les imiquialines et la tubuline, nous nous proposons de développer une étude de modélisation moléculaire en collaboration avec le Dr Jean-François Guichou du Centre de Biochimie Structurale.

IV.1.4 Etude de l'interaction Imiqualine-Tubuline par modélisation moléculaire

Une étude de « molecular docking » a été réalisée par le Dr Jean-François Guichou du Centre de Biochimie Structurale de Montpellier afin d'étudier l'interaction entre les imiqualines et le site colchicine de la tubuline. Cette étude est détaillée dans la publication de ma thèse (258).

En résumé, les études d'ancrage des molécules sur le site colchicine de la tubuline ont montré une bonne corrélation avec l'inhibition de la polymérisation de la tubuline. A titre d'exemple, les composés **EAPB02403**, **EAPB0603**, **EAPB02603**, **EAPB02703**, **EAPB02803**, **EAPB0602**, **EAPB02003** et **EAPB0803** peuvent difficilement s'ancrer dans le site colchicine et ont montré une absence d'inhibition de la polymérisation de la tubuline. Au contraire, les composés **EAPB0503**, **EAPB02903**, **EAPB0502**, **EAPB01803**, **EAPB02203**, et **EAPB0703** peuvent s'ancrer dans le site de la colchicine de la tubuline et présente une bonne activité d'inhibition de la polymérisation de cette même tubuline.

Les résultats obtenus à partir des études d'ancrage moléculaire ou « molecular docking » ont montré une bonne corrélation avec les résultats biologiques concernant l'inhibition de la polymérisation de la tubuline. Cette étude nous permet de mettre en évidence le rationnel des résultats biologiques et d'avoir un outil capable d'orienter les modulations chimiques à effectuer sur les composés de la série imiqualine en vue de diminuer ou augmenter leurs activités sur la tubuline.

IV.1.5 Conclusion

La molécule que nous souhaitons sélectionner pour la suite de notre étude doit avoir la meilleure activité antiproliférative et l'effet d'inhibition de la polymérisation de tubuline le plus faible. **EAPB0503** est le composé présentant l'activité antiproliférative la plus forte et l'activité d'inhibition de la polymérisation de la tubuline la plus faible, si on excepte **EAPB0502**, qui est l'un des métabolites de **EAPB0503**.

Malgré l'activité sur l'inhibition de polymérisation de la tubuline de **EAPB0503**, ce composé ne semble pas avoir le profil d'activité d'inhibition de la croissance cellulaire d'un antitubuline classique, tel que la vinorelbine. Comme le montre les résultats du NCI, **EAPB0503** agit in vitro de façon sélective sur différents types de cancer, ce qui est différent de la vinorelbine. Même si l'interaction de **EAPB0503** avec la tubuline a été démontrée par modélisation moléculaire, ceci ne constituerait pas son mode d'action principal.

L'étude du mécanisme d'action et la recherche d'une originalité potentielle pour **EAPB0503** vont être réalisées grâce à une étude transcriptomique.

IV.2 Partie 2 : Analyse transcriptomique

IV.2.1 Introduction

La réponse aux agents anticancéreux est souvent variable d'un individu à l'autre en termes d'efficacité et de tolérance, ce qui rend parfois leur utilisation difficile. De ce fait, il est particulièrement important de pouvoir prédire leurs effets. Les techniques de génomique à haut débit ont conduit à la description d'une multitude de variations aux niveaux génétique et épigénétique, au niveau des profils d'expression génique ainsi qu'au niveau des voies de transduction du signal. De ce fait, un des challenges actuel de la recherche sur le cancer est basé sur l'utilisation de ces données afin d'identifier des biomarqueurs moléculaires permettant l'amélioration des méthodes actuelles de diagnostic, de pronostic ou de prédiction de la réponse au traitement. C'est dans ce cadre que s'inscrit la pharmacogénomique des anti-cancéreux dont le but est d'identifier l'origine génétique de la variabilité interindividuelle de réponse aux médicaments afin de permettre un traitement adapté à chaque patient. De ce fait et afin d'identifier l'originalité et le ou les mécanismes d'action de **EAPB0503**, nous avons choisi d'étudier le transcriptome de la lignée cellulaire de mélanome A375 à l'aide de puces « GeneChip Human Genome U133+ PM Array Strip » qui dérive de la puce pangénomique Affymétrie « GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array» (Affymetrix, Santa Clara, CA). Ces dernières permettent une exploration complète du génome humain à travers 47400 transcrits ou variant incluant plus de 38500 gènes humains caractérisés) et ainsi, il se trouve au format plaques multiple-puces permettant d'hybrider en parallèle jusqu'à 4 échantillons.

L'objectif de notre analyse est d'obtenir un médicament anticancéreux, et pour ce faire il est nécessaire de remplir les conditions suivantes :

- 1) Définir le ou les mécanismes d'action de ce médicament permet de cibler un type de cancer.
- 2) Ce ou ces mécanismes d'actions doivent être originaux car la grande problématique mondiale des médicaments est la résistance des cancers aux anticancéreux classiques.
- 3) Définir le ou les mécanismes d'action de ce médicament en anticipant le problème de toxicité.

Cette technique d'analyse, basée sur une étude transcriptomique, a été choisie car elle pourrait nous aider à répondre à ses questions.

IV.2.2 Etude N°1: originalité de mécanisme d'action d'EAPB0503?

IV.2.2.1 Design de l'étude

	EAPB0503	contrôle	Autres molécules
Dose	10 μ M	pas traitement	10 μ M
Temps de traitement	6h	6h	6h
Répliqué	2	2	1

Tableau 19 : Design de l'étude N°1.

Pour l'hybridation 1, les cellules ont été traitées avec une dose et un temps de traitement fixes pour **EAPB0503** et les autres molécules (5-FU, BMS, Colchicine, dacarbazine, doxorubicine, fotemustine, imiquimod, maytansine, méthotrexate, SN38, vemurafenib et vinorelbine) (tableau 19). Le contrôle et **EAPB0503** ont été répliqués 2 fois.

IV.2.2.1.1 Choix des anticancéreux ou médicaments comparateurs

Plusieurs médicaments et anticancéreux classique (tableau 20) connue sur le marché ont été choisis dans cette étude pour trouver le ou les cibles moléculaires de **EAPB0503**.

Nom	Classe	Cible
5-FU	Antimétabolite	inhibiteur de la thymidilate synthase
METHOTREXATE	Antimétabolite	Inhibiteur du métabolisme de l'acide folique
BMS	Agent antirétroviral	inhibiteur d'IKK
DACARBAZINE	Agent alkylant	Hydrazines, triazines et utilisée en clinique sur mélanome
FOTEMUSTINE	Agent alkylant	Utilisée en clinique sur mélanome avec métastases cérébrales
IMIQUIMOD	immunomodulateur	Agit comme un agoniste du récepteur toll-like 7 -un analogue structural de EAPB0503
DOXORUBICINE	Anthracyclines	Agent intercalant, antibiotique antitumoral
SN38	Métabolite actif de l'irinotécan	Inhibiteur de topoisomérase I
VEMURAFENIB	Inhibiteur de kinase	Inhibiteur de BRAF
PACLITAXEL	Taxane	Poison du fuseau- Inhibe la dépolymérisation des microtubules
VINORELBINE	Vinca Alcaloïde	Antimicrotubule
COLCHICINE	Anti goutte	Antimicrotubule- Liaison aux microtubules
MAYTANSINE	Anticorps conjugués	Antitubuline- Molécule proches des EAPB d'après des tests du NCI (analyse COMPARE)

Tableau 20: Noms, classes et cibles des composés utilisés dans l'étude 1.

Trois molécules antitubulines ont été choisies, afin d'éliminer les modifications d'expression des gènes induites par ces mécanismes antimicrotubules. En effet, nous pensons que l'effet antimicrotubule de **EAPB0503** n'est pas le seul effet cytotoxique. Ainsi, un autre mécanisme d'action serait à isoler grâce à cette analyse transcriptomique. Ainsi, d'autres anticancéreux classique, avec des mécanismes d'action différents, ont été utilisés comme comparateurs et ainsi nous permettre de démontrer l'originalité du mécanisme d'action de **EAPB0503**.

IV.2.2.1.2 Conditions d'exposition

Une lignée cellulaire de mélanome A375 a été traitée à une concentration de 10 μ M pendant 6h avec l'une des 13 différentes molécules suivantes : 5-FU, BMS, Colchicine, dacarbazine, doxorubicine, fotemustine, imiquimod, maytansine, méthotrexate, SN38, vemurafenib, vinorelbine et une molécule de la famille des imiqualines, **EAPB0503**. Le choix de la dose unique et forte (10 μ M), et d'un temps de traitement unique et court (6h), pour toutes les molécules a été guidé par notre envie :

- d'induire une réponse au traitement dans le maximum de cellules (forte dose).
- de ne voir que l'effet du traitement (6h) sans les mécanismes de résistance et/ou échappement au traitement.

IV.2.2.1.3 Choix de répliqué

EAPB0503 est la molécule choisie de la série imidazoquinoxalines. Les hybridations avec les échantillons traités par **EAPB0503** et le contrôle non traité ont été répliqués 2 fois afin d'augmenter la puissance statistique des tests de détection des variations d'expression. Mais, pour les autres comparateurs, les hybridations n'ont pas été répliquées, d'une part en raison des contraintes financières, et d'autre part car les mécanismes d'action de ses comparateurs sont déjà connus.

Malgré tout, afin de s'affranchir de la variabilité du manipulateur, tous les traitements ont été répétés trois fois, et les ARN extraits ont été combinés en quantité stœchiométrique avant hybridation.

IV.2.2.2 Résultats

L'hybridation sur les puces a été effectuée sur la plateforme Affymetrix de l'institut de Recherche en Biothérapie (IRMB-CHU Montpellier).

Brièvement, les étapes d'analyse ont été les suivantes :

- i) normalisation par RMA (Robust Multi-array Average),
- ii) comparaison des profils d'expression par la méthode RDAM (Rank Difference Analysis of Microarray), puis par analyse en composantes principales (PCA)

L'analyse des données transcriptomiques a été réalisée en collaboration avec Michel Bellis, biostatisticien (CRBM, UMR5237, Montpellier).

IV.2.2.2.1 Matrice de distance et dendrogrammes

Ces données permettent de calculer une distance entre tous les échantillons pris deux à deux et à convertir ces distances en dendrogrammes synthétique sous forme d'un arbre (figure 54).

Afin de mettre en évidence les altérations d'expression génique due au traitement effectué sur la lignée A375 et après la constitution des têtes de liste selon les probe sets qui ont la plus faible valeur absolue de FDR (variations les plus significatives). Nous avons réalisé une comparaison des profils d'expression de chaque condition utilisée sur A375 (traité et non traité).

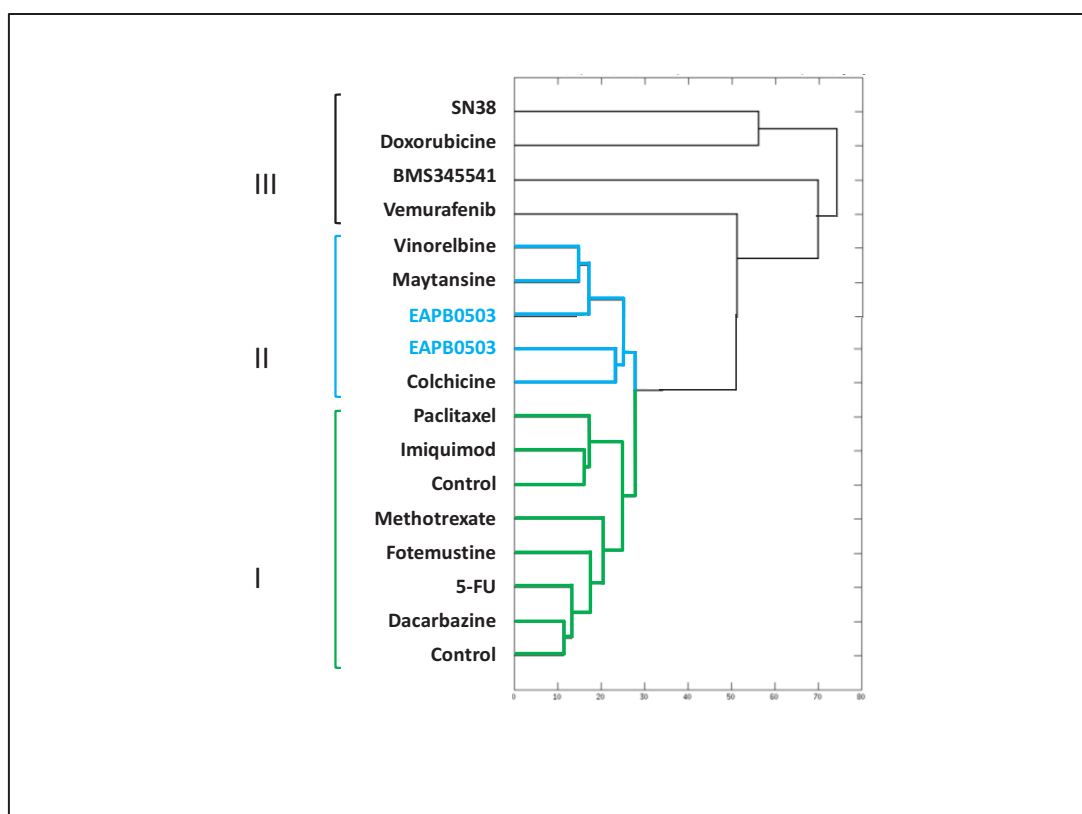


Figure 54: Comparaison des profils d'expression génique des composés comparateurs dans l'étude 1 sur la lignée cellulaire A375, permet d'isoler trois groupes (I, II et III). Les distances entre chaque paire de traitements ont été calculées comme décrit dans « matériels et méthodes » et représentées par une matrice des distances.

Le dendrogramme des distances (Figure 54) reflète les relations entre les profils d'expression, et individualise 3 groupes de molécules :

- groupe I de molécules n'ayant aucun effet à cause d'une concentration utilisée très faible, ou ayant un effet tardif qui ne peut être détecté à 6 heures et se regroupant avec le contrôle : Fotemustine, Paclitaxel, Imiquimod, Dacarbazine, Methotrexate et 5-FU ;
- groupe II de molécules ciblant la tubuline : Colchicine, Vinorelbine, Maytansine et **EAPB0503**.
- groupe III de molécules ayant des effets contrastés au niveau du transcriptome : Doxorubicine, SN38, BMS, Vemurafenib.

La figure 55 nous présente une comparaison des profils d'expression des cellules traitées par les composés appartenant au groupe II (antitubuline). Cette analyse nous a permis de mettre en évidence que **EAPB0503** présente un profil d'expression différent de ceux des antitubulines testés.

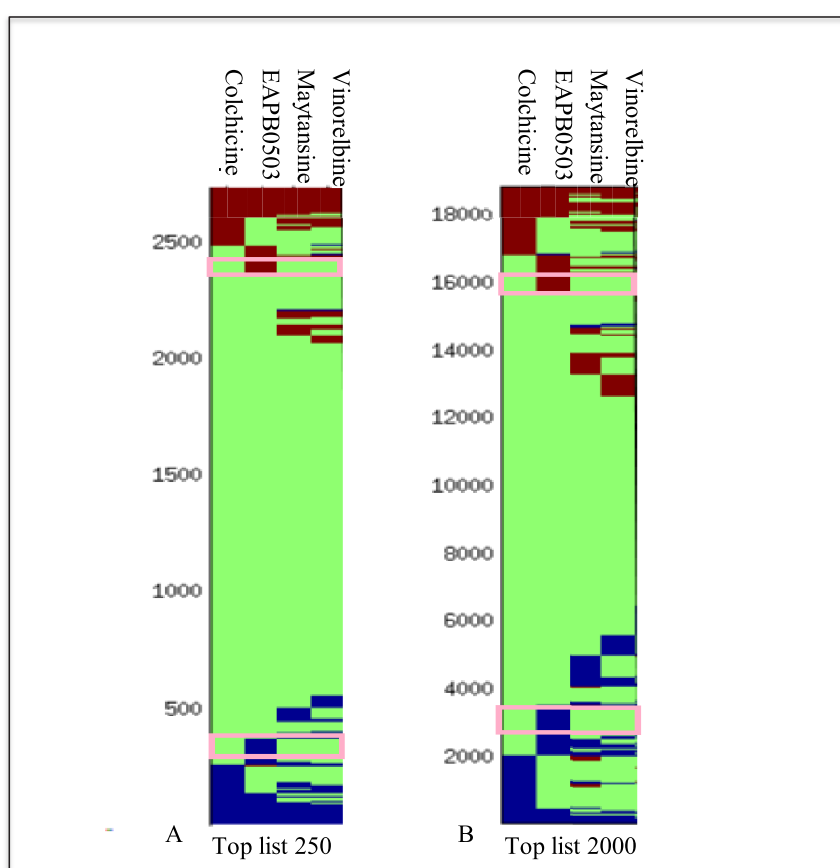


Figure 55: Distribution des probe sets (en ordonnée) des têtes de liste de taille 250 (A) et 2000 (B) dans les différentes comparaisons entre les cellules traitées (en abscisse) et les cellules non traitées.

En rouge ou bleu: probe sets appartenant à la tête de liste dont le signal est respectivement croissant ou décroissant. En vert : probe sets absent de la tête de liste. Encadré en rose les gènes spécifiques à **EAPB0503**.

IV.2.2.3 Conclusion

Ces résultats suggèrent que, **EAPB0503** présente un mécanisme d'action différent des composés appartenant aux groupes I et III. De plus, à l'intérieur du groupe II, les différences observées entre les profils d'expression, suggère que **EAPB0503** présente un mécanisme d'action original par rapport aux antitubulines.

IV.2.3 Etude N°2 : mécanismes d'action d'EAPB0503 ?

Notre hypothèse est que **EAPB0503** présente deux mécanismes d'action:

- Une activité anti-tubuline, proche de celle de la colchicine(258), mais non majoritaire,
- un autre mécanisme entraînant l'apoptose indépendamment de l'activité anti-microtubule du composé.

IV.2.3.1 Design de l'étude

Afin de mettre en évidence ce(s) autre(s) mécanisme(s) d'action, le profil d'expression de cellules traitées avec **EAPB0503** sera comparé avec ceux de cellules traitées avec des anti-tubulines classiques. Cette nouvelle étude nécessitera la récupération des données de l'hybridation 1 de l'étude 1, ainsi qu'une nouvelle hybridation (2). La colchicine a été choisie comme comparateur dans cette nouvelle hybridation(258).

La même lignée cellulaire de mélanome A375, a été traitée à la Cl_{90} des composés pendant 6h et 24h pour les deux molécules EAPB0503 et colchicine, cette fois en duplicat. Cette hybridation a été conçue pour étudier les effets immédiats (6h) et à plus long terme (24h) des molécules, et comporte pour chaque condition biologique deux répliqués afin d'augmenter la puissance statistique des tests de détection des variations d'expression (tableau 21).

	Hybridation	EAPB0503	Contrôle	Colchicine
Dose	hybridation 1	10 μ M	pas de traitement	10 μ M
	hybridation 2	Cl_{90}	pas de traitement	Cl_{90}
Temps de traitement	hybridation 1	6h	6h	6h
	hybridation 2	6h et 24h	6h et 24h	6h et 24h
Répliqué	hybridation 1	2	2	1
	hybridation 2	2	2	2

Tableau 21: Design de l'étude N°2 : utilisation de l'hybridation 1 de l'étude N°1 et de l'hybridation 2. Toutes les conditions de l'hybridation 2 ont été faites en duplicat par rapport à l'hybridation 1.

IV.2.3.2 Résultats

Les étapes d'analyse bioinformatique ont été les suivantes : i) normalisation par RMA (Robust Multi-array Average), ii) comparaison des profils d'expression par la méthode RDAM (Rank Difference Analysis of Microarray, puis PCA, iii) sélection des gènes dont l'expression est la plus altérée dans les lignées résistantes (génération de listes de transcrits hiérarchisés selon leur degré d'altération), et iv) enrichissement fonctionnel des listes de gènes sélectionnés. L'analyse des données transcriptomiques a été réalisée en collaboration avec Michel Bellis.

IV.2.3.2.1 Profils d'expression (transcriptomic) obtenue par l'hybridation 2

L'examen de la matrice de distances (figure 56), montrent que les profils d'expression de la colchicine et de l'**EAPB0503** sont bien distincts à 6h. En revanche, à 24h, les profils d'expression sont proches. Cela peut s'expliquer par le fait qu'à 24h sont exprimés les effecteurs des voies d'apoptoses déclenchées. Ces effecteurs sont communs malgré des mécanismes initiaux différents. La condition 24h étant donc moins discriminante que la condition 6h, c'est cette dernière qui sera conservée pour mettre en évidence le mécanisme d'action précoce de **EAPB0503**.

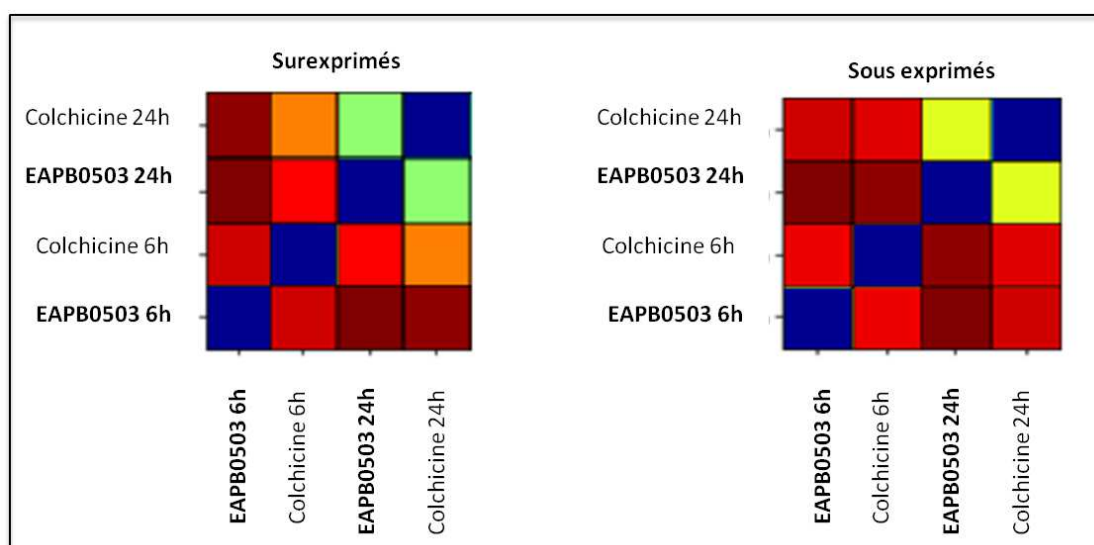


Figure 56: Comparaison des profils d'expression génique de l'hybridation 2 sur la lignée cellulaire A375.

IV.2.3.2.2 Enrichissements fonctionnel

IV.2.3.2.2.1 Introduction

Les différentes étapes réalisées sont résumées dans la figure 57.

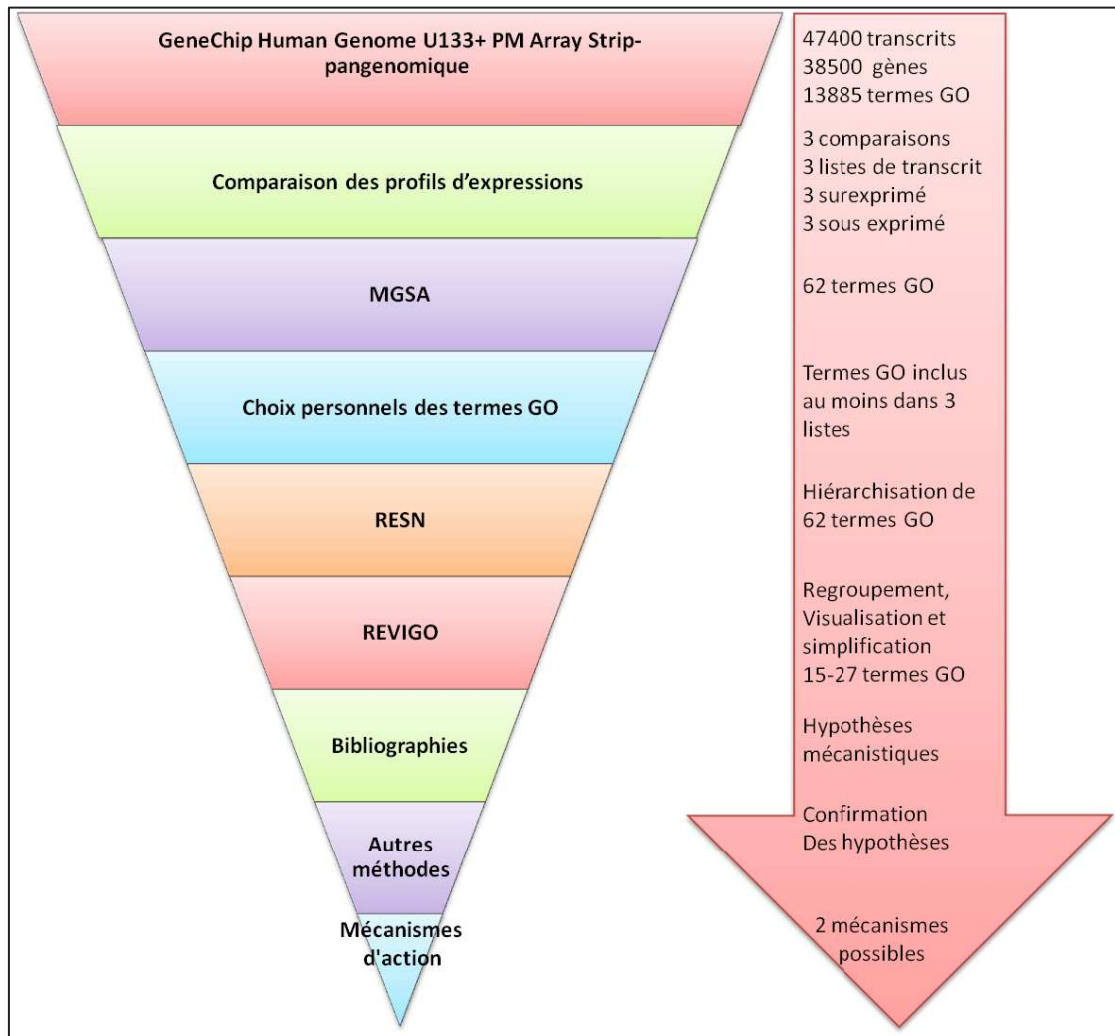


Figure 57: Représentation schématique des différentes étapes d'enrichissement fonctionnel réalisées.

IV.2.3.2.2.2 Choix de la comparaison adéquate pour pouvoir extraire le(s) mécanisme(s) d'action(s) différentiel(s) de EAPB0503 par rapport à la colchicine

Les fonctions cellulaires altérées lors des différents traitements effectués sur la lignée A375 ont été recherchées par la méthode développée dans « matériels et méthodes ». Les gènes les plus exprimés entre les différentes comparaisons ont été recherchés et hiérarchisés selon leur degré d'altération (les gènes les plus dérégulés sont retrouvés en tête de liste). Ainsi, des listes primaires union (u) et combinées (union (u) ou intersection (n) ou différence (-)) ont été construites afin de réaliser les opérations d'ensembliste (voir « matériels et méthodes ») comme indique le tableau 22. Dans notre analyse, il y a 3 listes qui nous intéressent :

- Gènes d'expression altérée par le traitement **EAPB0503** (EAPB0503:6h vs CONT:6H),

- Gènes d'expression altérée à la fois par l'**EAPB0503** et les composés anti-microtubule= mécanisme d'action commun (n(EAPB0503, COLCH):6H),
- Gènes d'expression altérée spécifiquement par l'**EAPB0503** comparativement aux composés anti-microtubule = mécanisme(s) d'action(s) original (aux) (EAPB0503-u(COLCHICINE, MAYTANSINE, VINOELBINE)).

Les gènes se trouvant en tête de ces listes ont été analysés par MGSA.

comparaisons primaires	
Nom de la liste	Définition de la liste
Colchicine versus Contrôle	les gènes de colchicine comparés à ceux du contrôle
EAPB0503 versus Contrôle	les gènes d'EAPB0503 comparés à ceux du contrôle
Colchicine versus Contrôle	les gènes de colchicine comparés à ceux du contrôle
EAPB0503 versus Contrôle	les gènes d'EAPB0503 comparés à ceux du contrôle
Combinaison de comparaisons primaires	
Nom de la liste	Définition de la liste
n (EAPB0503, Colchicine)	les gènes communs d'EAPB0503 et de colchicine
u(COLCHICINE, MAYTANSINE, VINOELBINE)	les gènes communs et non communs de la colchicine, maytansine, et vinorelbine
EAPB0503-u (COLCHICINE, MAYTANSINE, VINOELBINE)	les gènes d'EAPB0503 comparés à ceux du contrôle en éliminant les gènes communs et non communs de colchicine, maytansine, et vinorelbine

Tableau 22: Différentes listes réalisées afin de sélectionner les probe sets pour l'enrichissement fonctionnel. Les listes en bleu ont été sélectionnées pour les analyses MGSA.

IV.2.3.2.2.3 Analyses MGSA

C'est l'analyse de base qui nous permet d'obtenir les termes GO utilisé par la suite pour émettre des hypothèses mécanistiques. L'apport de cet algorithme et la démarche développée sont décrits dans « matériel et méthode ». Pour rendre l'analyse MGSA plus robuste et éviter les variations de résultats dues à la partie aléatoire du modèle mathématique utilisé, les analyses sont effectuées dix fois pour chaque liste et l'on garde les termes GO pour lesquels la moyenne des dix scores est supérieure ou égale à 0.5 dans au moins trois analyses. Ainsi pour éviter la variation de résultats due au choix de la taille de la liste de gènes, l'analyse MGSA a été réalisée sur des listes de tailles variables (50, 100, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 et 2000). Au total 12 listes allant de 50 à 2000 gènes.

L'analyse MGSA a conduit à l'obtention de 49 à 90 termes GO actifs selon les listes comme le montre le tableau 23. Afin de faciliter l'analyse de ces termes et ainsi de tirer les conclusions adéquates, nous avons cherché à en diminuer le nombre.

	Nombre des termes GO			Nombre des gènes		
	Sur-exprimés	Sous-exprimés	Total	Sur-exprimés	Sous-exprimés	Total
EAPB0503-u (Colchicine, Maytansine, Vinorelbine)	46	44	90	156	65	221
EAPB0503 vs Contrôle	23	25	48	98	139	237
N (EAPB0503, Colchicine)	27	22	49	44	53	97

Tableau 23: Représentation du nombre de termes GO et de ses gènes obtenus par MGSA pour les trois listes choisies EAPB0503-u (Colchicine, Maytansine, Vinorelbine), EAPB0503 Versus Contrôle et N (EAPB0503, Colchicine).

IV.2.3.2.2.4 Choix personnel

Devant le grand nombre de termes GO générés dans la sélection précédente basée sur la moyenne des scores MGSA, on a essayé de réduire le nombre de termes GO. Cette réduction est focalisée sur le nombre des listes (12 listes de tailles variables allant de 50 à 2000 gènes pour chaque comparaison) pour lesquelles apparaît chaque terme. Avant de décider quel nombre de listes est convenable, on a fait une comparaison. Les choix sont les termes GO qui se trouvent au moins dans une liste (≥ 1), ou dans 2 (≥ 2), etc., comme décrit dans la figure 58.

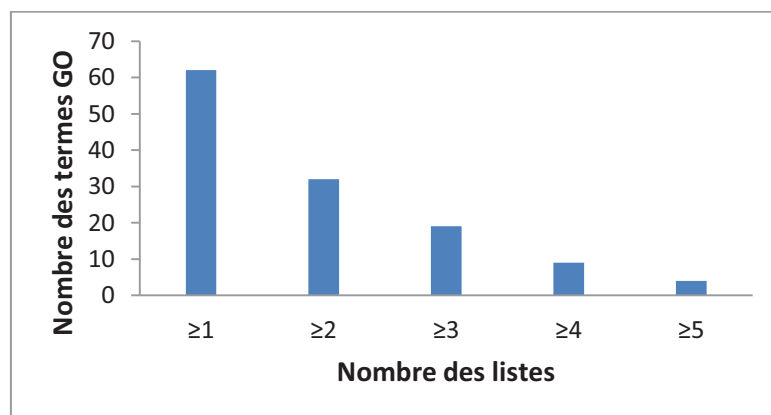


Figure 58: Histogramme représentant le nombre des termes GO en fonction de nombre des listes.

On a constaté que le nombre de termes GO dans au moins 1 liste ou 2 est autour de 30-60 termes, ce qui nous donne encore beaucoup de termes. Tandis qu'en choisissant le nombre de termes GO dans au moins 4 ou 5, le nombre de termes sera

autour 3-9 termes ce qui n'est faible. Donc le meilleur choix semble de conserver les termes GO présents dans au moins 3 listes, soit aux alentours de 20 termes GO.

La figure 59 illustre la démarche. Elle représente un exemple de résultat d'analyse MGSA : pour EAPB0503 versus Contrôle, dans la base de données processus biologique (BP), pour les gènes surexprimés. Les termes GO incluent dans au moins trois listes ont été sélectionnés et encadrés en rouge. Le tableau 24 récapitule le nombre de termes sélectionnés par cette méthode dans chaque comparaison.

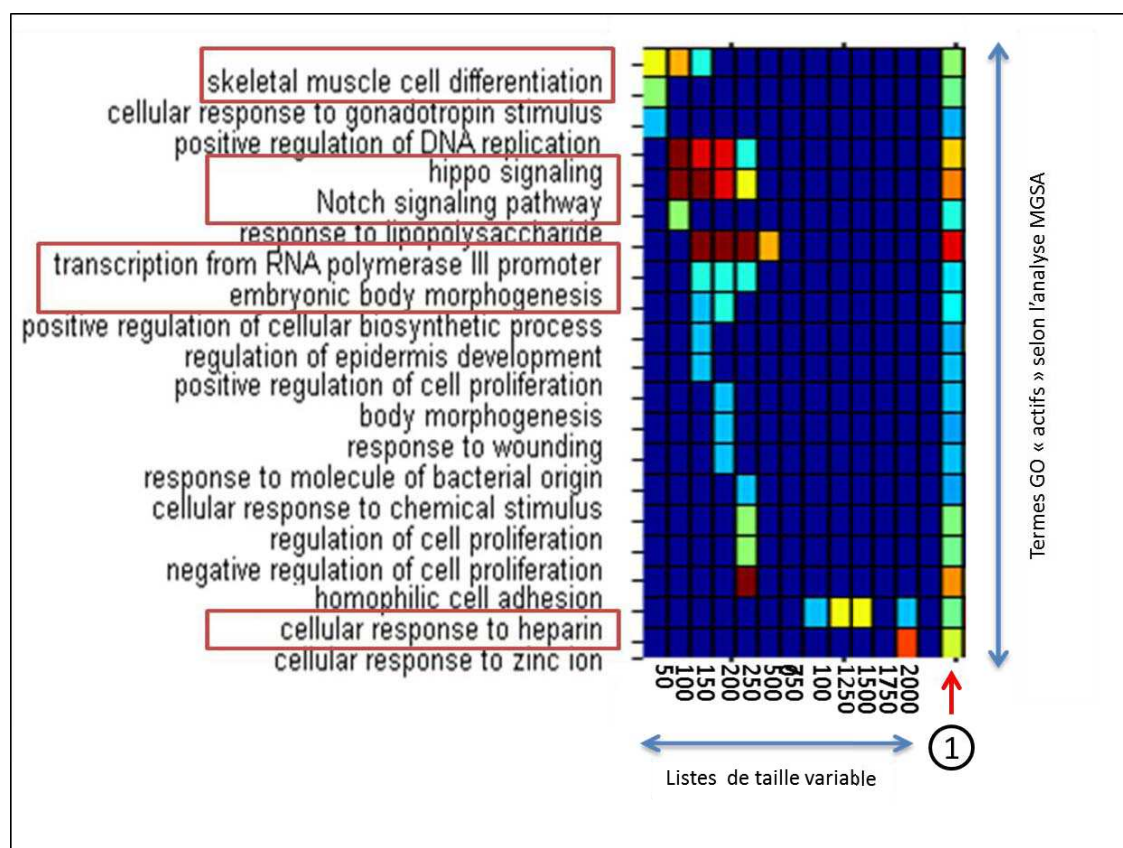


Figure 59: Exemple de résultat d'analyse MGSA : comparaison EAPB0503 versus contrôle, base de données processus biologique (BP) de GO, pour les gènes surexprimés.

Termes GO ayant un score $\geq 0,5$ dans au moins trois analyses sur 10, dans des listes de longueurs égales à 50, 100, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 et 2000. Pour chaque taille de liste, la couleur indique le nombre d'analyses MGSA pour lesquelles le score est $\geq 0,5$ (bleu foncé = 0 ; rouge foncé = 10). La moyenne des scores calculée sur toutes les tailles de liste est représentée selon la même échelle dans la dernière colonne (1). Les termes encadrés en rouge sont les termes retrouvés au minimum dans trois listes, et donc sélectionnés pour les analyses suivantes.

	Nombre des termes GO			Nombre des gènes		
	Sur-exprimés	Sous-exprimés	total	Sur-exprimés	Sous-exprimés	total
EAPB0503-u (Colchicine, Maytansine, Vinorelbine)	13	19	32	15	34	49
EAPB0503 vs Contrôle	7	8	15	16	13	29
N(EAPB0503, Colchicine)	4	5	9	11	6	17

Tableau 24: nombre de termes GO et gènes associés après sélection des termes inclus dans au moins 3 listes.

Le détail des termes GO obtenu par analyse MGSA puis réduction est disponible dans les tableaux 25, 26 et 27. Ces tableaux sont respectivement pour les trois listes choisies EAPB0503-u(Colchicine, Maytansine, Vinorelbine), EAPB0503 Versus Contrôle, et n(EAPB0503, Colchicine).

	Identité des termes GO	Définition de la fonction biologique de chaque terme	Base de données
Surexprimé	GO:0051865	protein autoubiquitination	BP
	GO:0051260	protein homooligomerization	BP
	GO:0016266	O-glycan processing	BP
	GO:0006911	phagocytosis, engulfment	BP
	GO:0000075	cell cycle checkpoint	BP
	GO:0043123	positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	BP
	GO:0005881	cytoplasmic microtubule	CC
	GO:0000981	sequence-specific DNA binding RNA polymerase II transcription factor activity	MF
	GO:0005200	structural constituent of cytoskeleton	MF
	GO:0005540	hyaluronic acid binding	MF
	GO:0004553	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	MF
	GO:0003785	actin monomer binding	MF
	GO:0008195	phosphatidate phosphatase activity	MF
Sous-exprimé	GO:0045444	fat cell differentiation	BP
	GO:0060021	palate development	BP
	GO:0021955	central nervous system neuron axonogenesis	BP
	GO:0032354	response to follicle-stimulating hormone	BP
	GO:0007598	blood coagulation, extrinsic pathway	BP
	GO:0072089	stem cell proliferation	BP
	GO:0008307	structural constituent of muscle	MF
	GO:0005201	extracellular matrix structural constituent	MF
	GO:0015293	symporter activity	MF
	GO:0008028	monocarboxylic acid transmembrane transporter activity	MF
	GO:0003746	translation elongation factor activity	MF
	GO:0008140	cAMP response element binding protein binding	MF
	GO:0072590	N-acetyl-L-aspartate-L-glutamate ligase activity	MF
	GO:0072591	citrate-L-glutamate ligase activity	MF
	GO:0008526	phosphatidylinositol transporter activity	MF
	GO:0016324	apical plasma membrane	CC
	GO:0030027	Lamellipodium	CC
GO:0005811	lipid particle	CC	
GO:0005681	spliceosomal complex	CC	

Tableau 25: termes GO « actifs » pour la comparaison EAPB0503-u(Colchicine, Maytansine, Vinorelbine). BP : base de donnée « processus biologique » de GO, MF : base de donnée « fonction moléculaire », CC : base de donnée «composant cellulaire ».

	Identité des termes GO	Définition de la fonction biologique des termes	Base de données
Surexprimé	GO:0035914	skeletal muscle cell differentiation	BP
	GO:0035329	hippo signaling	BP
	GO:0007219	Notch signaling pathway	BP
	GO:0006383	transcription from RNA polymerase III promoter	BP
	GO:0010172	embryonic body morphogenesis	BP
	GO:0005201	extracellular matrix structural constituent	MF
	GO:0008112	nicotinamide N-methyltransferase activity	MF
Sous-exprimé	GO:0048286	lung alveolus development	BP
	GO:0007156	homophilic cell adhesion	BP
	GO:0010499	proteasomal ubiquitin-independent protein catabolic process	BP
	GO:0045210	FasL biosynthetic process	BP
	GO:0005519	cytoskeletal regulatory protein binding	MF
	GO:0005540	hyaluronic acid binding	MF
	GO:0032184	SUMO polymer binding	MF
	GO:0005578	proteinaceous extracellular matrix	CC

Tableau 26: termes GO « actifs » pour la comparaison EAPB0503 Versus Contrôle. BP : base de donnée « processus biologique » de GO, MF : base de donnée « fonction moléculaire », CC : base de donnée « composant cellulaire ».

	Identité des termes GO	Définition de la fonction biologique des termes	Base de données
Surexprimé	GO:0048009	insulin-like growth factor receptor signaling pathway	BP
	GO:0006383	transcription from RNA polymerase III promoter	BP
	GO:0006970	response to osmotic stress	BP
	GO:0030054	cell junction	CC
Sous exprime	GO:0007156	homophilic cell adhesion	BP
	GO:0010499	proteasomal ubiquitin-independent protein catabolic process	BP
	GO:0045210	FasL biosynthetic process	BP
	GO:0032808	lacrimal gland development	BP
	GO:0005519	cytoskeletal regulatory protein binding	MF

Tableau 27: termes GO « actifs » pour la comparaison n(EAPB0503, Colchicine). BP : base de donnée « processus biologique » de GO, MF : base de donnée « fonction moléculaire », CC : base de donnée « composant cellulaire ».

IV.2.3.2.2.5 RESN

Devant le nombre de termes GO générés dans la sélection précédente, on s'était posé la question de savoir si l'on pouvait regrouper les termes GO proches afin de réduire la liste pour en faciliter l'analyse à travers la méthode définie par Resnik(247). Pour calculer similarité sémantique de deux termes, on utilise la valeur du niveau d'information du plus proche parent commun aux deux termes. La figure 60 donne un exemple des résultats obtenus par cette analyse.

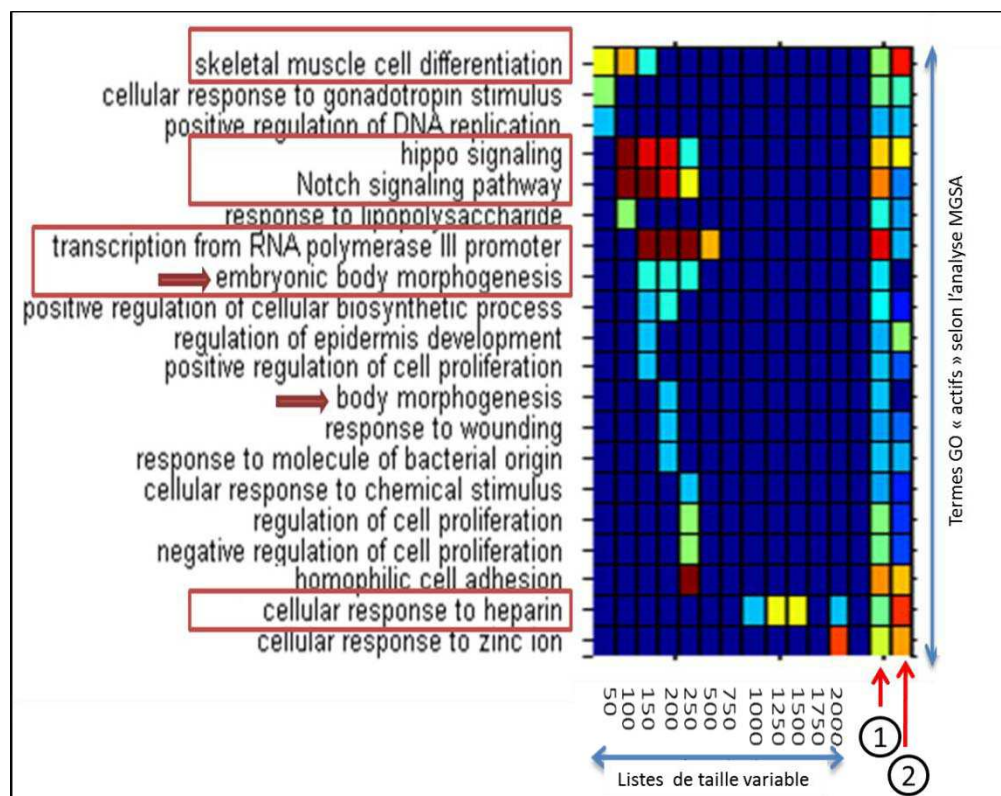


Figure 60 : Exemple de résultat d'analyse MGSA puis RESN : comparaison EAPB0503 versus contrôle, base de données processus biologique (BP) de GO, pour les gènes surexprimés.

Termes GO ayant un score $\geq 0,5$ dans au moins trois analyses sur 10, dans des listes de longueurs égales à 50, 100, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 et 2000. Pour chaque taille de liste, la couleur indique le nombre d'analyses MGSA pour lesquelles le score est $\geq 0,5$ (bleu foncé = 0 ; rouge foncé = 10). La moyenne des scores calculée sur toutes les tailles de liste est représentée selon la même échelle dans l'avant-dernière colonne (1). Les termes encadrés en rouge sont les termes retrouvés au minimum dans trois listes, et donc précédemment sélectionnés. Dans la dernière colonne (2), la similarité sémantique calculée par RESN est représentée avec la même échelle. Les termes précédés d'une flèche rouge ne sont pas retrouvés par RESN.

Le logiciel RESN ne détecte pas tous les termes GO (flèche rouge dans la figure 60). Donc RESN ne nous permet pas de tirer des conclusions utiles. Nous avons donc utilisé un autre logiciel pour réaliser le regroupement de termes : REVIGO.

IV.2.3.2.2.6 REVIGO

REVIGO (REduce and Visualise les termes GO) peut gérer de longues listes de termes Gene Ontology (GO) et les résumer en supprimant les termes GO redondants. Ces termes peuvent être visualisés par des graphiques interactifs ou « tree map » (figure 61).

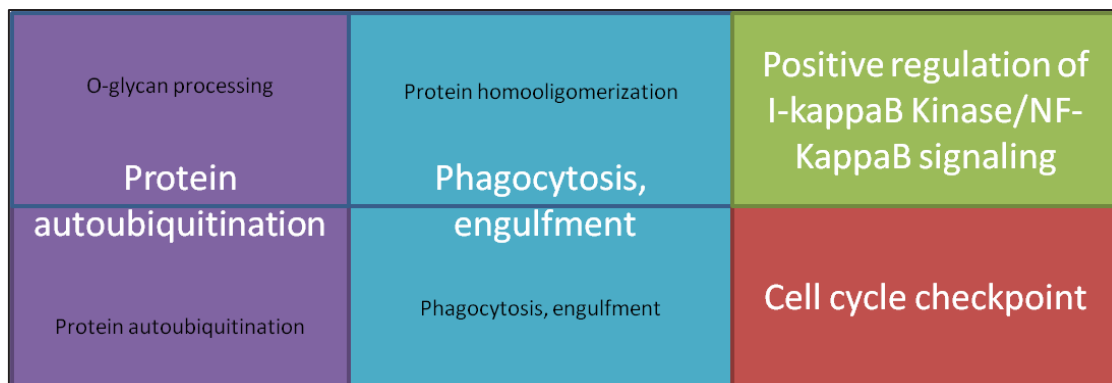


Figure 61: Tree map représentative des termes GO : comparaison EAPB0503-u(Colchicine, Maytansine, Vinorelbine) base de données processus biologique (BP) de GO, pour les gènes surexprimés. Chaque couleur représente les termes qui se regroupent.

IV.2.3.2.2.7 Termes GO finalement sélectionnés pour la recherche d'hypothèses mécanistiques

Après les étapes d'enrichissement fonctionnel (MGSA), de simplification (réduction du nombre de termes GO en fonction de leur fréquence d'apparition), et de regroupement (REVIGO), les termes GO suivants ont été sélectionnés et présentés dans les tableaux 28, 29 et 30.

	Identité des termes GO	Définition des termes	Base de données	Population	Nombre de gènes	Gènes
Sur-exprimé	GO:0051865	protein autoubiquitination	BP	42	1	RNF213
	GO:0016266	O-glycan processing	BP	53	2	MUC15 ST6GAL1
	GO:0006911	phagocytosis, engulfment	BP	20	2	ABCA1 GULP1
	GO:0051260	protein homooligomerization	BP	238	3	KCTD15 PRNP TAF10
	GO:0000075	cell cycle checkpoint	BP	230	1	CCNG2
	GO:0043123	positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	BP	150	2	CXXC5 TNFRSF11
	GO:0005881	cytoplasmic microtubule	CC	54	2	GRAMD3 TUBA1A
	GO:0000981	sequence-specific DNA binding RNA polymerase II transcription factor activity	MF	291	3	ETV6 EHF MEF2C
	GO:0005200	structural constituent of cytoskeleton	MF	92	6	HIP1 NEFL TUBA1A TUBB TUBB3 TUBB4B
	GO:0005540	hyaluronic acid binding	MF	20	1	HAPLN1
	GO:0008195	phosphatidate phosphatase activity	MF	8	1	PPAP2C
GO:0004553	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	MF	87	1	LCTL	
GO:0003785	actin monomer binding	MF	15	1	PKNOX2	
Sous-exprimé	GO:0045444	fat cell differentiation	BP	156	2	IL11 METRNL
	GO:0060021	palate development	BP	76	2	BNC2 TIPARP
	GO:0032354	response to follicle-stimulating hormone	BP	11	1	PAPPA
	GO:0021955	central nervous system neuron axonogenesis	BP	30	2	PTEN PTENP1
	GO:0007598	blood coagulation, extrinsic pathway	BP	5	1	TFPI
	GO:0072089	stem cell proliferation	BP	125	1	ABCB1
	GO:0005201	extracellular matrix structural constituent	MF	67	2	MATN3 TFPI2
	GO:0015293	symporter activity	MF	120	2	SLC16A6 SLC24A3
	GO:0008526	phosphatidylinositol transporter activity	MF	5	1	PITPNC1
	GO:0003746	translation elongation factor activity	MF	20	1	ELL2
	GO:0008140	cAMP response element binding protein binding	MF	8	1	CREM
	GO:0072591	citrate-L-glutamate ligase activity	MF	1	1	RIMKLB
	GO:0016324	apical plasma membrane	CC	237	8	ABCB1 ADRB2 ATP6V0A4 CD55 NHS PDE4D RAB27B SLC7A5
	GO:0030027	lamellipodium	CC	136	3	NHS NEDD9 SH3RF1
	GO:0005811	lipid particle	CC	53	1	STARD13
GO:0005681	spliceosomal complex	CC	145	1	SREK1	

Tableau 28: termes GO sélectionnés pour la comparaison EAPB0503-u(Colchicine, Maytansine, Vinorelbine) après analyse MGSA, simplification, puis regroupement par REVIGO. BP : base de donnée « processus biologique » de GO, MF : base de donnée « fonction moléculaire », CC : base de donnée « composant cellulaire », population : nombre de gènes définissant le terme GO, Nombre de gènes : nombre de gènes du terme GO altérés dans la comparaison.

	Identité des termes GO	Définition de la fonction biologique des termes	Base de données	Population	Nombre de gènes	Gènes
Surexprimé	GO:0035329	hippo signaling	BP	32	4	AMOTL2 LATS2 SAV1 TEAD1
	GO:0007219	Notch signaling pathway	BP	157	1	HDAC9
	GO:0010172	embryonic body morphogenesis	BP	9	1	TFAP2A
	GO:0005201	skeletal muscle cell differentiation	BP	54	6	ANKRD1 ATF3 CITED2 KLF5 MAFF PLAGL1
	GO:0006383	transcription from RNA polymerase III promoter	BP	51	1	SNAPC1
	GO:0005201	extracellular matrix structural constituent	MF	67	2	MATN3 TFPI2
	GO:0008112	nicotinamide N-methyltransferase activity	MF	1	1	NNMT
Sous-exprimé	GO:0010499	proteasomal ubiquitin-independent protein catabolic process	BP	4	1	ENC1
	GO:0045210	FasL biosynthetic process	BP	2	1	PHLDA1
	GO:0048286	lung alveolus development	BP	39	5	BMPR2 FZD1 SOX2 STRA6 TNS3
	GO:0007156	homophilic cell adhesion	BP	120	2	PCDH10 PCDH7
	GO:0005519	cytoskeletal regulatory protein binding	MF	1	1	CDC42EP3
	GO:0032184	SUMO polymer binding	MF	5	1	SOBP
	GO:0005540	hyaluronic acid binding	MF	20	1	HAPLN1
	GO:0005578	proteinaceous extracellular matrix	CC	324	4	EMILN1

Tableau 29: termes GO sélectionnés pour la comparaison EAPB0503 versus CONTROLE après analyse MGSA, simplification, puis regroupement par REVIGO. BP : base de donnée « processus biologique » de GO, MF : base de donnée « fonction moléculaire », CC : base de donnée « composant cellulaire », population : nombre de gènes définissant le terme GO, Nombre de gènes : nombre de gènes du terme GO altérés dans la comparaison.

	Identité des termes GO	Définition de la fonction biologique des termes	Base de données	Population	Nombre de gènes	Gènes
Surexprimé	GO:0048009	insulin-like growth factor receptor signaling pathway	BP	32	2	CRIM1 IRS1
	GO:0006383	transcription from RNA polymerase III promoter	BP	51	1	SNAPC1
	GO:0006970	response to osmotic stress	BP	62	1	TSC22D2
	GO:0030054	cell junction	CC	788	7	ARC DACT1 DLGAP1 GLRB PDLIM5 SAMD4A SV2C
Sous-exprimé	GO:0007156	homophilic cell adhesion	BP	120	2	PCDH10 PCDH7
	GO:0010499	proteasomal ubiquitin-independent protein catabolic process	BP	4	1	ENC1
	GO:0045210	FasL biosynthetic process	BP	2	1	PHLDA1
	GO:0032808	lacrimal gland development	BP	5	1	IGSF3
	GO:0005519	cytoskeletal regulatory protein binding	MF	1	1	CDC42EP3

Tableau 30: termes GO sélectionnés pour la comparaison n(EAPB0503, Colchicine) après analyse MGSA, simplification, puis regroupement par REVIGO. BP : base de donnée « processus biologique » de GO, MF : base de donnée « fonction moléculaire », CC : base de donnée « composant cellulaire », population : nombre de gènes définissant le terme GO, Nombre de gènes : nombre de gènes du terme GO altérés dans la comparaison.

Après analyse des résultats pour chaque comparaison, soit EAPB0503-u(colchicine, maytansine, vinorelbine) (tableau 28), soit EAPB0503 vs contrôle (tableau 29), soit n(EAPB0503,colchicine) (tableau 30), on trouve que la plupart des gènes sont soit inclus dans la base« processus biologique » (la majorité), soit inclus dans la base « fonction moléculaire ». Ces types de terme nous aident à formuler des hypothèses sur le(s) mécanisme(s) d'action de l'EAPB0503. Ainsi, l'implication de ses termes laisse supposer un rôle des gènes correspondants dans ce(s) mécanisme(s).

IV.2.3.2.2.8 Hypothèses mécanistiques : recherche bibliographique

Afin de mettre en lumière le(s) mécanisme(s) d'action de l'**EAPB0503** original (aux) par rapport à son activité anti-tubuline, la recherche bibliographique a été centrée sur les termes GO (et gènes associés) obtenus après analyses des deux comparaisons suivantes : EAPB0503-u(Colchicine, Maytansine, Vinorelbine), et EAPB0503 Versus Contrôle. Ces termes sont principalement reliés surtout à la phagocytose (« engulfment »), à l'actine, aux protéines régulatrices du cytosquelette, à l'adhésion cellulaire homophile, aux lamellipodes, au processus catabolique de dégradation protéique protéasomale ubiquitine-indépendant et au FasL.

La littérature décrit la phagocytose des cellules apoptotiques comme un processus exigeant la coordination des phagocytes à travers l'activation de la famille des Rho GTPases, qui règle la dynamique de l'actine. De plus, la phagocytose des cellules apoptotiques par les lamellipodes des phagocytes se ferait après activation de Rac1 (259). Ce mécanisme dépend de la réorganisation du réseau d'actine (260,261). La transduction de signal menant à cette réorganisation a été étudiée dans *C. elegans* (253,262). Ces études ont révélé deux voies de signalisation qui convergent à Ced-10/Rac-1. Puis, des études ultérieures sur modèle mammifère ont confirmé la participation de la famille des Rho GTPases et de protéines homologues aux protéines CED (262–264). Ainsi, Rac1 a deux rôles différents dans la phagocytose des cellules apoptotiques. Son premier rôle est de mobiliser les membranes cellulaires afin d'établir les lamellipodes. Son deuxième rôle est de régler la dynamique d'actine pendant la phagocytose. Par ailleurs, Rac1 est aussi activé lors de l'adhésion cellulaire à la matrice par les intégrines et les cadhérines (265). Enfin, l'apoptose induite par Rac GTPase est corrélée avec l'induction de FasL et la production de céramides(266).

Les deux hypothèses mécanistiques pour EAPB0503 que nous pouvons émettre sont donc les suivantes (figure 62) :

1. Altération de la signalisation associée aux intégrines (adhésion cellulaire principalement), qui régule une grande variété de voies de signalisation. Un argument supplémentaire en faveur de cette hypothèse est l'altération des gènes Cdc42EP3, GULP et ABCA1, tous trois impliqués dans le mécanisme cellulaire de phagocytose, probablement via la voie LPR, CED6/GULP, CED7/ABCA1, et CED10/RAC1.
2. Altération de la signalisation associée au récepteur de mort TNFR et au FasL.

Finalement, d'autres méthodes d'enrichissement fonctionnel, visant à mettre en évidence l'altération, dans nos modèles, de réseaux d'interaction protéique ou de voies de signalisation, ont été appliquées dans le but de confirmer ces hypothèses.

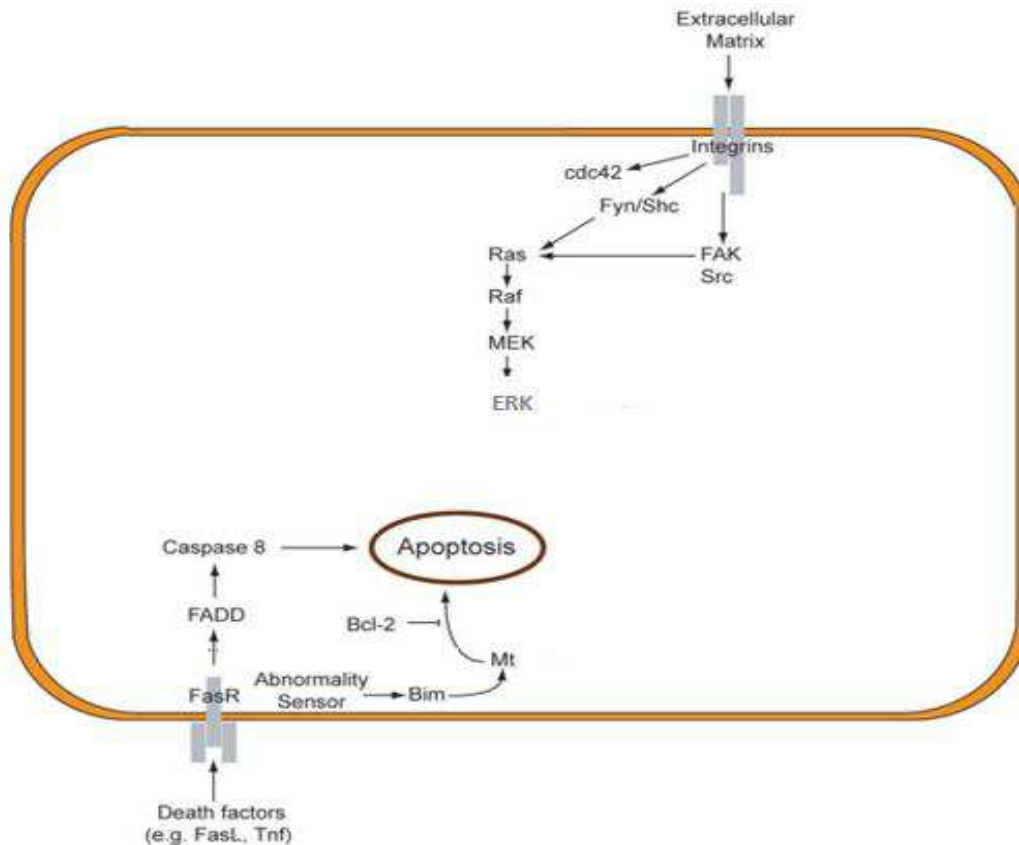


Figure 62: Représentation schématique des voies de signalisation cellulaire potentiellement à l'origine du (des) mécanisme(s) d'action de l'EAPB0503.

IV.2.3.2.2.9 Autres méthodes d'enrichissement fonctionnel: confirmation des hypothèses mécanistiques

IV.2.3.2.2.9.1 GENEMANIA

Afin d'identifier certaines voies impliquées dans les mécanismes d'actions d'EAPB0503 sur la lignée A375, nous avons analysé tous les gènes sélectionnés des tableaux 24, 25, et 26 par le programme GeneMANIA voir « Matériels et Méthodes ». Ceci a permis de mettre en évidence, via la fonctionnalité « génération des réseaux et analyse fonctionnelle », des réseaux intermoléculaires à partir de gènes différentiellement exprimés (soit surexprimés soit sous-exprimés) entre les traitements étudiés et de les associer à leurs fonctions par la suite. Les données ainsi obtenues sont rapportées dans les figures 63, 64, 65, 66, 67 et 68. Ces réseaux sont fortement enrichis en gènes étudiés (6 à 36 gènes par réseau), ce qui est synonyme d'une grande significativité des résultats.

Certaines fonctions ainsi obtenues, comme « regulation of cell Shape », « microtubule », « cytoskeleton », « phagocytic vesicle membrane » et « G2/M transition of mitotic cell cycle », sont en accord avec nos deux hypothèses.

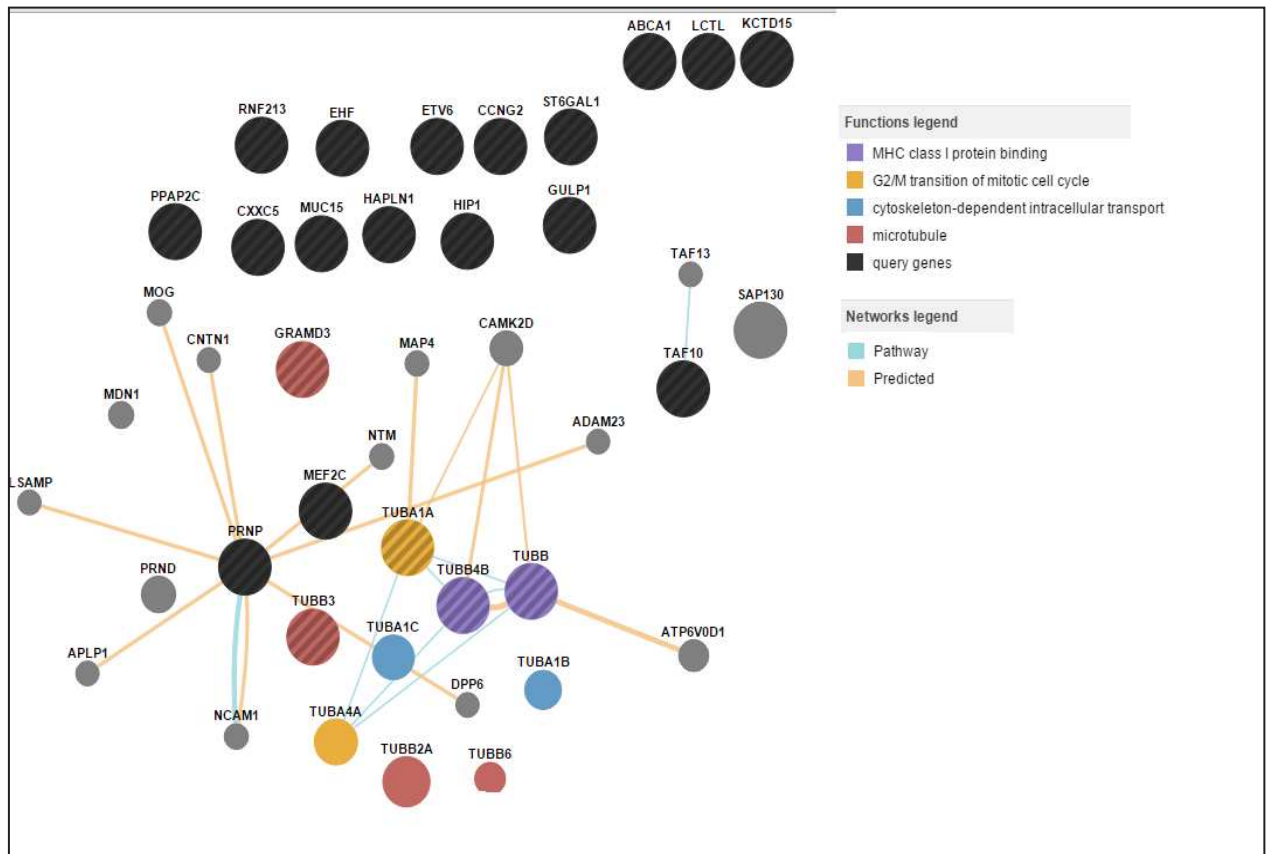


Figure 63: Réseau obtenu après analyse par GENEMANIA des gènes surexprimés dans la comparaison EAPB0503-u(COLCHCIINE, MAYTANSINE, VINOURELBINE)

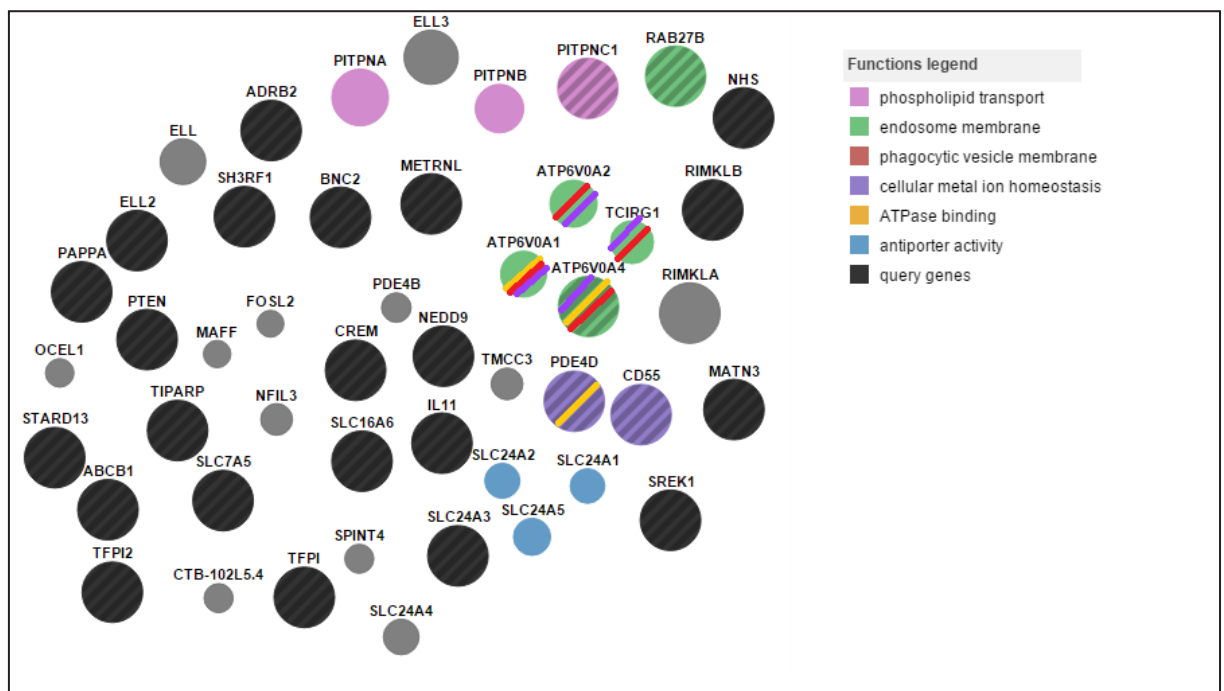


Figure 64: Réseau obtenu après analyse par GENEMANIA des gènes sous-exprimés dans la comparaison EAPB0503-u(COLCHCIINE, MAYTANSINE, VINOURELBINE)

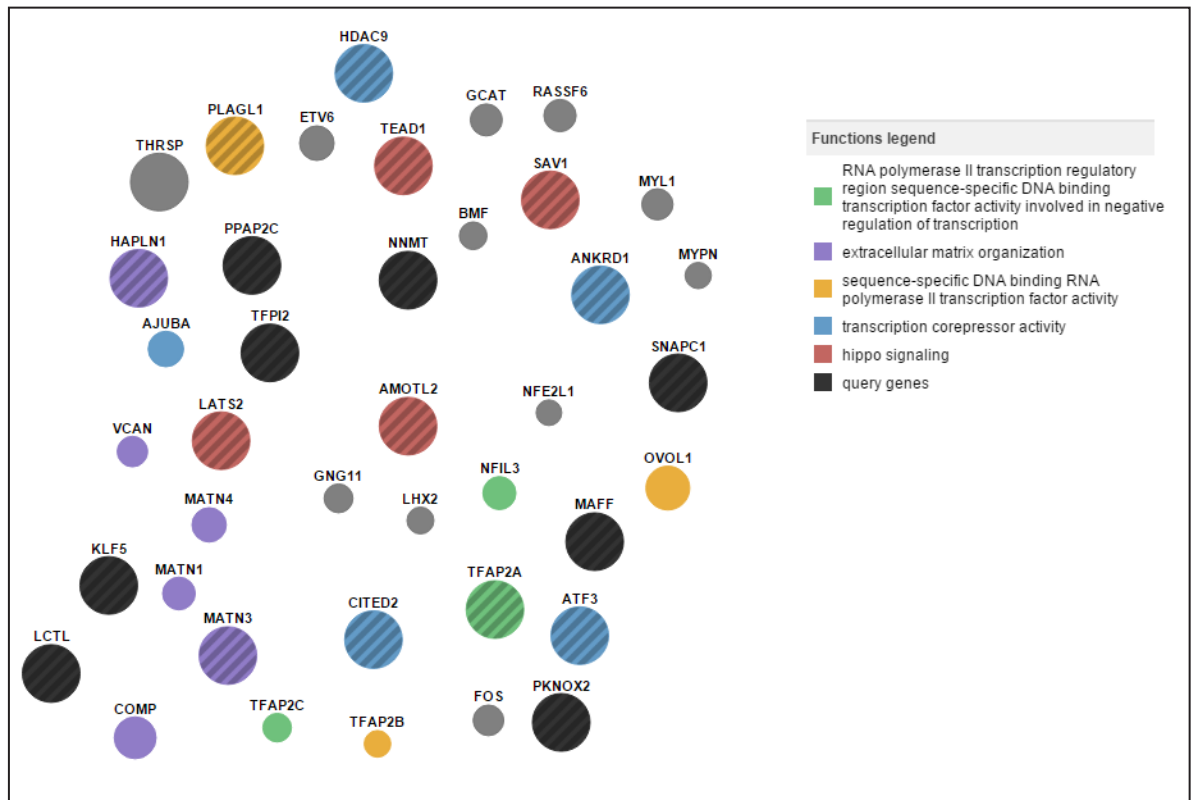


Figure 65: Réseau obtenu après analyse par GENEMANIA des gènes surexprimés dans la comparaison EAPB0503:6h vs CONT:6H

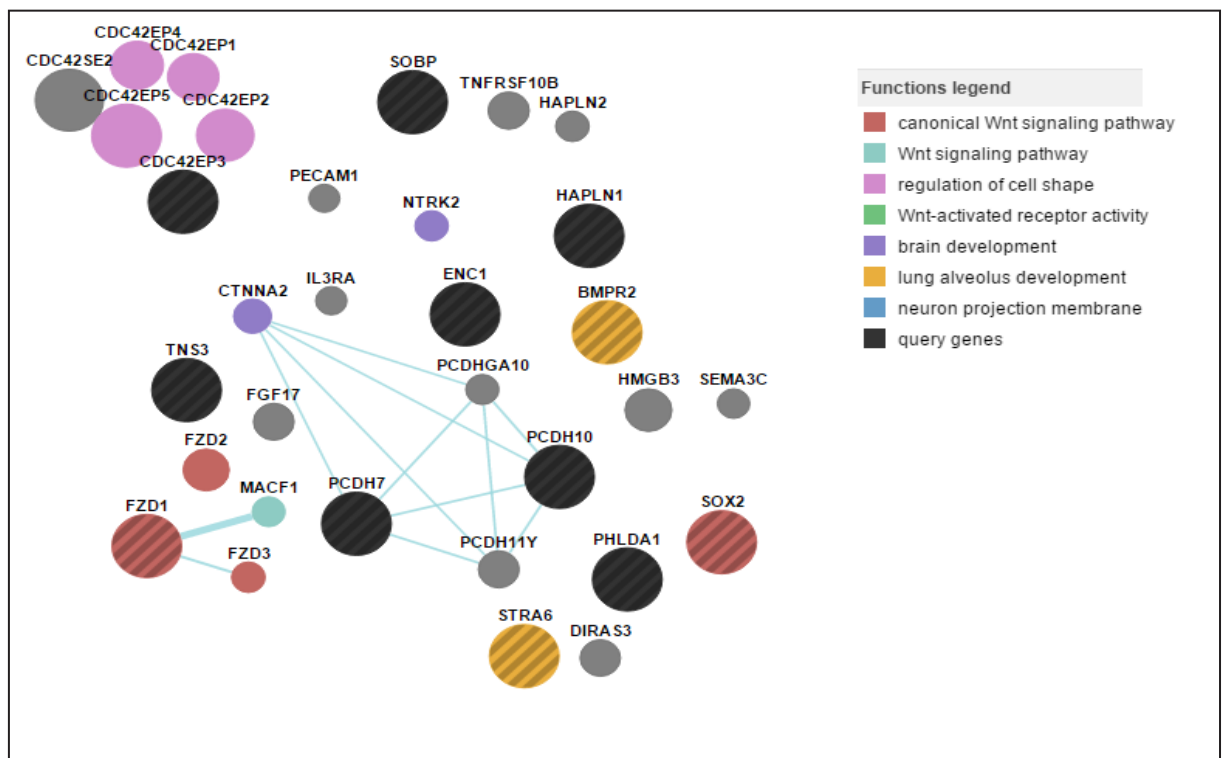


Figure 66: Réseau obtenu après analyse par GENEMANIA des gènes sous-exprimés dans la comparaison EAPB0503:6h vs CONT:6H.

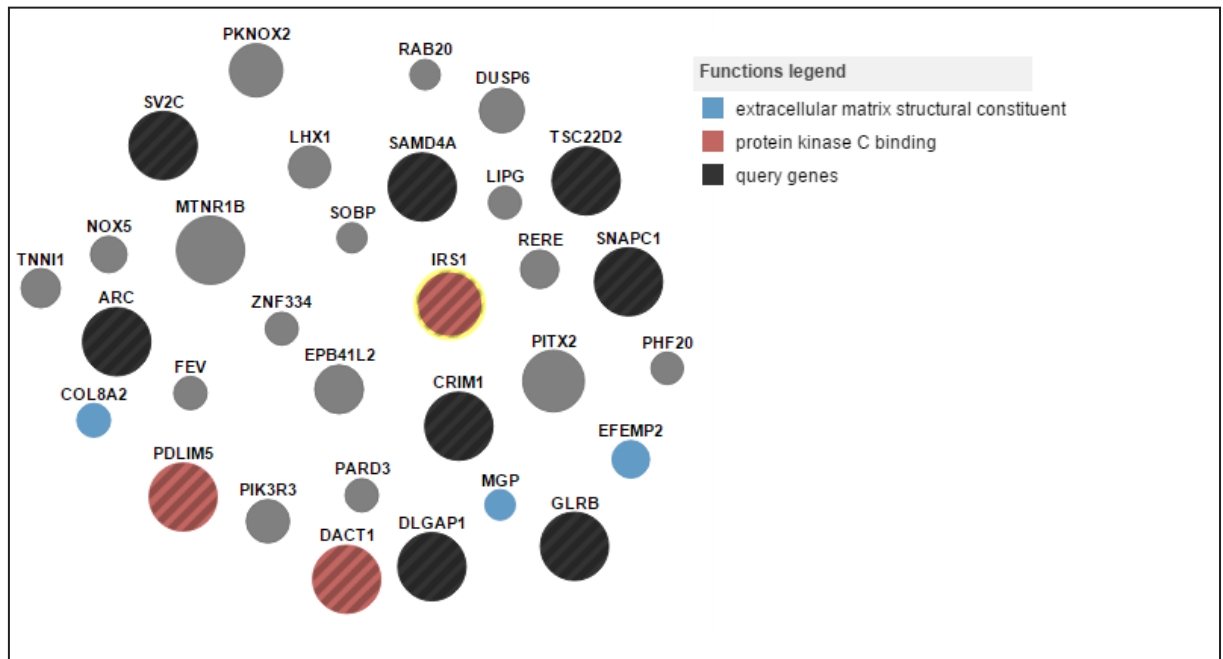


Figure 67 : Réseau obtenu après analyse par GENEMANIA des gènes surexprimés dans la comparaison $n(EAPB0503, COLCH):6H$

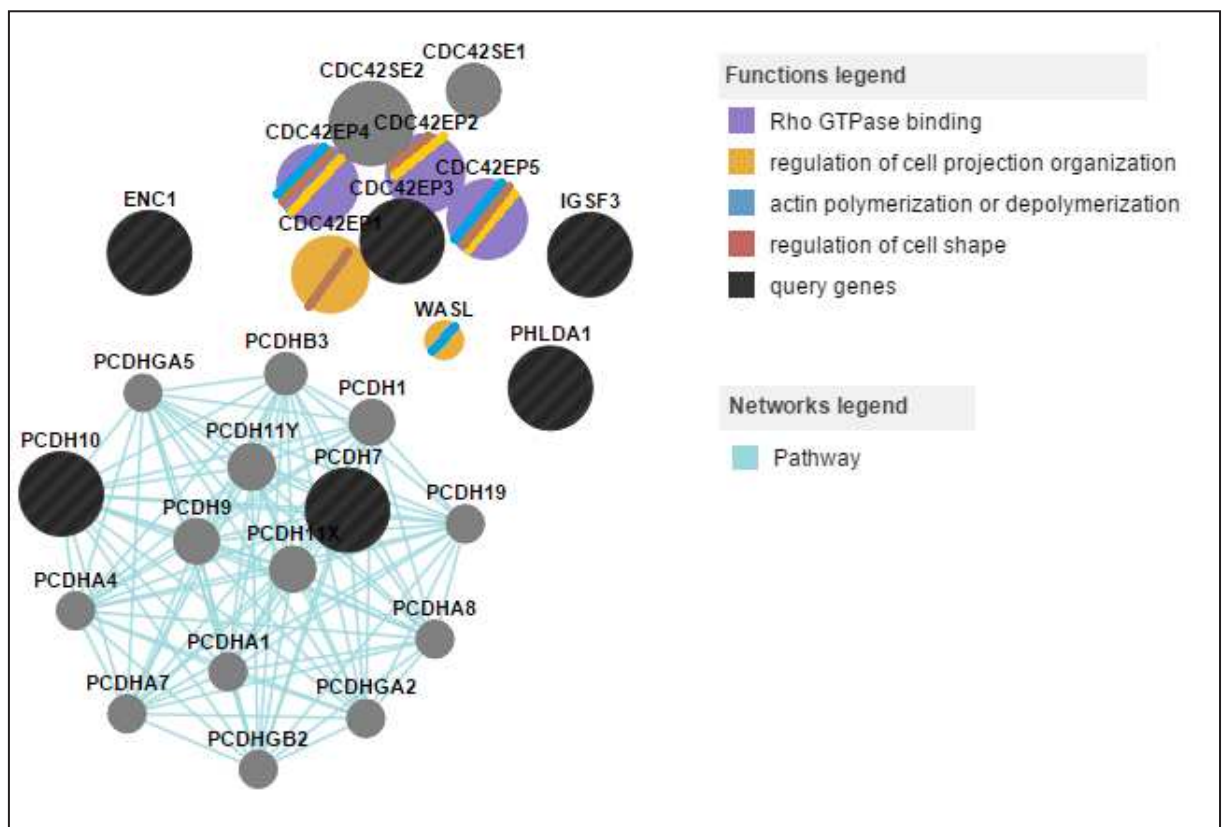


Figure 68: Réseau obtenu après analyse par GENEMANIA des gènes sous-exprimés dans la comparaison $n(EAPB0503, COLCH):6H$

GENE MANIA permet de relier les gènes à des voies de signalisation par l'indication « pathway ». Dans nos analyses, seuls les gènes PCDH7, PCDH10 et TUBB sont reliés

par des voies de signalisation. D'où la nécessité de chercher quelles voies exactement par un autre logiciel : PATHWAY LINKER.

IV.2.3.2.2.9.2 PATHAW LINKER

Pathway Linker est conçu pour lier les gènes d'intérêt à des voies de signalisation, des interactions protéine-protéine et / ou des interactions géniques.

Le top 12 des voies de signalisations détectées par PATHAW LINKER après analyse de nos gènes d'intérêt (sur- et sous-exprimés) sont répertoriées dans les figures 69, 70 et 71. Ces voies sont représentées selon leur valeur de p-value par un gradient de couleur : de foncé (p value importante) à clair (p value faible).

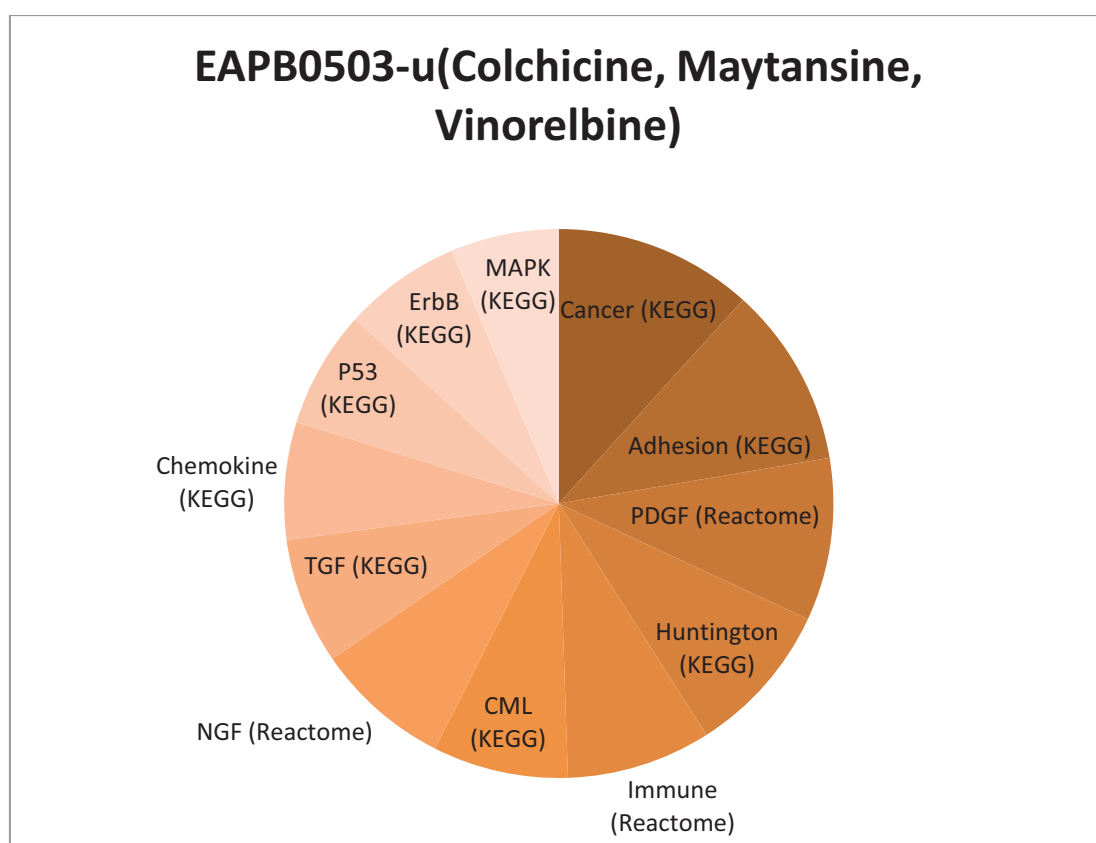


Figure 69: 12 premières voies de signalisation obtenues après analyse par PATHWAY LINKER des gènes dont l'expression est altérée dans la comparaison EAPB0503-u(COLCHICINE, MAYTANSINE, VINOURELBINE)

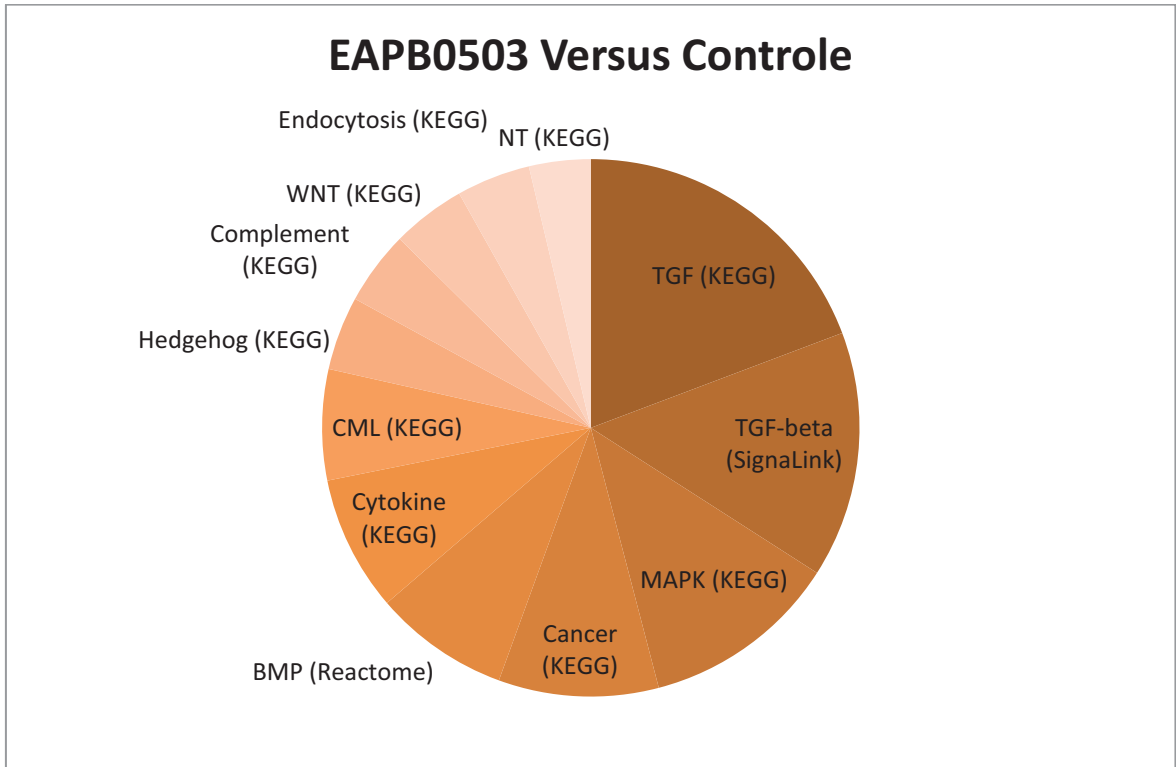


Figure 70: 12 premières voies de signalisation obtenues après analyse par PATHWAY LINKER des gènes dont l'expression est altérée dans la comparaison EAPB0503 Versus Contrôle

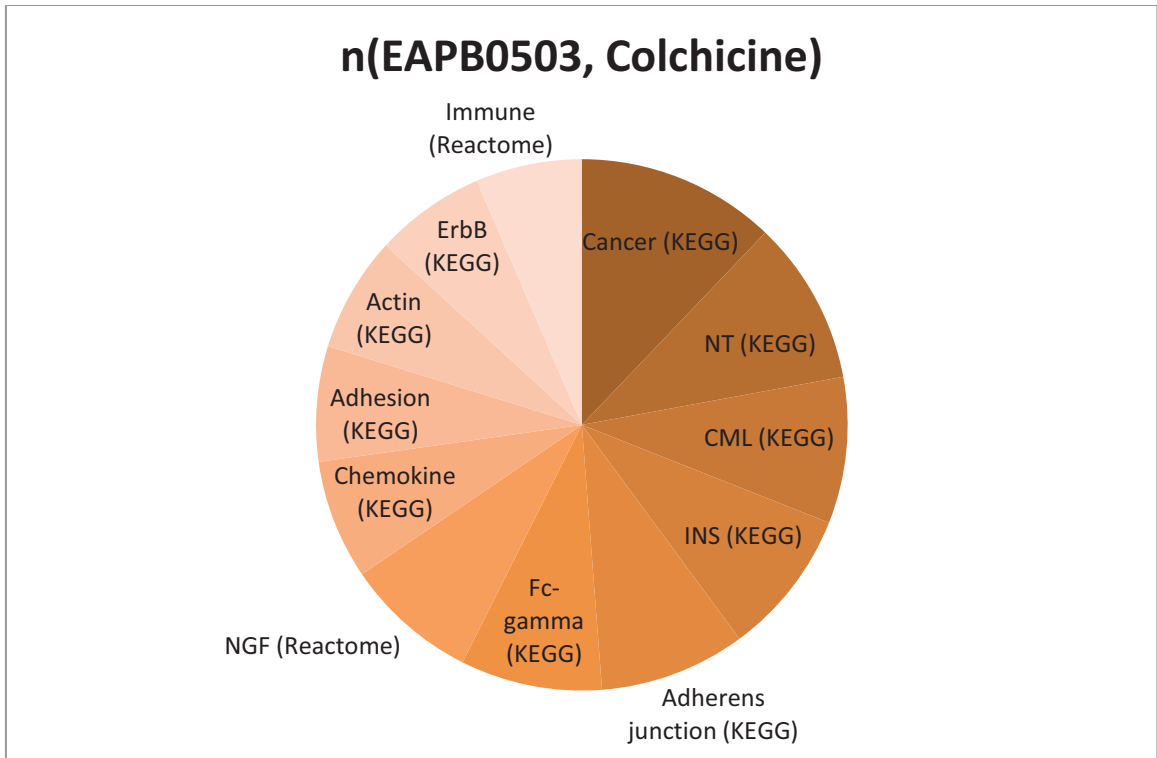


Figure 71: 12 premières voies de signalisation obtenues après analyse par PATHWAY LINKER des gènes dont l'expression est altérée dans la comparaison (EAPB0503, Colchicine)

Les résultats de EAPB0503-u(Colchicine, Maytansine, Vinorelbine) (figure 69) montrent que les voies du cancer et l'adhésion sont les plus impliquées, ce qui est en accord avec la première hypothèse mécanistique. En revanche, ce sont les voies TGF, TGF-Beta et MAPK qui sont les plus impliquées dans la comparaison EAPB0503 Versus Contrôle, et les voies du cancer et NT dans la comparaison n(EAPB0503, Colchicine). Ce qui indique la forte implication de la voie d'adhésion pour **EAPB0503** seule par rapport aux autres.

Pour vérifier l'implication de ces voies dans les mécanismes d'action d'**EAPB0503**, des études fonctionnelles *in vitro* ont été réalisées.

IV.2.3.3 Conclusion

Deux hypothèses mécanistiques pour **EAPB0503** ressortent de l'analyse transcriptomique :

1. Altération de la signalisation associée aux intégrines
2. Altération de la signalisation associée au récepteur de mort TNFR et au FasL.

Parmi ces deux hypothèses, celle de la voie des intégrines semble être la plus probable. Nous allons donc vérifier cette hypothèse *in vitro*.

IV.3 Partie 3 : validation biologique du mécanisme d'action

IV.3.1 Introduction

L'analyse biologique du mécanisme d'action a pour but de confirmer nos hypothèses au niveau protéique. Pour ce faire, nous devons avoir une concordance entre les modifications d'expression révélée par l'étude transcriptomique, et les modifications d'expression protéiques. Ainsi, il est nécessaire de mettre en évidence les augmentations et les baisses d'expressions des protéines, mais aussi les niveaux de phosphorylations de protéines (kinases).

IV.3.2 Design des études

Cette études a été réalisée sur la lignée cellulaire de mélanome A375, déjà utilisée sur les puces.

Les durées des traitements utilisés sont inférieure ou égale à 6h. En effet, l'étude transcriptomique nous a révélé qu'au-delà de cette durée, les résultats étaient non discriminants (cf. puces 24h). De plus la phosphorylation est un phénomène rapide donc nous avons choisi un intervalle de temps allant de 0.5h à 6h.

Les doses choisies sont les suivantes : CI50/10, CI50, CI50*10. Ainsi, nous pouvons mettre en évidence les mécanismes dose dépendants.

IV.3.3 Résultats

IV.3.3.1 Détection de niveau d'activation par pathscan

Nous avons utilisé une puce à protéine PathScan® afin de détecter les modifications d'expression des voies de signalisations intracellulaires (figure 72 B). Les protéines cellulaires et des nœuds de signalisation, uniquement lorsqu'ils sont phosphorylée où cliver au niveau des résidus spécifiés, sont révélés par cette puce. Elle nous permet donc, de révéler les activations ou inhibitions des voies de signalisations.

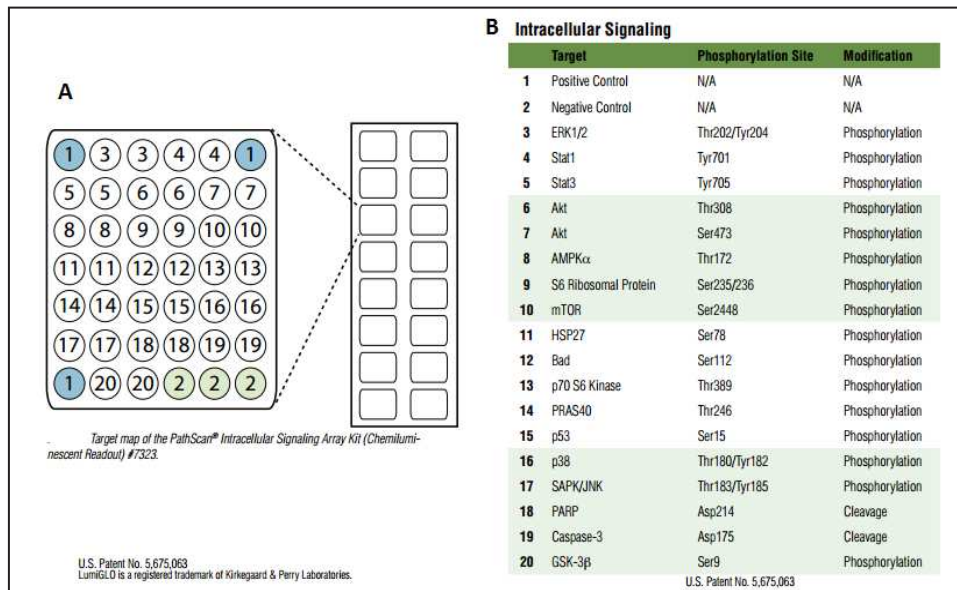


Figure 72: (A) Carte cible du Kit Array signalisation intracellulaire PathScan®. (B) les protéines présentes dans ce kit et qui rentre dans la signalisation intracellulaire.

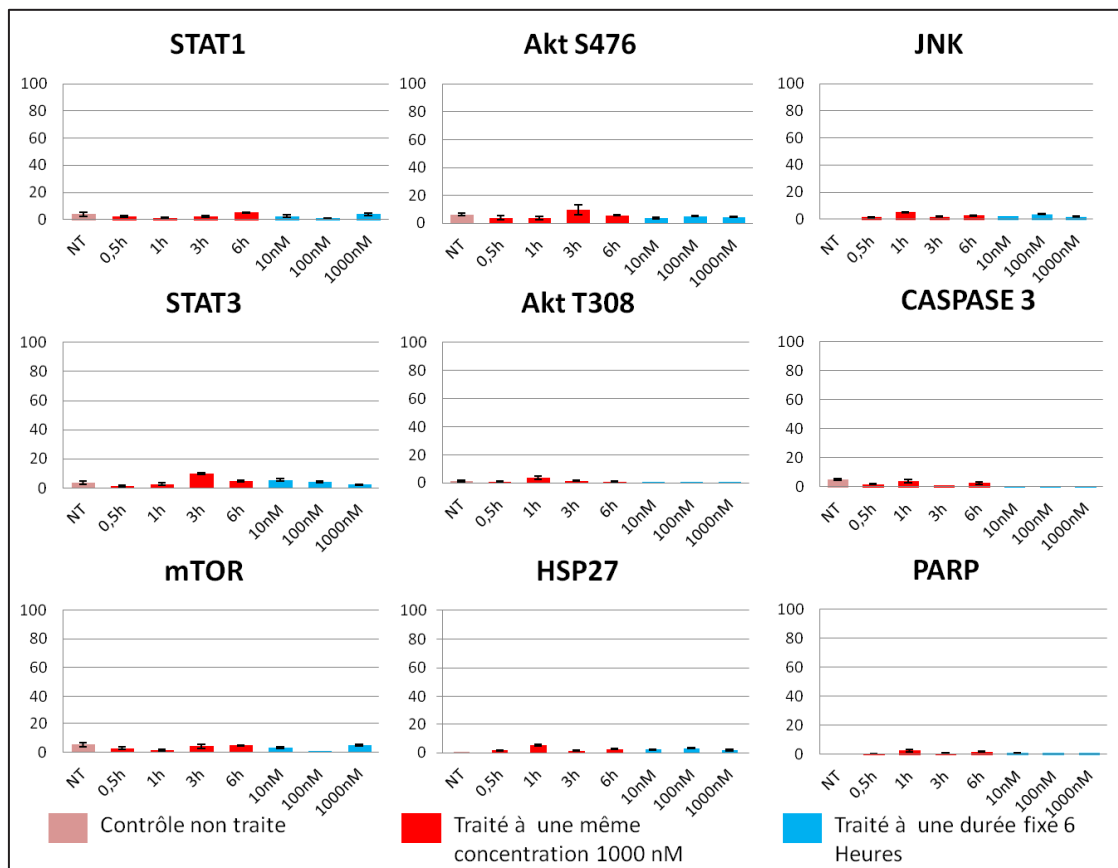


Figure 73: Histogramme indiquant le statut de phosphorylation de 9 protéines de PathScan après traitement avec EAPB0503.

Nous ne pouvons pas tirer de conclusion en regardant les 9 protéines la figure 73 (SATA1, AKTS476, JNK, STAT3, AktT308, Caspase3, mTOR, HSP27 et PARP), car les niveaux d'activation basaux de ces derniers sont très faibles.

La figure 74 montre la voie PI3K/AKT. D'après les résultats obtenus en PathScan, nous n'avons pas pu mettre en évidence de variation de niveau d'activation d'AKT et mTOR, en raison d'un niveau basal d'expression trop faible dans la lignée A375. Mais il y a une légère diminution de niveau de phosphorylation de Bad et de la protéine S6 ribosomal, ainsi qu'une légère augmentation pour GSK3-Beta et AMPK α .

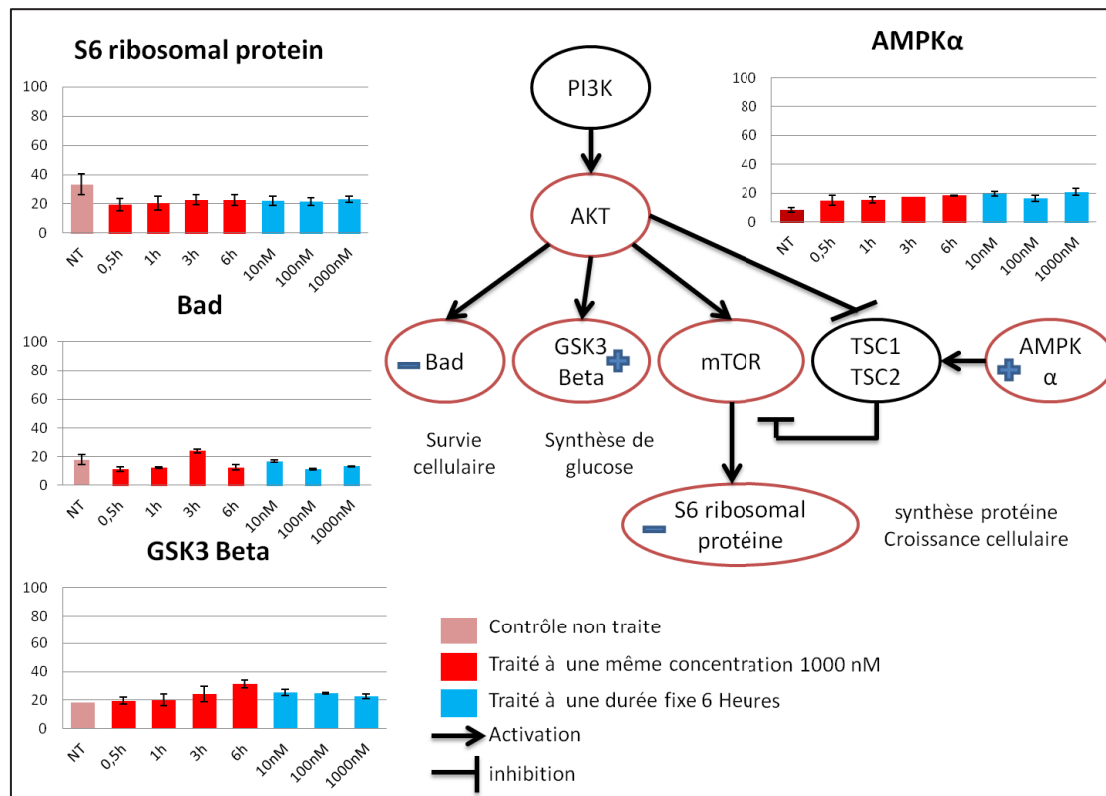


Figure 74: Histogramme indiquant le statut de phosphorylation de 4 protéines de PathScan après traitement avec EAPB0503. Le schéma de la voie de PI3K est inspiré de Keiran S.M. Smalley et al (138) et D. Grahame Hardie(267).

Donc **EAPB0503** pourrait agir d'une façon indirecte sur mTOR par une activation d'AMPK α , et ainsi conclure par une inhibition de la protéine S6 ribosomal. Aussi, il pourrait inhiber la survie cellulaire quand il agit en inhibant la phosphorylation de Bad.

La voie PI3K/AKT qui joue un rôle important dans un certain nombre de fonctions cellulaires, notamment la régulation de la glycogénèse, la régulation de la taille de la cellule, la migration, l'apoptose et la prolifération pouvant être activée par la grande voie de signalisation intracellulaire l'EGFR. Cette voie peut être activée, soit

directement par activation du récepteur à activité tyrosine-kinase EGFR, soit par l'intermédiaire de la protéine RAS. Il existe donc un lien étroit entre la voie de signalisation RAS/MAPK et la voie PI3K/AKT, par l'intermédiaire de RAS. Les connexions qui existent entre ces deux voies sont, en fait, probablement plus complexes encore et font aussi intervenir d'autres voies de signalisations intracellulaires comme la voie de la phospholipase C (PLCg), la voie STAT et la voie Src/FAK(255).

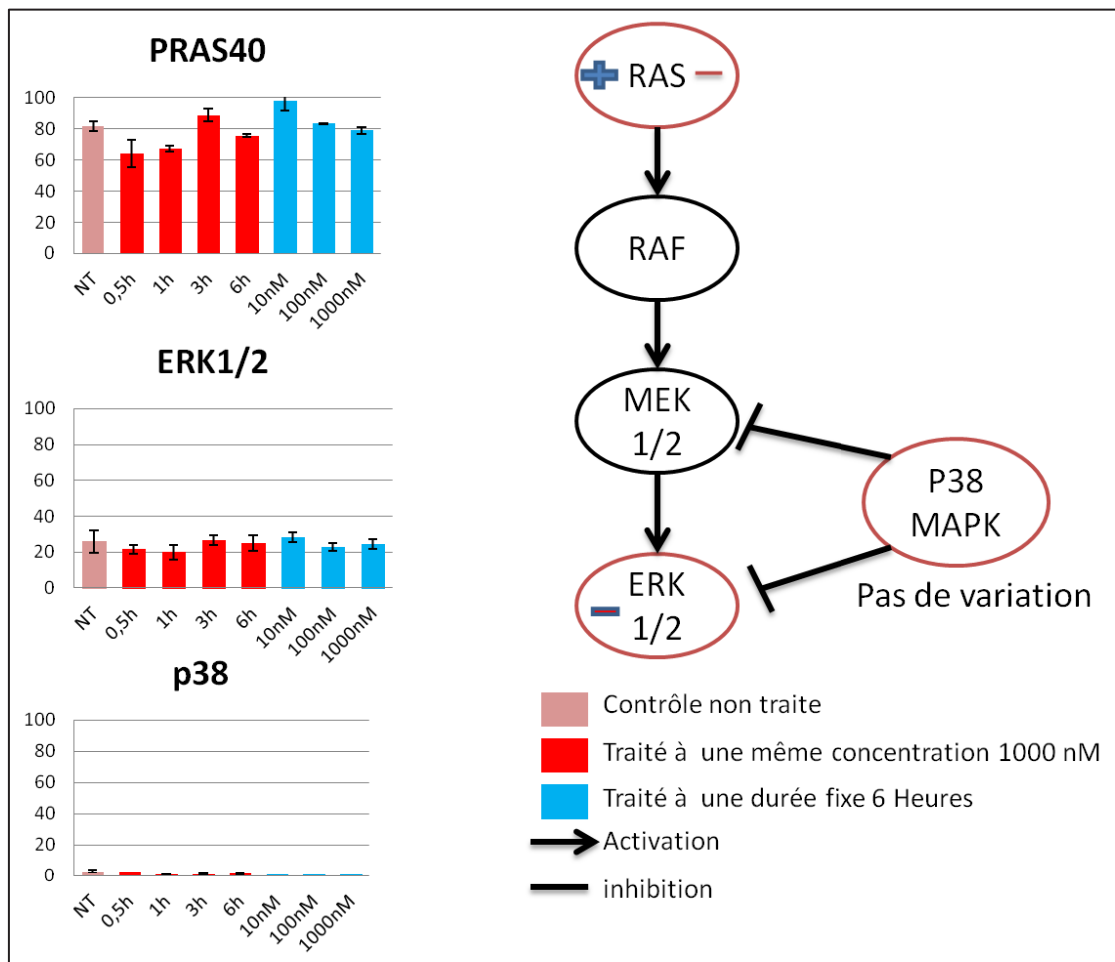


Figure 75: Histogramme indiquant le statu de phosphorylation de 3 protéines de PathScan après traitement avec EAPB0503 avec la voie de RAS inspire de Lu et Xu (268).

La figure 75 montre les trois dernières protéines détectées par Pathscan et qui sont incluses dans la voie MAPK déclenchée par RAS. Les résultats montrent, il n'y a pas de variation au niveau de phosphorylation de P38, une déstabilisation de niveau d'activation de RAS soit en l'activant, soit en l'inhibant, et une légère diminution de niveau de phosphorylation de ERK1/2.

Donc, cette voie est touchée directement par **EAPB0503** mais il reste à confirmer le niveau d'expression et d'activation de chaque protéine par western blot.

IV.3.3.2 Détection de niveau d'expression et d'activation avec le Western Blot

IV.3.3.2.1 Détection de niveau d'expression et d'activation avec le Western Blot (WB)

Nous avons démarré ce travail par WesternBlot (WB), après extraction des protéines, sur ERK1/2. La figure 76 nous montre qu'il y a une inhibition de l'expression de ERK1/2 et une légère diminution de phosphorylation par rapport au contrôle non traite(NT).

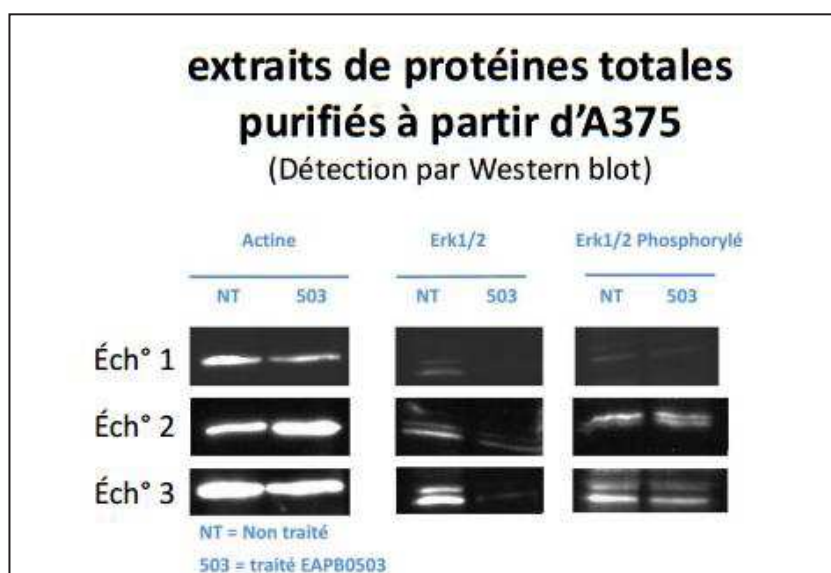


Figure 76 : Détection par western blot des extraits de protéines totales purifiés à partir d'A375. Détection de l'actine comme contrôle positive et la protéine ERK1/2 phosphorylé ou non phosphorylé. Ce travail a été répété trois fois (Echantillon 1, 2, et 3). Le traitement a été faite durant 1 heure avec une concentration 1 μ M de EAPB0503.

IV.3.3.2.2 Conclusion générale de la validation (Figure 77)

D'après tous les résultats accumulés par les résultats obtenus de puces et sa confirmation informatique et biologique, on peut dire qu'**EAPB0503** déstabilise d'une façon ou d'une autre l'adhésion cellulaire détecté par la voie d'intégrine. Cette voie à son tour peut agir directement sur d'autres voies de signalisation comme RAS/MAPK et PI3K/AKT.

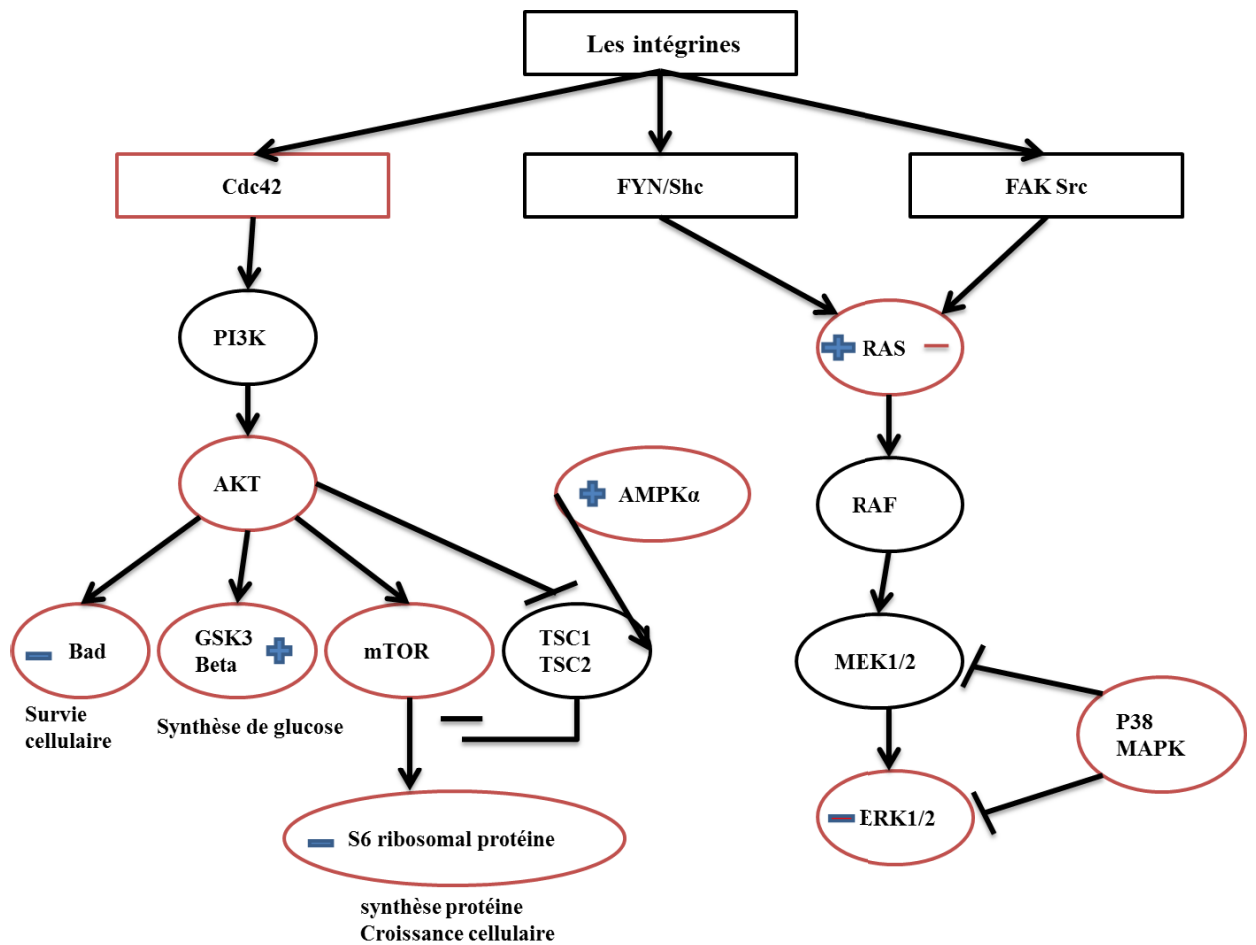


Figure 77: Vue générale de la voie de transduction de signal cellulaire qui peut être déclenchée par **EAPB0503**.

Ainsi nous pouvons supposer qu'**EAPB0503** agit d'une façon indirecte sur la voie PI3K/AKT en l'inhibant, et sur la voie RAS/MAPK en inhibant l'expression d'ERK1/2.

Cette molécule paraît très prometteuse d'où la nécessité de l'étudier in vivo. Cependant, l'administration d'un composé in vivo nécessite que ce composé soit soluble. Or, **EAPB0503** n'est pas très soluble à forte concentration. Ainsi, il est nécessaire de développer une formule galénique compatible avec notre étude in vivo.

IV.4 Partie 4 : formulation galénique

IV.4.1 Introduction

Les Imiqualines sont des hétérocycles relativement hydrophobes présentant des LogP généralement supérieurs à 3. De façon à pouvoir envisager ultérieurement des études in vivo sur animal de laboratoire, nous avons étudié une formulation injectable pour ces molécules. Les études ont plus particulièrement porté dans un premier temps sur l'**EAPB0503**.

IV.4.2 Formulation galénique : description

Les études pharmacotechniques menées sur l'**EAPB0503** ont eu pour objectif premier l'obtention d'une formulation injectable par voie intrapéritonéale (IP) ou intraveineuse (IV) chez la souris. Les excipients et la formulation finale doivent satisfaire un certain nombre de critères tels que : 1) injectables, 2) stériles, 3) de taille inférieure à 200 nm, 4) de concentration supérieure à 1 mg/ml, 5) de stabilité supérieure à 2 mois avec des méthodologies relativement faciles à mettre en œuvre et à un coût modéré.

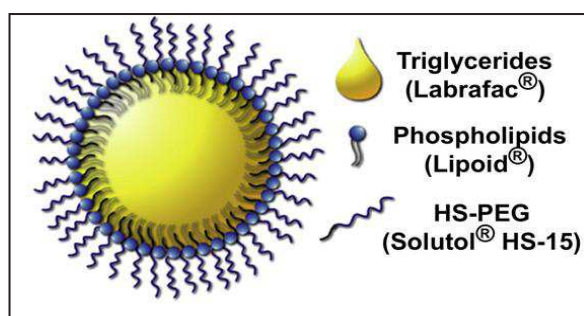


Figure 78 : Représentation de la composition des nanocapsules lipidiques(269)

Les nanocapsules lipidiques (LNC) (figure 78 et 79) ont été considérées comme pouvant satisfaire ces différents critères et donc comme la meilleure option à considérer. En effet, les LNC sont des structures galéniques hybrides entre liposomes et nanocapsules, stables à la dilution sur plusieurs mois (18 mois à 4°C, 1,5 mois à 37°C), de taille de l'ordre de 100nm, de structure mono dispersée et injectables par voie IP et IV. Elles enferment dans le cœur de leur structure les molécules lipophiles.

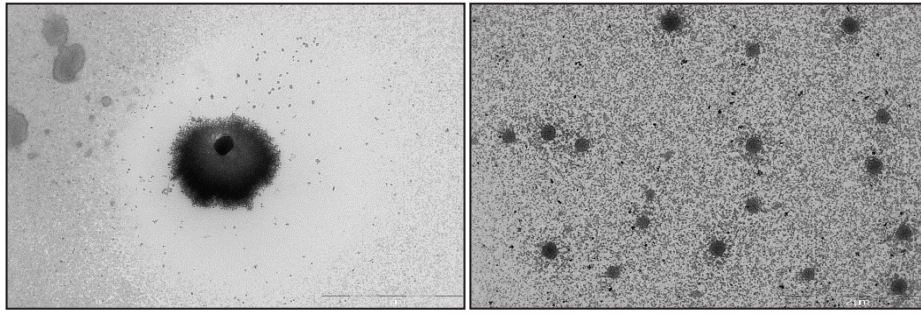


Figure 79: Exemples de nanocapsules par microscopie électronique en transmission, Hitachi S2600N à pression variable, agrandissement : x 15 (à droite) et x 300 000 (à gauche).

Leur formulation s'effectue sans solvant organique, avec une faible proportion de tensio-actif et selon un procédé facilement transposable en industrie ne nécessitant pas d'équipement spécifique ou onéreux (269). Les LNC réalisées au laboratoire m'ont été transmises de façon à effectuer un premier criblage d'activité in vitro puis un premier essai d'activité in vivo.

IV.4.3 Activité in vitro

Deux types de LNC ont été réalisés et testés :

- les nanocapsules lipidiques blanches 1 (NCB1) sont des nanocapsules lipidiques qui ne contiennent pas d'**EAPB0503**. Ces LNC ont été considérées dans notre étude comme la formulation de référence.
- les nanocapsules lipidiques 6 (NC6) sont des nanocapsules lipidiques d'aspect similaire aux premières et contenant de l'**EAPB0503** à une concentration fixe de 1,25mg/ml.

Avant de pouvoir réaliser les premiers tests in vivo, nous avons effectué des essais préliminaires in vitro en comparant l'activité :

- de quantités variables de NC6 contenant l'**EAPB0503**, ce qui permet de réaliser une gamme de concentration en **EAPB0503**.
- de quantités de NCB1 identiques à celles de NC6, ce qui correspond au témoin
- de solutions d'**EAPB0503** de concentrations identiques à celles obtenues avec les quantités variables de NC6.

Les concentrations en **EAPB0503** ainsi testées étaient comprises entre 10^{-5} et 10^{-9} M.

Les tests d'activité comparative ont été effectués sur la lignée cellulaire de lymphome HUT102 (Cf. Figure 80).

Les résultats (Figure 80) montrent des activités cytotoxiques similaires pour les solutions d'**EAPB0503** et les nanocapsules NC6 contenant l'**EAPB0503**, avec des IC_{50} très proches, respectivement de 0,8 et 0,64 μ M, sur la lignée cellulaire HUT102. Les nanocapsules blanches NCB1 exemptes d'**EAPB0503** n'ont montré aucun effet sur HUT102.

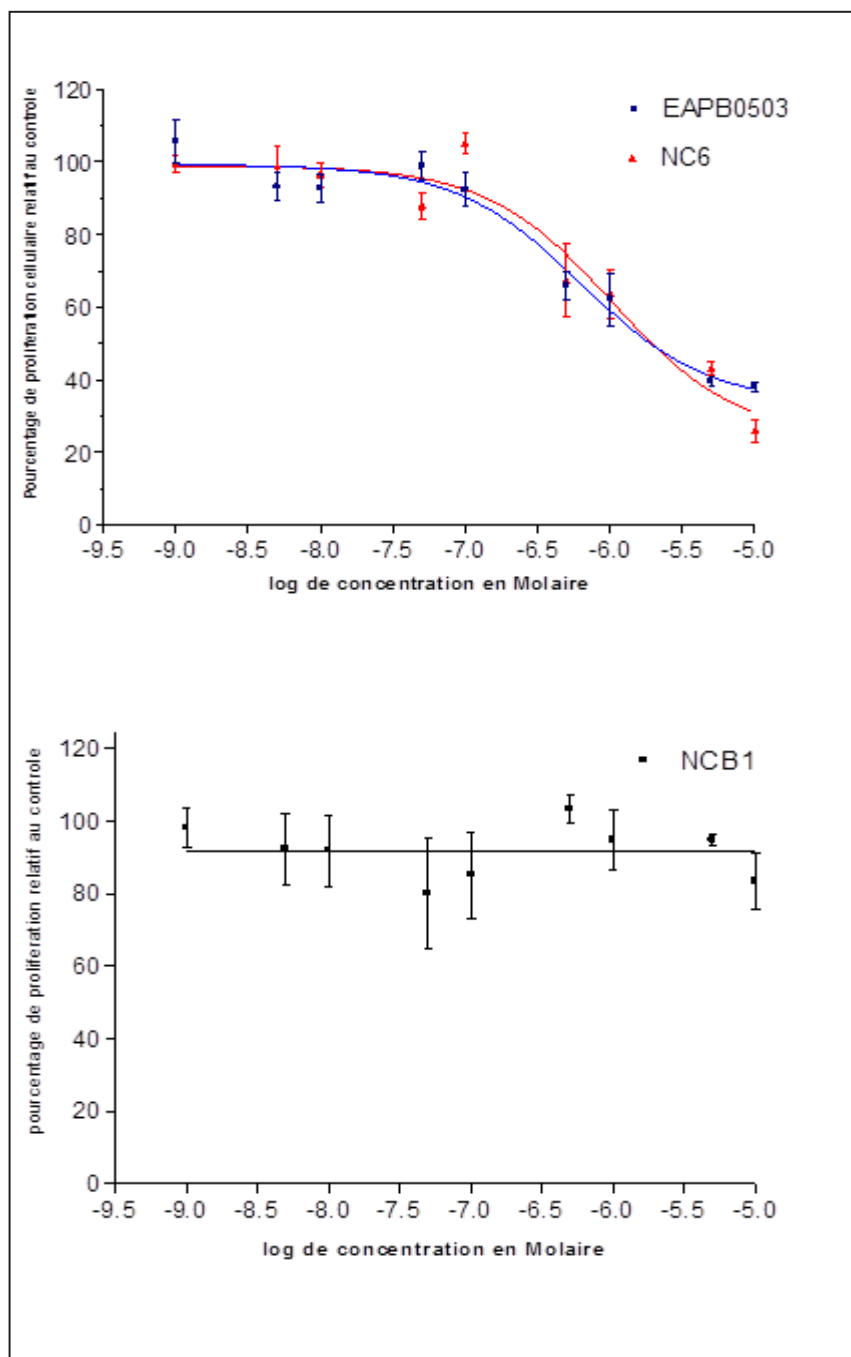


Figure 80: Les courbes d'activités *in vitro* d'**EAPB0503**, de NC6, et NCB1 sur la lignée d'humain de lymphome THUT102.

IV.4.4 Activité in vivo

Nous avons réalisé, avec la collaboration du Pr Hiba El Hajj à l'AUB (Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, American University of Beirut) une étude sur un modèle animal de souris présentant une leucémie à cellule T adulte (ATL), modèle obtenu par Hasegawa et al et déjà utilisé par El-Hajj et al (180). Les études ont été faites avec l'**EAPB0503**, à la dose de 20 mg/kg sous forme de nanocapsules et en suivant le schéma d'administration d'une injection/jour par voie intrapéritonéale (IP) 4 jours par semaine pendant 3 semaines. L'objectif de l'étude menée sur animal de laboratoire est de pouvoir confirmer l'efficacité des Imiquialines sur un modèle murin, en comparaison des effets positifs démontrés au préalable sur plusieurs lignées cancéreuses de tumeurs solide ou liquide utilisées lors des études in vitro. A noter qu'il n'a pas été possible d'effectuer des études in vitro sur les mêmes modèles cancéreux ATL utilisés pour ces études préliminaires in vivo.

Comme la montre la figure 80 trois groupes de 5 souris ont été injectés par une lignée de lymphome T:

- Un groupe témoin non traité,
- Un groupe traité par NC6 par voie intrapéritonéale (20 mg/kg),
- Un groupe traité par NCB1 par voie intrapéritonéale (20 mg/kg).

A noter que dans ce type d'étude, le groupe de souris témoin porteur de lymphome T meurt généralement après 28 jours.

Les résultats de cette étude préliminaire in vivo (Figure 81) indiquent que les nanocapsules d'**EAPB0503** (NC6) et les nanocapsules vides NCB1 présentent toutes deux des activités antitumorales en retardant la mort des souris par rapport aux souris témoins (tax control). Les effets antitumoraux in vivo obtenus après traitement avec des nanocapsules vides (40% des souris restent vivantes jusqu'au jour 54) sont en effet comparables, voire même meilleurs, que ceux obtenus avec des nanocapsules contenant l'**EAPB0503** (20% des souris restent vivantes au jour 55).

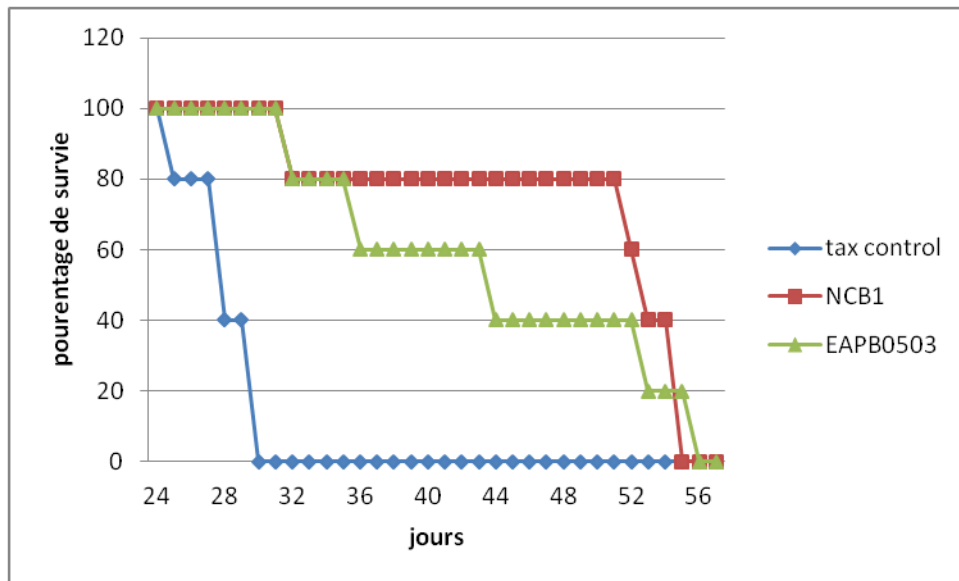


Figure 81 : Etudes in vivo sur modèle murin ATL. Courbes de survie (■) NCB1 (20 mg/kg 4 jours par semaine sur 28 jours); (▲) Nanocapsules NC6 contenant l'EAPB0503 (20 mg/kg 4 jours par semaine sur 28 jours) ;(◆) souris témoins.

IV.4.5 Conclusion

Les résultats obtenus in vitro avec les nanocapsules sont très intéressants puisque nous n'obtenons pas d'activité cytotoxique pour les nanocapsules vides (NCB1) et par contre nous obtenons une activité comparable entre les nanocapsules contenant l'EAPB0503 et les solutions d'EAPB0503. Ces résultats montrent que EAPB0503 présente une efficacité comparable in vitro sur la lignée cellulaire de lymphome HUT102, quel que soit sa formulation, en solution ou sous forme de nanocapsules.

Les résultats de l'étude in vivo sont eux très surprenants. Ils sont obtenus sur un modèle animal qui reproduit les symptômes de la leucémie à cellules T de l'adulte mais qui n'est pas généré par injection de cellules tumorales, donc ne peut pas être évalué in vitro.

Les résultats obtenus sur ce modèle animal montrent :

- Pas de différence d'effets entre les animaux traités par les nanocapsules vides et les nanocapsules contenant EAPB0503.
- Un prolongement de la survie des animaux traités aussi bien par les nanocapsules vides que par les nanocapsules contenant EAPB0503, au regard des animaux témoins.

Le modèle in vivo de leucémie à cellules T de l'adulte ne peut pas être reproduit in vitro car il n'est pas obtenu à partir d'une lignée de cellules tumorales. L'activité cytotoxique in vitro de **EAPB0503** en solution ou sous forme de nanocapsules n'a donc pas pu être évaluée sur ce modèle avant le passage in vivo. Nous ne pouvons donc pas savoir si le modèle in vivo ne répond pas au traitement par **EAPB0503** parce que la molécule n'est pas efficace sur ce modèle ou si **EAPB0503** n'est pas efficace car il n'est pas libéré en quantité suffisante par les nanocapsules.

De façon très surprenante, la survie des animaux semble être prolongée par les nanocapsules, aussi bien vides que chargées en **EAPB0503**, et ceci jusqu'à la fin de la 8^{ème} semaine. Certaines publications montrent un effet possible du prolongement de la survie des animaux par effets des phospholipides qui sont les constituants des nanocapsules.

Ces études in vivo ne peuvent être considérées que comme très préliminaires. Il apparaît en effet nécessaire de les répéter sur d'autres modèles in vivo qui pourront être préalablement reproduits in vitro. L'effet des phospholipides sur un modèle tumoral devra être approfondi et pourrait permettre, s'il se confirme, une potentialisation de l'effet des molécules antitumorales associées aux phospholipides.

La forme nanocapsule de notre composé conduit à des résultats convenables in vitro par rapport à la forme nanocapsule vide, tandis qu'in vivo les deux formes ont un effet antitumoral semblable qui inhibe la mortalité des souris jusqu'au jour 56. En fait il y a deux conclusions, la première est que le modèle utilisé in vivo est différent de celui utilisé in vitro, la deuxième est que les nanocapsules vides peuvent augmenter la survie des souris comme décrit dans la littérature. Il sera donc nécessaire d'utiliser un modèle in vivo différent pour de futurs essais.

V. Conclusions et discussions

Malgré le développement de nouvelles thérapies, le mélanome malin reste un défi thérapeutique. De même, les thérapies disponibles actuellement sont peu efficaces dans le traitement du lymphome. Dans ce contexte, notre équipe développe une nouvelle série chimique imidazo[1,2-*a*]quinoxaline dont les dérivés sont appelés imiqualines.

L'activité cytotoxique des molécules a été testée afin d'évaluer in vitro leur efficacité sur le mélanome. Nous avons démontré que **EAPB0502**, **EAPB01803** et **EAPB0503** présentent une activité antiproliférative remarquable sur la lignée A375 avec une CI_{50} de l'ordre de 0,20 μ M. Tous ces composés ont une activité cytotoxique nettement supérieure à celles de l'imiquimod, la fotémustine et la dacarbazine et globalement équivalente à celle du vémurafénib. A partir de ce criblage, nous avons sélectionné le **EAPB0503**, molécule considérée comme la molécule *leader* de la série (195,196,199,255,256).

EAPB0503 présente également une activité antitumorale in vitro remarquable sur le lymphome à cellules T de l'adulte (ATL) et des activités intéressantes sur des lignées cancéreuses de sein et du colon a des CI_{50} de l'ordre du micromolaire.

Afin de déterminer si les activités cytotoxiques de nos composés sont liés ou non à l'interaction avec la tubuline, nous avons évalué leur capacité de liaison et d'inhibition de la polymérisation de la tubuline. EAPB0503 présente une forte interaction avec la tubuline démontrée par l'inhibition de la polymérisation de tubuline et par la modélisation de l'interaction avec le site colchicine de la tubuline.

Cependant, le profil d'activité de **EAPB0503** fait par le NCI sur 60 lignées cellulaires est différent de ceux des autres antitubulines. Cette activité antitubuline n'explique donc pas l'ensemble de son mécanisme d'action. Nous avons donc choisi de rechercher l'originalité du mécanisme d'action de **EAPB0503** par analyse transcriptomique. Cette étude a été faite sur la lignée A375 en comparaison avec 13 anticancéreux de référence.

L'étude transcriptomique montre que **EAPB0503** a une composante antitubuline puisqu'il se rapproche des autres antitubulines. Cependant des différences de profil d'expression sont observées au sein de ce groupe laissant supposer un mécanisme d'action original.

De ce fait, nous avons réalisé une nouvelle étude transcriptomique pour identifier ce mécanisme original.

Deux hypothèses mécanistiques pour **EAPB0503** ont ainsi été identifiées :

1. Altération de la voie de signalisation liée aux intégrines,
2. Altération de la voie de signalisation du récepteur TNFR et de FasL.

Pour vérifier l'implication de ces voies dans les mécanismes d'action d'**EAPB0503**, des études fonctionnelles *in vitro* ont été réalisées. Nous avons choisi l'analyse par Pathscan afin de mettre en évidence les niveaux d'activation des principales voies de signalisation intra-cellulaire. On observe une altération uniquement des voies de signalisation PI3K/AKT et RAS/MAPK, toutes deux liées aux intégrines. La première hypothèse semble donc validée. De plus, ce résultat a été confirmé par l'étude de l'expression et de la phosphorylation de ERK.

Des études *in vitro* et *in vivo* ciblées sur cette voie doivent être réalisées pour déterminer la cible du **EAPB0503**.

Pour envisager l'évaluation de l'activité *in vivo* de **EAPB0503**, nous avons développé une formulation injectable par voie intraveineuse à base de nanocapsules. Cette formulation a d'abord été testée *in vitro*. Ces études préliminaires ont pu mettre en évidence l'absence de toxicité des nanoparticules vides et le maintien de l'activité cytotoxique de **EAPB0503** encapsulé. Suite à ces résultats, l'activité *in vivo* a été réalisée sur un modèle murin de lymphome. La survie des animaux a été prolongée de façon équivalente pour les animaux traités par les nanocapsules vides ou contenant **EAPB0503**. Ces résultats suggèrent un effet immunomodulateur des nanocapsules lipidiques ou pourraient être liés au modèle animal choisi.

VI. Perspectives

A l'issue des résultats obtenus durant ce travail de thèse, de nouvelles perspectives ont été envisagées.

Dans un premier temps, les études mécanistiques doivent être poursuivies pour déterminer la cible de **EAPB0503**. Puis, il devra être envisagé de poursuivre l'étude transcriptomique de **EAPB0503** en s'intéressant à d'autres types de cancer comme le cancer de colon et du sein en se basant sur le profil d'activité fourni par le NCI. Ensuite, des études transcriptomiques plus larges pourront être envisagées. Des modèles in vivo de souris xénotreffées par les cancers ciblés in vitro seront utilisées pour cette deuxième série d'études. L'ensemble de ces études devrait nous permettre de cerner avec certitude le mécanisme d'action de **EAPB0503**.

Parallèlement aux études mécanistiques, les études d'activité in vivo doivent être poursuivies. Nous souhaitons développer un modèle de xenogreffe de mélanome malin chez la souris. Par ailleurs, les premiers résultats des essais d'activité sur notre modèle de lymphome sont ambigus. Ils doivent donc être reproduits dans un autre modèle animal. Cela nous permettrait de vérifier : i) si les premiers résultats sont liés au modèle, ii) si nos nanocapsules sont responsables d'une immunomodulation et iii) si notre composé est bien libéré des nanocapsules in vivo.

Nous avons constaté que les imidazoquinoxalines sont des molécules fluorescentes. Cette propriété pourrait être utilisée pour étudier la localisation et la libération de la molécule dans la cellule par microscopie confocale. Cette étude serait réalisée avec **EABP0503** en solution ainsi que sous de nanocapsules. In vivo, cette propriété nous permettrait de visualiser la biodistribution et le ciblage des tumeurs par **EABP0503**.

Avec leur activité cytotoxique, leur mécanisme d'action original et l'obtention de leur propriété intellectuelle, les imiquialines, avec comme chef de file **EAPB0503**, sont de bons candidats médicament qui ne demandent qu'à être valorisés.

VII. Références

1. Tolleson WH. Human melanocyte biology, toxicology, and pathology. *J Env Sci Health C Env Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2005;23(2):105-61.
2. Yaar M, Park HY. Melanocytes: a window into the nervous system. *J Invest Dermatol.* mars 2012;132(3 Pt 2):835-45.
3. Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H. Cutaneous melanomas associated with nevi. *Arch Dermatol.* déc 2003;139(12):1620-4; discussion 1624.
4. OMS | Cancers cutanés [Internet]. WHO. [cité 24 août 2014]. Disponible sur: <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/fr/index1.html>
5. SEER - National Cancer Institute [Internet]. SEER - National Cancer Institute. [cité 24 août 2014]. Disponible sur: <http://www.seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>
6. Bleyer A. Young adult oncology: the patients and their survival challenges. *CA Cancer J Clin.* août 2007;57(4):242-55.
7. Quelques chiffres - Mélanomes de la peau | Institut National Du Cancer [Internet]. [cité 16 mars 2016]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Melanomes-de-la-peau/Quelques-chiffres>
8. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet.* 19 févr 2005;365(9460):687-701.
9. Globocan 2012 - Home [Internet]. [cité 16 mars 2016]. Disponible sur: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
10. Armstrong BK, Kricker A. How much melanoma is caused by sun exposure? *Melanoma Res.* déc 1993;3(6):395-401.
11. Hoek KS, Eichhoff OM, Schlegel NC, Dobbeling U, Kobert N, Schaerer L, et al. In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res.* 1 févr 2008;68(3):650-6.
12. Hoek KS, Goding CR. Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* déc 2010;23(6):746-59.
13. Hoek KS, Eichhoff OM, Widmer D, Dummer R. Stemming the flood. *Pigment Cell Melanoma Res.* févr 2009;22(1):6-7.
14. Eichhoff OM, Zipser MC, Xu M, Weeraratna AT, Mihic D, Dummer R, et al. The immunohistochemistry of invasive and proliferative phenotype switching in melanoma: a case report. *Melanoma Res.* août 2010;20(4):349-55.

15. Greenwald HS, Friedman EB, Osman I. Superficial spreading and nodular melanoma are distinct biological entities: a challenge to the linear progression model. *Melanoma Res.* févr 2012;22(1):1-8.
16. Girouard SD, Murphy GF. Melanoma stem cells: not rare, but well done. *Lab Invest.* mai 2011;91(5):647-64.
17. White RM, Zon LI. Melanocytes in development, regeneration, and cancer. *Cell Stem Cell.* 11 sept 2008;3(3):242-52.
18. Eichhoff OM, Weeraratna A, Zipser MC, Denat L, Widmer DS, Xu M, et al. Differential LEF1 and TCF4 expression is involved in melanoma cell phenotype switching. *Pigment Cell Melanoma Res.* août 2011;24(4):631-42.
19. Palmieri G, Capone M, Ascierto ML, Gentilcore G, Stroncek DF, Casula M, et al. Main roads to melanoma. *J Transl Med.* 2009;7:86.
20. Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature.* 22 févr 2007;445(7130):851-7.
21. Kuphal S, Bosserhoff A. Recent progress in understanding the pathology of malignant melanoma. *J Pathol.* déc 2009;219(4):400-9.
22. Arkenau HT, Kefford R, Long GV. Targeting BRAF for patients with melanoma. *Br J Cancer.* 1 févr 2011;104(3):392-8.
23. Scolyer RA, Long GV, Thompson JF. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Mol Oncol.* avr 2011;5(2):124-36.
24. Friedlander P, Hodi FS. Advances in targeted therapy for melanoma. *Clin Adv Hematol Oncol HO.* sept 2010;8(9):619-27.
25. Slominski A, Wortsman J, Carlson AJ, Matsuoka LY, Balch CM, Mihm MC. Malignant melanoma. *Arch Pathol Lab Med.* oct 2001;125(10):1295-306.
26. Chin L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat Rev Cancer.* août 2003;3(8):559-70.
27. Ghosh P, Chin L. Genetics and genomics of melanoma. *Expert Rev Dermatol.* 1 avr 2009;4(2):131.
28. Marini A, Mirmohammadsadegh A, Nambiar S, Gustrau A, Ruzicka T, Hengge UR. Epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in serum of patients with cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* févr 2006;126(2):422-31.
29. Larue L, Delmas V. Secrets to developing Wnt-age melanoma revealed. *Pigment Cell Melanoma Res.* oct 2009;22(5):520-1.

30. Delmas V, Beermann F, Martinozzi S, Carreira S, Ackermann J, Kumasaka M, et al. Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes Dev.* 15 nov 2007;21(22):2923-35.
31. Larue L, Luciani F, Kumasaka M, Champeval D, Demirkan N, Bonaventure J, et al. Bypassing melanocyte senescence by beta-catenin: a novel way to promote melanoma. *Pathol Biol Paris.* nov 2009;57(7-8):543-7.
32. Arozarena I, Bischof H, Gilby D, Belloni B, Dummer R, Wellbrock C. In melanoma, beta-catenin is a suppressor of invasion. *Oncogene.* 10 nov 2011;30(45):4531-43.
33. Miller AJ, Mihm MCJ. Melanoma. *N Engl J Med.* 6 juill 2006;355(1):51-65.
34. Gaggioli C, Sahai E. Melanoma invasion - current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res.* juin 2007;20(3):161-72.
35. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature.* 22 févr 2007;445(7130):843-50.
36. Hsu MY, Meier FE, Nesbit M, Hsu JY, Van Belle P, Elder DE, et al. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am J Pathol.* mai 2000;156(5):1515-25.
37. Smalley KS, Brafford P, Haass NK, Brandner JM, Brown E, Herlyn M. Up-regulated expression of zonula occludens protein-1 in human melanoma associates with N-cadherin and contributes to invasion and adhesion. *Am J Pathol.* mai 2005;166(5):1541-54.
38. Haass NK, Smalley KS, Li L, Herlyn M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res.* juin 2005;18(3):150-9.
39. Desgrosellier JS, Cheresch DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer.* janv 2010;10(1):9-22.
40. Pinon P, Wehrle-Haller B. Integrins: versatile receptors controlling melanocyte adhesion, migration and proliferation. *Pigment Cell Melanoma Res.* avr 2011;24(2):282-94.
41. Whited JD, Grichnik JM. The rational clinical examination. Does this patient have a mole or a melanoma? *JAMA.* 4 mars 1998;279(9):696-701.
42. Elder DE. Pathological staging of melanoma. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2014;1102:325-51.

43. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. 20 déc 2009;27(36):6199-206.
44. TNM_Classification_of_Malignant_Tumours_Website_15_May2011.pdf [Internet]. [cité 24 mars 2016]. Disponible sur: http://www.uicc.org/sites/main/files/private/TNM_Classification_of_Malignant_Tumours_Website_15%20MAy2011.pdf
45. NCI Visuals Online: Search: Results [Internet]. [cité 5 juin 2016]. Disponible sur: <https://visualsonline.cancer.gov/searchaction.cfm?q=%C2%A92008+Terese+Winslow+U.S.Govt.+NC&from=2000&sort=relevance>
46. Marincola FM. Translational Medicine: A two-way road. *J Transl Med*. 24 juill 2003;1(1):1.
47. Coit DG, Andtbacka R, Anker CJ, Bichakjian CK, Carson WE, Daud A, et al. Melanoma, version 2.2013: featured updates to the NCCN guidelines. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN*. 1 avr 2013;11(4):395-407.
48. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, et al. Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer*. janv 2010;46(2):270-83.
49. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol*. 10 sept 2006;24(26):4340-6.
50. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 17 nov 2005;353(20):2135-47.
51. Janssen CS, Sibbett R, Henriquez FL, McKay IC, Kemp EG, Roberts F. The T1799A point mutation is present in posterior uveal melanoma. *Br J Cancer*. 18 nov 2008;99(10):1673-7.
52. Rimoldi D, Salvi S, Lienard D, Lejeune FJ, Speiser D, Zografos L, et al. Lack of BRAF mutations in uveal melanoma. *Cancer Res*. 15 sept 2003;63(18):5712-5.
53. Wong CW, Fan YS, Chan TL, Chan AS, Ho LC, Ma TK, et al. BRAF and NRAS mutations are uncommon in melanomas arising in diverse internal organs. *J Clin Pathol*. juin 2005;58(6):640-4.
54. Vidwans SJ, Flaherty KT, Fisher DE, Tenenbaum JM, Travers MD, Shrager J. A Melanoma Molecular Disease Model. *PLoS ONE*. 30 mars 2011;6(3):e18257.
55. Ravnán MC, Matalka MS. Vemurafenib in patients with BRAF V600E mutation-positive advanced melanoma. *Clin Ther*. juill 2012;34(7):1474-86.

56. Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncol Williston Park*. mai 2009;23(6):488-96.
57. Testori A, Rutkowski P, Marsden J, Bastholt L, Chiarion-Sileni V, Hauschild A, et al. Surgery and radiotherapy in the treatment of cutaneous melanoma. *Ann Oncol*. août 2009;20 Suppl 6:vi22-9.
58. Khan N, Khan MK, Almasan A, Singh AD, Macklis R. The evolving role of radiation therapy in the management of malignant melanoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1 juill 2011;80(3):645-54.
59. Agarwala SS, O'Day SJ. Current and future adjuvant immunotherapies for melanoma: blockade of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 as a novel approach. *Cancer Treat Rev*. avr 2011;37(2):133-42.
60. PDQ Adult Treatment Editorial Board. Melanoma Treatment (PDQ®): Health Professional Version. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002 [cité 27 avr 2016]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66034/>
61. Horvat TZ, Adel NG, Dang TO, Momtaz P, Postow MA, Callahan MK, et al. Immune-Related Adverse Events, Need for Systemic Immunosuppression, and Effects on Survival and Time to Treatment Failure in Patients With Melanoma Treated With Ipilimumab at Memorial Sloan Kettering Cancer Center. *J Clin Oncol*. 1 oct 2015;33(28):3193-8.
62. Dummer R, Hauschild A, Lindenblatt N, Pentheroudakis G, Keilholz U, Committee EG. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. sept 2015;26 Suppl 5:v126-32.
63. Ascierto PA, Simeone E, Sznol M, Fu YX, Melero I. Clinical experiences with anti-CD137 and anti-PD1 therapeutic antibodies. *Semin Oncol*. oct 2010;37(5):508-16.
64. Davies MA, Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene*. 14 oct 2010;29(41):5545-55.
65. Seetharamu N, Ott PA, Pavlick AC. Novel therapeutics for melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. juin 2009;9(6):839-49.
66. Singh M, Lin J, Hocker TL, Tsao H. Genetics of melanoma tumorigenesis. *Br J Dermatol*. janv 2008;158(1):15-21.
67. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2012. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990* [Internet]. 13 sept 2012 [cité 19 sept 2012]; Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22981501>

68. Zelboraf_SC_03-10-2012.pdf [Internet]. [cité 29 avr 2016]. Disponible sur: http://www.roche.fr/content/dam/roche_france/fr_FR/doc/Produits/Zelboraf/Zelboraf_SC_03-10-2012.pdf
69. Tap WD, Gong KW, Dering J, Tseng Y, Ginther C, Pauletti G, et al. Pharmacodynamic characterization of the efficacy signals due to selective BRAF inhibition with PLX4032 in malignant melanoma. *Neoplasia*. août 2010;12(8):637-49.
70. Halaban R, Zhang W, Bacchiocchi A, Cheng E, Parisi F, Ariyan S, et al. PLX4032, a selective BRAF(V600E) kinase inhibitor, activates the ERK pathway and enhances cell migration and proliferation of BRAF melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res*. avr 2010;23(2):190-200.
71. Falchook GS, Long GV, Kurzrock R, Kim KB, Arkenau TH, Brown MP, et al. Dabrafenib in patients with melanoma, untreated brain metastases, and other solid tumours: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 19 mai 2012;379(9829):1893-901.
72. CT-13242_TAFINLAR_PIC_INS_Avis3_CT13242.pdf [Internet]. [cité 29 avr 2016]. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/evamed/CT-13242_TAFINLAR_PIC_INS_Avis3_CT13242.pdf
73. CT-14705_MEKINIST_PIC_INS_Avis3_CT14705.pdf [Internet]. [cité 29 avr 2016]. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/evamed/CT-14705_MEKINIST_PIC_INS_Avis3_CT14705.pdf
74. Jilaveanu LB, Aziz SA, Kluger HM. Chemotherapy and biologic therapies for melanoma: do they work? *Clin Dermatol*. nov 2009;27(6):614-25.
75. Serrone L, Zeuli M, Segà FM, Cognetti F. Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. *J Exp Clin Cancer Res*. mars 2000;19(1):21-34.
76. Bei R, Marzocchella L, Turriziani M. The use of temozolomide for the treatment of malignant tumors: clinical evidence and molecular mechanisms of action. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. nov 2010;5(3):172-87.
77. Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, Fierlbeck G, Tilgen W, Seiter S, et al. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol*. janv 2000;18(1):158-66.
78. Middleton MR, Lunn JM, Morris C, Rustin G, Wedge SR, Brampton MH, et al. O6-methylguanine-DNA methyltransferase in pretreatment tumour biopsies as a predictor of response to temozolomide in melanoma. *Br J Cancer*. nov 1998;78(9):1199-202.

79. Avril MF, Aamdal S, Grob JJ, Hauschild A, Mohr P, Bonerandi JJ, et al. Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study. *J Clin Oncol.* 15 mars 2004;22(6):1118-25.
80. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U A.* déc 1980;77(12):7415-9.
81. Shimoyama M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br J Haematol.* nov 1991;79(3):428-37.
82. Peripheral T-Cell Lymphoma - Lymphoma Research Foundation - Welcome [Internet]. [cité 5 juin 2016]. Disponible sur: <http://www.lymphoma.org/site/pp.asp?c=bkLTKaOQLmK8E&b=6300159>
83. Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene.* 5 sept 2005;24(39):6058-68.
84. Yamaguchi K. Human T-lymphotropic virus type I in Japan. *Lancet.* 22 janv 1994;343(8891):213-6.
85. Manel N, Kinet S, Battini JL, Kim FJ, Taylor N, Sitbon M. The HTLV receptor is an early T-cell activation marker whose expression requires de novo protein synthesis. *Blood.* 1 mars 2003;101(5):1913-8.
86. Takatsuki K, Yamaguchi K, Kawano F, Hattori T, Nishimura H, Tsuda H, et al. Clinical diversity in adult T-cell leukemia-lymphoma. *Cancer Res.* sept 1985;45(9 Suppl):4644s-4645s.
87. Manel N, Taylor N, Kinet S, Kim FJ, Swainson L, Lavanya M, et al. HTLV envelopes and their receptor GLUT1, the ubiquitous glucose transporter: a new vision on HTLV infection? *Front Biosci.* 1 sept 2004;9:3218-41.
88. Manel N, Kinet S, Kim FJ, Taylor N, Sitbon M, Battini JL. [GLUT-1 is the receptor of retrovirus HTLV]. *Med Sci Paris.* mars 2004;20(3):277-9.
89. Manel N, Kim FJ, Kinet S, Taylor N, Sitbon M, Battini JL. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell.* 14 nov 2003;115(4):449-59.
90. Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science.* 5 nov 1982;218(4572):571-3.

91. Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci U A. mars 1982;79(6):2031-5.*
92. Gessain A. [Human retrovirus HTLV-1: descriptive and molecular epidemiology, origin, evolution, diagnosis and associated diseases]. *Bull Soc Pathol Exot. août 2011;104(3):167-80.*
93. Wong-Staal F, Gallo RC. Human T-lymphotropic retroviruses. *Nature. 3 oct 1985;317(6036):395-403.*
94. Boxus M, Twizere JC, Legros S, Dewulf JF, Kettmann R, Willems L. The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology. 2008;5:76.*
95. La Lettre de l'Infectiologue - Tome XVIII - no 1 - janvier-février 2003 - Google [Internet]. [cité 5 juin 2016]. Disponible sur: <https://www.google.com.lb/webhp?sourceid=chrome-instant&ion=1&espv=2&ie=UTF-8#q=La%20Lettre%20de%20l%E2%80%99Infectiologue%20-%20Tome%20XVIII%20-%20no%201%20-%20janvier-f%C3%A9vrier%202003>
96. Feuer G, Green PL. Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. *Oncogene. 5 sept 2005;24(39):5996-6004.*
97. Lairmore MD, Anupam R, Bowden N, Haines R, Haynes RA 2nd, Ratner L, et al. Molecular determinants of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and spread. *Viruses. juill 2011;3(7):1131-65.*
98. Matsuoka M, Jeang KT. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Cancer. avr 2007;7(4):270-80.*
99. Franchini G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. *Blood. 15 nov 1995;86(10):3619-39.*
100. Maruyama K, Fukushima T, Kawamura K, Mochizuki S. Chromosome and gene rearrangements in immortalized human lymphocytes infected with human T-lymphotropic virus type I. *Cancer Res. 1 sept 1990;50(17 Suppl):5697S-5702S.*
101. Hino S, Sugiyama H, Doi H, Ishimaru T, Yamabe T, Tsuji Y, et al. Breaking the cycle of HTLV-I transmission via carrier mothers' milk. *Lancet. 18 juill 1987;2(8551):158-9.*
102. Okochi K, Sato H. Transmission of adult T-cell leukemia virus (HTLV-I) through blood transfusion and its prevention. *AIDS Res. déc 1986;2 Suppl 1:S157-61.*
103. Okochi K, Sato H, Hinuma Y. A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. *Vox Sang. 1984;46(5):245-53.*

104. Andrade TM, Dourado I, Galvao-Castro B. Associations among HTLV-I, HTLV-II, and HIV in injecting drug users in Salvador, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1 juin 1998;18(2):186-7.
105. Moens B, Pannecouque C, Lopez G, Talledo M, Gotuzzo E, Khouri R, et al. Simultaneous RNA quantification of human and retroviral genomes reveals intact interferon signaling in HTLV-1-infected CD4+ T cell lines. *Virology.* 2012;9:171.
106. Moens B, Lopez G, Adai V, Gonzalez E, Kerremans L, Clark D, et al. Development and validation of a multiplex real-time PCR assay for simultaneous genotyping and human T-lymphotropic virus type 1, 2, and 3 proviral load determination. *J Clin Microbiol.* nov 2009;47(11):3682-91.
107. Association de malades du lymphome ou cancer des ganglions, un cancer du sang touchant les lymphocytes. [Internet]. [cité 5 juin 2016]. Disponible sur: <http://www.francelymphomeespoir.fr/recherche>
108. Shimoyama M, Ota K, Kikuchi M, Yunoki K, Konda S, Takatsuki K, et al. Major prognostic factors of adult patients with advanced T-cell lymphoma/leukemia. *J Clin Oncol.* juill 1988;6(7):1088-97.
109. Tsukasaki K, Tobinai K, Shimoyama M, Kozuru M, Uike N, Yamada Y, et al. Deoxycoformycin-containing combination chemotherapy for adult T-cell leukemia-lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study (JCOG9109). *Int J Hematol.* févr 2003;77(2):164-70.
110. Tsukasaki K, Utsunomiya A, Fukuda H, Shibata T, Fukushima T, Takatsuka Y, et al. VCAP-AMP-VECP compared with biweekly CHOP for adult T-cell leukemia-lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG9801. *J Clin Oncol.* 1 déc 2007;25(34):5458-64.
111. Yamada Y, Tomonaga M, Fukuda H, Hanada S, Utsunomiya A, Tara M, et al. A new G-CSF-supported combination chemotherapy, LSG15, for adult T-cell leukaemia-lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study 9303. *Br J Haematol.* mai 2001;113(2):375-82.
112. Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene.* 19 mai 2003;22(20):3138-51.
113. Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE. Molecular plasticity of human melanoma cells. *Oncogene.* 19 mai 2003;22(20):3070-5.
114. Lito P, Rosen N, Solit DB. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat Med.* nov 2013;19(11):1401-9.
115. Alaoui-Jamali MA, Dupre I, Qiang H. Prediction of drug sensitivity and drug resistance in cancer by transcriptional and proteomic profiling. *Drug Resist Updat.* août 2004;7(4-5):245-55.

116. Lee CH, Macgregor PF. Using microarrays to predict resistance to chemotherapy in cancer patients. *Pharmacogenomics*. sept 2004;5(6):611-25.
117. Workman P, Al-Lazikani B, Clarke PA. Genome-based cancer therapeutics: targets, kinase drug resistance and future strategies for precision oncology. *Curr Opin Pharmacol*. août 2013;13(4):486-96.
118. Chen KG, Valencia JC, Lai B, Zhang G, Paterson JK, Rouzaud F, et al. Melanosomal sequestration of cytotoxic drugs contributes to the intractability of malignant melanomas. *Proc Natl Acad Sci U A*. 27 juin 2006;103(26):9903-7.
119. Chu W, Pak BJ, Bani MR, Kapoor M, Lu SJ, Tamir A, et al. Tyrosinase-related protein 2 as a mediator of melanoma specific resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II): therapeutic implications. *Oncogene*. 20 janv 2000;19(3):395-402.
120. Leiter U, Schmid RM, Kaskel P, Peter RU, Krahn G. Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced malignant melanoma. *Arch Dermatol Res*. mai 2000;292(5):225-32.
121. Zhuang L, Lee CS, Scolyer RA, McCarthy SW, Zhang XD, Thompson JF, et al. Mcl-1, Bcl-XL and Stat3 expression are associated with progression of melanoma whereas Bcl-2, AP-2 and MITF levels decrease during progression of melanoma. *Mod Pathol*. avr 2007;20(4):416-26.
122. Fecker LF, Geilen CC, Tchernev G, Trefzer U, Assaf C, Kurbanov BM, et al. Loss of proapoptotic Bcl-2-related multidomain proteins in primary melanomas is associated with poor prognosis. *J Invest Dermatol*. juin 2006;126(6):1366-71.
123. Rass K, Hassel JC. Chemotherapeutics, chemoresistance and the management of melanoma. *G Ital Dermatol Venereol*. févr 2009;144(1):61-78.
124. Mooney EE, Ruis Peris JM, O'Neill A, Sweeney EC. Apoptotic and mitotic indices in malignant melanoma and basal cell carcinoma. *J Clin Pathol*. mars 1995;48(3):242-4.
125. Campioni M, Santini D, Tonini G, Murace R, Dragonetti E, Spugnini EP, et al. Role of Apaf-1, a key regulator of apoptosis, in melanoma progression and chemoresistance. *Exp Dermatol*. nov 2005;14(11):811-8.
126. Soengas MS, Capodici P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, et al. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*. 11 janv 2001;409(6817):207-11.
127. Shukla S, Chen ZS, Ambudkar SV. Tyrosine kinase inhibitors as modulators of ABC transporter-mediated drug resistance. *Drug Resist Updat*. févr 2012;15(1-2):70-80.

128. Bouwman P, Jonkers J. The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. *Nat Rev Cancer*. sept 2012;12(9):587-98.
129. Fink D, Aebi S, Howell SB. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res*. janv 1998;4(1):1-6.
130. Christmann M, Pick M, Lage H, Schadendorf D, Kaina B. Acquired resistance of melanoma cells to the antineoplastic agent fotemustine is caused by reactivation of the DNA repair gene MGMT. *Int J Cancer*. 1 avr 2001;92(1):123-9.
131. Lage H, Christmann M, Kern MA, Dietel M, Pick M, Kaina B, et al. Expression of DNA repair proteins hMSH2, hMSH6, hMLH1, O6-methylguanine-DNA methyltransferase and N-methylpurine-DNA glycosylase in melanoma cells with acquired drug resistance. *Int J Cancer*. 1 mars 1999;80(5):744-50.
132. Ma S, Egyhazi S, Ueno T, Lindholm C, Kreklau EL, Stierner U, et al. O6-methylguanine-DNA-methyltransferase expression and gene polymorphisms in relation to chemotherapeutic response in metastatic melanoma. *Br J Cancer*. 20 oct 2003;89(8):1517-23.
133. Runger TM, Emmert S, Schadendorf D, Diem C, Epe B, Hellfritsch D. Alterations of DNA repair in melanoma cell lines resistant to cisplatin, fotemustine, or etoposide. *J Invest Dermatol*. janv 2000;114(1):34-9.
134. Beck WT, Danks MK, Wolverton JS, Granzen B, Chen M, Schmidt CA, et al. Altered DNA topoisomerase II in multidrug resistance. *Cytotechnology*. 1993;11(2):115-9.
135. Helmbach H, Rossmann E, Kern MA, Schadendorf D. Drug-resistance in human melanoma. *Int J Cancer*. 1 sept 2001;93(5):617-22.
136. O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, Eide CA, Rivera VM, Wang F, et al. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell*. 6 nov 2009;16(5):401-12.
137. Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature*. 16 déc 2010;468(7326):973-7.
138. Villanueva J, Vultur A, Lee JT, Somasundaram R, Fukunaga-Kalabis M, Cipolla AK, et al. Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell*. 14 déc 2010;18(6):683-95.

139. Emery CM, Vijayendran KG, Zipser MC, Sawyer AM, Niu L, Kim JJ, et al. MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proc Natl Acad Sci U A*. 1 déc 2009;106(48):20411-6.
140. Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, Thomas SR, Wardwell L, Johnson LA, et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature*. 16 déc 2010;468(7326):968-72.
141. Bousquet E, Mazieres J, Privat M, Rizzati V, Casanova A, Ledoux A, et al. Loss of RhoB expression promotes migration and invasion of human bronchial cells via activation of AKT1. *Cancer Res*. 1 août 2009;69(15):6092-9.
142. Yao Z, Fenoglio S, Gao DC, Camiolo M, Stiles B, Lindsted T, et al. TGF-beta IL-6 axis mediates selective and adaptive mechanisms of resistance to molecular targeted therapy in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U A*. 31 août 2010;107(35):15535-40.
143. Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, et al. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*. 26 juill 2012;487(7408):500-4.
144. Wagle N, Emery C, Berger MF, Davis MJ, Sawyer A, Pochanard P, et al. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J Clin Oncol*. 1 août 2011;29(22):3085-96.
145. Satyamoorthy K, Herlyn M. Cellular and molecular biology of human melanoma. *Cancer Biol Ther*. janv 2002;1(1):14-7.
146. Rio B, Louvet C, Gessain A, Dormont D, Gisselbrecht C, Martoia R, et al. [Adult T-cell leukemia and non-malignant adenopathies associated with HTLV I virus. Apropos of 17 patients born in the Caribbean region and Africa]. *Presse Med*. 21 avr 1990;19(16):746-51.
147. Bunn PA Jr, Schechter GP, Jaffe E, Blayney D, Young RC, Matthews MJ, et al. Clinical course of retrovirus-associated adult T-cell lymphoma in the United States. *N Engl J Med*. 4 août 1983;309(5):257-64.
148. Su IJ, Chang IC, Cheng AL. Expression of growth-related genes and drug-resistance genes in HTLV-I-positive and HTLV-I-negative post-thymic T-cell malignancies. *Ann Oncol*. févr 1991;2 Suppl 2:151-5.
149. Sun SC, Ballard DW. Persistent activation of NF-kappaB by the tax transforming protein of HTLV-1: hijacking cellular I kappa B kinases. *Oncogene*. 22 nov 1999;18(49):6948-58.
150. Hatta Y, Koeffler HP. Role of tumor suppressor genes in the development of adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL). *Leukemia*. juin 2002;16(6):1069-85.

151. Ramos JC, Ruiz P Jr, Ratner L, Reis IM, Brites C, Pedrosa C, et al. IRF-4 and c-Rel expression in antiviral-resistant adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*. 1 avr 2007;109(7):3060-8.
152. Clinical Trials Search Results [Internet]. National Cancer Institute. [cité 24 mai 2016]. Disponible sur: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/clinical-trials/search/results>
153. Larkin J, Ascierto PA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Maio M, et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med*. 13 nov 2014;371(20):1867-76.
154. Algazi AP, Soon CW, Daud AI. Treatment of cutaneous melanoma: current approaches and future prospects. *Cancer Manag Res*. 2010;2:197-211.
155. Carvajal RD, Sosman JA, Quevedo JF, Milhem MM, Joshua AM, Kudchadkar RR, et al. Effect of selumetinib vs chemotherapy on progression-free survival in uveal melanoma: a randomized clinical trial. *JAMA*. 18 juin 2014;311(23):2397-405.
156. Hodi FS, Friedlander P, Corless CL, Heinrich MC, Mac Rae S, Kruse A, et al. Major response to imatinib mesylate in KIT-mutated melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 avr 2008;26(12):2046-51.
157. Guo J, Si L, Kong Y, Flaherty KT, Xu X, Zhu Y, et al. Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 juill 2011;29(21):2904-9.
158. Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, Chapman PB, Roman RA, Teitcher J, et al. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA*. 8 juin 2011;305(22):2327-34.
159. Martin MJ, Hayward R, Viros A, Marais R. Metformin accelerates the growth of BRAF V600E-driven melanoma by upregulating VEGF-A. *Cancer Discov*. avr 2012;2(4):344-55.
160. Green DS, Bodman-Smith MD, Dalglish AG, Fischer MD. Phase I/II study of topical imiquimod and intralesional interleukin-2 in the treatment of accessible metastases in malignant melanoma. *Br J Dermatol*. févr 2007;156(2):337-45.
161. Nieda M, Terunuma H, Eiraku Y, Deng X, Nicol AJ. Effective induction of melanoma-antigen-specific CD8+ T cells via Vgamma9gammadeltaT cell expansion by CD56(high+) Interferon-alpha-induced dendritic cells. *Exp Dermatol*. janv 2015;24(1):35-41.

162. Ascierto PA, Kalos M, Schaer DA, Callahan MK, Wolchok JD. Biomarkers for immunostimulatory monoclonal antibodies in combination strategies for melanoma and other tumor types. *Clin Cancer Res.* 1 mars 2013;19(5):1009-20.
163. Hishizawa M, Kanda J, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, et al. Transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells for adult T-cell leukemia: a nationwide retrospective study. *Blood.* 26 août 2010;116(8):1369-76.
164. Marcais A, Suarez F, Sibon D, Bazarbachi A, Hermine O. Clinical trials of adult T-cell leukaemia/lymphoma treatment. *Leuk Res Treat.* 2012;2012:932175.
165. Bazarbachi A, Hermine O. Treatment with a combination of zidovudine and alpha-interferon in naive and pretreated adult T-cell leukemia/lymphoma patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1996;13 Suppl 1:S186-90.
166. Gill PS, Harrington W Jr, Kaplan MH, Ribeiro RC, Bennett JM, Liebman HA, et al. Treatment of adult T-cell leukemia-lymphoma with a combination of interferon alfa and zidovudine. *N Engl J Med.* 29 juin 1995;332(26):1744-8.
167. Hermine O, Bouscary D, Gessain A, Turlure P, Leblond V, Franck N, et al. Brief report: treatment of adult T-cell leukemia-lymphoma with zidovudine and interferon alfa. *N Engl J Med.* 29 juin 1995;332(26):1749-51.
168. Hermine O, Allard I, Levy V, Arnulf B, Gessain A, Bazarbachi A, et al. A prospective phase II clinical trial with the use of zidovudine and interferon-alpha in the acute and lymphoma forms of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Hematol J.* 2002;3(6):276-82.
169. White JD, Wharfe G, Stewart DM, Maher VE, Eicher D, Herring B, et al. The combination of zidovudine and interferon alpha-2B in the treatment of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leuk Lymphoma.* janv 2001;40(3-4):287-94.
170. Matutes E, Taylor GP, Cavenagh J, Pagliuca A, Bareford D, Domingo A, et al. Interferon alpha and zidovudine therapy in adult T-cell leukaemia lymphoma: response and outcome in 15 patients. *Br J Haematol.* juin 2001;113(3):779-84.
171. Bazarbachi A, Plumelle Y, Carlos Ramos J, Tortevoeye P, Otroock Z, Taylor G, et al. Meta-analysis on the use of zidovudine and interferon-alfa in adult T-cell leukemia/lymphoma showing improved survival in the leukemic subtypes. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 sept 2010;28(27):4177-83.
172. Bazarbachi A, Ghez D, Lepelletier Y, Nasr R, de Thé H, El-Sabban ME, et al. New therapeutic approaches for adult T-cell leukaemia. *Lancet Oncol.* nov 2004;5(11):664-72.
173. Hermine O, Wattel E, Gessain A, Bazarbachi A. Adult T cell leukaemia: a review of established and new treatments. *BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther.* déc 1998;10(6):447-62.

174. Olsen EA, Kim YH, Kuzel TM, Pacheco TR, Foss FM, Parker S, et al. Phase IIb multicenter trial of vorinostat in patients with persistent, progressive, or treatment refractory cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 20 juill 2007;25(21):3109-15.
175. Whittaker SJ, Demierre MF, Kim EJ, Rook AH, Lerner A, Duvic M, et al. Final results from a multicenter, international, pivotal study of romidepsin in refractory cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 10 oct 2010;28(29):4485-91.
176. Afonso PV, Mekaouche M, Mortreux F, Toulza F, Moriceau A, Wattel E, et al. Highly active antiretroviral treatment against HTLV-1 infection combining reverse transcriptase and HDAC inhibitors. *Blood*. 11 nov 2010;116(19):3802-8.
177. Bazarbachi A, El-Sabban ME, Nasr R, Quignon F, Awaraji C, Kersual J, et al. Arsenic trioxide and interferon-alpha synergize to induce cell cycle arrest and apoptosis in human T-cell lymphotropic virus type I-transformed cells. *Blood*. 1 janv 1999;93(1):278-83.
178. El-Sabban ME, Nasr R, Dbaibo G, Hermine O, Abboushi N, Quignon F, et al. Arsenic-interferon-alpha-triggered apoptosis in HTLV-I transformed cells is associated with tax down-regulation and reversal of NF-kappa B activation. *Blood*. 15 oct 2000;96(8):2849-55.
179. Nasr R, Rosenwald A, El-Sabban ME, Arnulf B, Zalloua P, Lepelletier Y, et al. Arsenic/interferon specifically reverses 2 distinct gene networks critical for the survival of HTLV-1-infected leukemic cells. *Blood*. 1 juin 2003;101(11):4576-82.
180. El Hajj H, El-Sabban M, Hasegawa H, Zaatari G, Ablain J, Saab ST, et al. Therapy-induced selective loss of leukemia-initiating activity in murine adult T cell leukemia. *J Exp Med*. 20 déc 2010;207(13):2785-92.
181. Moura IC, Lepelletier Y, Arnulf B, England P, Baude C, Beaumont C, et al. A neutralizing monoclonal antibody (mAb A24) directed against the transferrin receptor induces apoptosis of tumor T lymphocytes from ATL patients. *Blood*. 1 mars 2004;103(5):1838-45.
182. Waldmann TA, White JD, Goldman CK, Top L, Grant A, Bamford R, et al. The interleukin-2 receptor: a target for monoclonal antibody treatment of human T-cell lymphotropic virus I-induced adult T-cell leukemia. *Blood*. 15 sept 1993;82(6):1701-12.
183. Utsunomiya A, Choi I, Chihara D, Seto M. Recent advances in the treatment of adult T-cell leukemia-lymphomas. *Cancer Sci*. avr 2015;106(4):344-51.
184. Dueck G, Chua N, Prasad A, Finch D, Stewart D, White D, et al. Interim report of a phase 2 clinical trial of lenalidomide for T-cell non-Hodgkin lymphoma. *Cancer*. 1 oct 2010;116(19):4541-8.

185. Mone A, Puhalla S, Whitman S, Baiocchi RA, Cruz J, Vukosavljevic T, et al. Durable hematologic complete response and suppression of HTLV-1 viral load following alemtuzumab in zidovudine/IFN- α -refractory adult T-cell leukemia. *Blood*. 15 nov 2005;106(10):3380-2.
186. O'Connor OA, Pro B, Pinter-Brown L, Bartlett N, Popplewell L, Coiffier B, et al. Pralatrexate in patients with relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma: results from the pivotal PROPEL study. *J Clin Oncol*. 20 mars 2011;29(9):1182-9.
187. Piekarz RL, Frye R, Prince HM, Kirschbaum MH, Zain J, Allen SL, et al. Phase 2 trial of romidepsin in patients with peripheral T-cell lymphoma. *Blood*. 2 juin 2011;117(22):5827-34.
188. Ravandi F, Aribi A, O'Brien S, Faderl S, Jones D, Ferrajoli A, et al. Phase II study of alemtuzumab in combination with pentostatin in patients with T-cell neoplasms. *J Clin Oncol*. 10 nov 2009;27(32):5425-30.
189. Del Prete A, Allavena P, Santoro G, Fumarulo R, Corsi MM, Mantovani A. Molecular pathways in cancer-related inflammation. *Biochem Med Zagreb*. 2011;21(3):264-75.
190. Mantovani A. Molecular pathways linking inflammation and cancer. *Curr Mol Med*. juin 2010;10(4):369-73.
191. Mathema VB, Koh YS, Thakuri BC, Sillanpaa M. Parthenolide, a sesquiterpene lactone, expresses multiple anti-cancer and anti-inflammatory activities. *Inflammation*. avr 2012;35(2):560-5.
192. Huang A, Chen Y, Zhou Y, Guo W, Wu X, Ma C. An efficient one-pot synthesis of benzo[4,5]imidazo[1,2-a]quinoxalines via copper-catalyzed process. *Org Lett*. 1 nov 2013;15(21):5480-3.
193. Krasavin M, Shkavrov S, Parchinsky V, Bukhryakov K. Imidazo[1,2-a]quinoxalines accessed via two sequential isocyanide-based multicomponent reactions. *J Org Chem*. 20 mars 2009;74(6):2627-9.
194. Li B, Cociorva OM, Nomanbhoy T, Weissig H, Li Q, Nakamura K, et al. Hit-to-lead optimization and kinase selectivity of imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-amine derived JNK1 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 15 sept 2013;23(18):5217-22.
195. Moarbess G, Deleuze-Masquefa C, Bonnard V, Gayraud-Paniagua S, Vidal JR, Bressolle F, et al. In vitro and in vivo anti-tumoral activities of imidazo[1,2-a]quinoxaline, imidazo[1,5-a]quinoxaline, and pyrazolo[1,5-a]quinoxaline derivatives. *Bioorg Med Chem*. 1 juill 2008;16(13):6601-10.
196. Deleuze-Masquefa C, Moarbess G, Khier S, David N, Gayraud-Paniagua S, Bressolle F, et al. New imidazo[1,2-a]quinoxaline derivatives: synthesis and in

- vitro activity against human melanoma. *Eur J Med Chem.* sept 2009;44(9):3406-11.
197. Khier S, Deleuze-Masquefa C, Moarbess G, Gattacceca F, Margout D, Solassol I, et al. Pharmacology of EAPB0203, a novel imidazo[1,2-a]quinoxaline derivative with anti-tumoral activity on melanoma. *Eur J Pharm Sci.* 31 janv 2010;39(1-3):23-9.
198. Khier S, Moarbess G, Deleuze-Masquefa C, Solassol I, Margout D, Pinguet F, et al. Quantitation of imidazo[1,2-a]quinoxaline derivatives in human and rat plasma using LC/ESI-MS. *J Sep Sci.* mai 2009;32(9):1363-73.
199. Moarbess G, El-Hajj H, Kfoury Y, El-Sabban ME, Lepelletier Y, Hermine O, et al. EAPB0203, a member of the imidazoquinoxaline family, inhibits growth and induces caspase-dependent apoptosis in T-cell lymphomas and HTLV-I-associated adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood.* 1 avr 2008;111(7):3770-7.
200. Bilu D, Sauder DN. Imiquimod: modes of action. *Br J Dermatol.* nov 2003;149 Suppl 66:5-8.
201. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, et al. Small antiviral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol.* févr 2002;3(2):196-200.
202. Schon M, Bong AB, Drewniok C, Herz J, Geilen CC, Reifenberger J, et al. Tumor-selective induction of apoptosis and the small-molecule immune response modifier imiquimod. *J Natl Cancer Inst.* 6 août 2003;95(15):1138-49.
203. Schon MP, Wienrich BG, Drewniok C, Bong AB, Eberle J, Geilen CC, et al. Death receptor-independent apoptosis in malignant melanoma induced by the small-molecule immune response modifier imiquimod. *J Invest Dermatol.* mai 2004;122(5):1266-76.
204. Saliba J, Deleuze-Masquefa C, Iskandarani A, El Eit R, Hmadi R, Mahon FX, et al. EAPB0503, a novel imidazoquinoxaline derivative, inhibits growth and induces apoptosis in chronic myeloid leukemia cells. *Anticancer Drugs.* juill 2014;25(6):624-32.
205. Deleuze-Masquefa C, Gerebtzoff G, Subra G, Fabreguettes JR, Ovens A, Carraz M, et al. Design and synthesis of novel imidazo[1,2-a]quinoxalines as PDE4 inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 1 mars 2004;12(5):1129-39.
206. Morjaria S, Deleuze-Masquefa C, Lafont V, Gayraud S, Bompart J, Bonnet PA, et al. Impairment of TNF-alpha production and action by imidazo[1,2- alpha]quinoxalines, a derivative family which displays potential anti-inflammatory properties. *Int J Immunopathol Pharmacol.* juill 2006;19(3):525-38.

207. Roussel M, Saule S, Lagrou C, Rommens C, Beug H, Graf T, et al. Three new types of viral oncogene of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation. *Nature*. 11 oct 1979;281(5731):452-5.
208. Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*. 11 mars 1976;260(5547):170-3.
209. Palca J. Interest in the human genome project reaches new heights. *Nature*. 19 févr 1987;325(6106):651.
210. Hood L, Heath JR, Phelps ME, Lin B. Systems biology and new technologies enable predictive and preventative medicine. *Science*. 22 oct 2004;306(5696):640-3.
211. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 15 oct 1999;286(5439):531-7.
212. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U A*. 11 sept 2001;98(19):10869-74.
213. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 19 déc 2002;347(25):1999-2009.
214. Bertucci F, Pages C, Finetti P, Rochaix P, Lamant L, Devilard E, et al. Gene expression profiling of human melanoma cell lines with distinct metastatic potential identifies new progression markers. *Anticancer Res*. sept 2007;27(5A):3441-9.
215. Bertucci F, Finetti P, Rougemont J, Charafe-Jauffret E, Cervera N, Tarpin C, et al. Gene expression profiling identifies molecular subtypes of inflammatory breast cancer. *Cancer Res*. 15 mars 2005;65(6):2170-8.
216. Bertucci F, Finetti P, Rougemont J, Charafe-Jauffret E, Nasser V, Loriod B, et al. Gene expression profiling for molecular characterization of inflammatory breast cancer and prediction of response to chemotherapy. *Cancer Res*. 1 déc 2004;64(23):8558-65.
217. Bertucci F, Salas S, Eysteries S, Nasser V, Finetti P, Ginestier C, et al. Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene*. 19 févr 2004;23(7):1377-91.
218. Bertucci F, Houlgatte R, Nguyen C, Benziane A, Nasser V, Granjeaud S, et al. [Molecular typing of breast cancer: transcriptomics and DNA microarrays]. *Bull Cancer*. mars 2001;88(3):277-86.

219. Bertucci F, Loriol B, Tagett R, Granjeaud S, Birnbaum D, Nguyen C, et al. [DNA arrays: technological aspects and applications]. *Bull Cancer*. mars 2001;88(3):243-52.
220. Yang Y, Adelstein SJ, Kassis AI. Integrated bioinformatics analysis for cancer target identification. *Methods Mol Biol*. 2011;719:527-45.
221. Hoheisel JD. Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis. *Nat Rev Genet*. mars 2006;7(3):200-10.
222. Southern EM. DNA microarrays. History and overview. *Methods Mol Biol*. 2001;170:1-15.
223. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*. 5 nov 1975;98(3):503-17.
224. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet*. janv 1999;21(1 Suppl):10-4.
225. Tang T, Francois N, Glatigny A, Agier N, Mucchielli MH, Aggerbeck L, et al. Expression ratio evaluation in two-colour microarray experiments is significantly improved by correcting image misalignment. *Bioinformatics*. 15 oct 2007;23(20):2686-91.
226. Piper MD, Daran-Lapujade P, Bro C, Regenber B, Knudsen S, Nielsen J, et al. Reproducibility of oligonucleotide microarray transcriptome analyses. An interlaboratory comparison using chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 4 oct 2002;277(40):37001-8.
227. Staal FJT, van der Burg M, Wessels LFA, Barendregt BH, Baert MRM, van den Burg CMM, et al. DNA microarrays for comparison of gene expression profiles between diagnosis and relapse in precursor-B acute lymphoblastic leukemia: choice of technique and purification influence the identification of potential diagnostic markers. *Leukemia*. juill 2003;17(7):1324-32.
228. Nguyen DV, Arpat AB, Wang N, Carroll RJ. DNA microarray experiments: biological and technological aspects. *Biometrics*. déc 2002;58(4):701-17.
229. Weeraratna AT, Nagel JE, de Mello-Coelho V, Taub DD. Gene expression profiling: from microarrays to medicine. *J Clin Immunol*. mai 2004;24(3):213-24.
230. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. avr 2003;4(2):249-64.
231. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*. 2004;5(10):R80.

232. Allison DB, Cui X, Page GP, Sabripour M. Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus. *Nat Rev Genet.* janv 2006;7(1):55-65.
233. Zhu Q, Miecznikowski JC, Halfon MS. Preferred analysis methods for Affymetrix GeneChips. II. An expanded, balanced, wholly-defined spike-in dataset. *BMC Bioinformatics.* 2010;11:285.
234. Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics.* 2006;7:96.
235. Michiels S, Koscielny S, Hill C. Prediction of cancer outcome with microarrays: a multiple random validation strategy. *Lancet.* 5 févr 2005;365(9458):488-92.
236. Bittner M, Meltzer P, Trent J. Data analysis and integration: of steps and arrows. *Nat Genet.* juill 1999;22(3):213-5.
237. Jombart T, Devillard S, Balloux F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genet.* 2010;11:94.
238. Bassett DE Jr, Eisen MB, Boguski MS. Gene expression informatics--it's all in your mine. *Nat Genet.* janv 1999;21(1 Suppl):51-5.
239. Baldi P, Long AD. A Bayesian framework for the analysis of microarray expression data: regularized t -test and statistical inferences of gene changes. *Bioinformatics.* juin 2001;17(6):509-19.
240. Martin DE, Demougin P, Hall MN, Bellis M. Rank Difference Analysis of Microarrays (RDAM), a novel approach to statistical analysis of microarray expression profiling data. *BMC Bioinformatics.* 11 oct 2004;5:148.
241. Gene Ontology C. Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Res.* janv 2015;43(Database issue):D1049-56.
242. Al-Shahrour F, Diaz-Uriarte R, Dopazo J. FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics.* 1 mars 2004;20(4):578-80.
243. Bauer S, Gagneur J, Robinson PN. GOing Bayesian: model-based gene set analysis of genome-scale data. *Nucleic Acids Res.* juin 2010;38(11):3523-32.
244. Bauer S, Grossmann S, Vingron M, Robinson PN. Ontologizer 2.0--a multifunctional tool for GO term enrichment analysis and data exploration. *Bioinformatics.* 15 juill 2008;24(14):1650-1.
245. Wren JD, Bateman A. Databases, data tombs and dust in the wind. *Bioinformatics.* 1 oct 2008;24(19):2127-8.

246. Supek F, Bosnjak M, Skunca N, Smuc T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One*. 2011;6(7):e21800.
247. Resnik P. Selectional constraints: an information-theoretic model and its computational realization. *Cognition*. oct 1996;61(1-2):127-59.
248. Katsetos CD, Draber P. Tubulins as therapeutic targets in cancer: from bench to bedside. *Curr Pharm Des*. 2012;18(19):2778-92.
249. Trainer DL, Kline T, McCabe FL, Faucette LF, Feild J, Chaikin M, et al. Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines. *Int J Cancer*. 15 févr 1988;41(2):287-96.
250. Huguet EL, McMahon JA, McMahon AP, Bicknell R, Harris AL. Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. *Cancer Res*. 15 mai 1994;54(10):2615-21.
251. Hasegawa H, Sawa H, Lewis MJ, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, et al. Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat Med*. avr 2006;12(4):466-72.
252. Wang L, Hurley DG, Watkins W, Araki H, Tamada Y, Muthukaruppan A, et al. Cell cycle gene networks are associated with melanoma prognosis. *PLoS One*. 2012;7(4):e34247.
253. Reddien PW, Horvitz HR. The engulfment process of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:193-221.
254. Farkas IJ, Szanto-Varnagy A, Korcsmaros T. Linking proteins to signaling pathways for experiment design and evaluation. *PLoS One*. 2012;7(4):e36202.
255. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 27 juin 2002;417(6892):949-54.
256. Khier S, Gattacceca F, El Messaoudi S, Lafaille F, Deleuze-Masquefa C, Bompard J, et al. Metabolism and pharmacokinetics of EAPB0203 and EAPB0503, two imidazoquinoxaline compounds previously shown to have antitumoral activity on melanoma and T-lymphomas. *Drug Metab Dispos*. oct 2010;38(10):1836-47.
257. Lafaille F, Solassol I, Enjalbal C, Bertrand B, Doulain P-E, Vappiani J, et al. Structural characterization of in vitro metabolites of the new anticancer agent EAPB0503 by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. janv 2014;88:429-40.
258. Zghaib Z, Guichou J-F, Vappiani J, Bec N, Hadj-Kaddour K, Vincent L-A, et al. New imidazoquinoxaline derivatives: Synthesis, biological evaluation on

- melanoma, effect on tubulin polymerization and structure-activity relationships. *Bioorg Med Chem.* 1 juin 2016;24(11):2433-40.
259. Nakaya M, Kitano M, Matsuda M, Nagata S. Spatiotemporal activation of Rac1 for engulfment of apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci U A.* 8 juill 2008;105(27):9198-203.
260. Chimini G, Chavrier P. Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat Cell Biol.* oct 2000;2(10):E191-6.
261. May RC, Machesky LM. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci.* mars 2001;114(Pt 6):1061-77.
262. Gumienny TL, Brugnera E, Tosello-Trampont AC, Kinchen JM, Haney LB, Nishiwaki K, et al. CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell.* 5 oct 2001;107(1):27-41.
263. Kinchen JM, Ravichandran KS. Journey to the grave: signaling events regulating removal of apoptotic cells. *J Cell Sci.* 1 juill 2007;120(Pt 13):2143-9.
264. Tosello-Trampont AC, Brugnera E, Ravichandran KS. Evidence for a conserved role for CRKII and Rac in engulfment of apoptotic cells. *J Biol Chem.* 27 avr 2001;276(17):13797-802.
265. Arthur WT, Noren NK, Burrige K. Regulation of Rho family GTPases by cell-cell and cell-matrix adhesion. *Biol Res.* 2002;35(2):239-46.
266. Embade N, Valeron PF, Aznar S, Lopez-Collazo E, Lacal JC. Apoptosis induced by Rac GTPase correlates with induction of FasL and ceramides production. *Mol Biol Cell.* déc 2000;11(12):4347-58.
267. Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci.* 1 nov 2004;117(Pt 23):5479-87.
268. Lu Z, Xu S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life.* nov 2006;58(11):621-31.
269. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. Properties of polyethylene glycol 660 12-hydroxy stearate at a triglyceride/water interface. *Int J Pharm.* 21 août 2002;242(1-2):167-70.



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

New imidazoquinoxaline derivatives: Synthesis, biological evaluation on melanoma, effect on tubulin polymerization and structure–activity relationships



Zahraa Zghaib^{a,b}, Jean-François Guichou^{c,d}, Johanna Vappiani^a, Nicole Bec^e, Kamel Hadj-Kaddour^a, Laure-Anaïs Vincent^a, Stéphanie Paniagua-Gayraud^a, Christian Larroque^e, Georges Moarbess^b, Pierre Cuq^a, Issam Kassab^b, Carine Deleuze-Masquéfa^{a,*}, Mona Diab-Assaf^b, Pierre-Antoine Bonnet^a

^a Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247, CNRS, Université de Montpellier, ENSCM, Faculté de Pharmacie, 15, avenue Charles Flahault, BP14491, 34093 Montpellier cedex 5, France

^b Tumorigenèse et Pharmacologie Antitumorale, Lebanese University, BP 90656, Fanar Jdeideh, Lebanon

^c CNRS, UMR5048 – Université de Montpellier, Centre de Biochimie Structurale, F-34090 Montpellier, France

^d INSERM, U1054, F-34090 Montpellier, France

^e IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM U896, 34298 Montpellier, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 December 2015

Revised 25 March 2016

Accepted 1 April 2016

Available online 1 April 2016

Keywords:

Antiproliferative activity
Tubulin depolymerization
Human melanoma cancer cell line (A375)
Structure–activity relationship
Molecular docking
Imidazo[1,2-*a*]quinoxaline

ABSTRACT

Microtubules are considered as important targets of anticancer therapy. **EAPB0503** and its structural imidazo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives are major microtubule-interfering agents with potent anticancer activity. In this study, the synthesis of several new derivatives of **EAPB0503** is described, and the anticancer efficacy of 13 novel derivatives on A375 human melanoma cell line is reported. All new compounds show significant antiproliferative activity with IC₅₀ in the range of 0.077–122 μM against human melanoma cell line (A375). Direct inhibition of tubulin polymerization assay *in vitro* is also assessed. Results show that compounds **6b**, **6e**, **6g**, and **EAPB0503** highly inhibit tubulin polymerization with percentages of inhibition of 99%, 98%, 90%, and 84% respectively. Structure–activity relationship studies within the series are also discussed in line with molecular docking studies into the colchicine-binding site of tubulin.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Microtubules are the key components of the cytoskeleton of eukaryotic cells and have an important role in various cellular functions such as mitosis, exocytosis, and maintenance of cellular morphology, active transport, cell shape and polarization.^{1,2} They play a critical role in cell division by their involvement in the movement and attachment of the chromosomes during various stages of mitosis. Therefore microtubule dynamics is an important target for the development of anti-cancer agents.^{3–5} Microtubules are composed of α/β tubulin heterodimers, always in a state of equilibrium.^{3,4} Microtubule targeting agents (MTA), drugs that interfere with microtubule dynamic stability, are widely employed in the clinic to treat a variety of cancers or are exploited as probes to gain insights into microtubule structure and function.^{4–10} MTAs are antimetabolic agents which perturb not only mitosis but also

arrest cells during interphase. MTAs are known to interact with tubulin through at least four binding sites: the laulimalide, taxane/epothilone, vinca alkaloid, and colchicine sites.^{1,11} Colchicine binds to the intradimeric α – β interface of tubulin heterodimers contiguous to the GTP-binding domain of the α -tubulin subunit^{12–15} and the tubulin–colchicine complex prevents further polymerization of the microtubule. Such complex brings about a conformational change which blocks the tubulin dimers from further addition and prevents the growth of the microtubule by producing potent destabilization effects of microtubules, resulting in the subsequent shutdown of existing tumor vasculature.^{1,16}

Efforts have been increasing for new compounds exhibiting inhibition of tubulin assembly and disassembly in order to induce anti-proliferative activities and treat a wide variety of malignancies.^{17–22} The alteration of microtubule dynamics prevents cells division and apoptosis of different human cancer lines including Multi Drug Resistant (MDR) cancer cell lines.^{23–25}

Imidazoquinoxalines derivatives have been designed by our laboratory since 2004 using different strategies of synthesis.

* Corresponding author. Tel.: +33 4 11 75 95 36; fax: +33 11 75 95 53.

E-mail address: carine.masquefa@umontpellier.fr (C. Deleuze-Masquéfa).

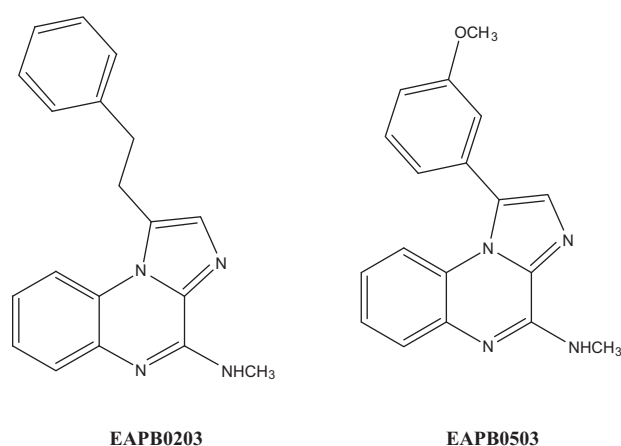


Figure 1. Chemical structure of lead compounds.

Among these derivatives, **EAPB0203** and **EAPB0503** (Fig. 1) have shown potent antitumor properties *in vitro* and *in vivo* against melanoma and T-cell lymphomas.^{26–29} Preliminary studies have shown antitubulin activity for those two derivatives.³⁰

Previous structure–activity relationship (SAR) studies with imidazoquinoxalines analogs were reported.^{26,27} In continuation of previous work and in order to better study the possible correlation between the antiproliferative effect of our derivatives on human melanoma cell line and microtubule disruption, a new series of imidazoquinoxalines derivatives has been designed. Their biological activities were determined on the human melanoma cancer cell line A375 and possible correlations with their effect on tubulin polymerization were determined. Complementary molecular modeling studies on the colchicine binding domains of tubulin contribute to give new insights on structure activity relationships and possible development of the series.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

2.1.1. Synthesis of EAPB0503 derivatives

EAPB0503 and its derivatives have attracted our attention since 2004, due to their promising high potential activity against different types of cancer. They have been synthesized using a new strategy detailed previously.^{26,27} Based on these encouraging

first data on anticancer activity, new imidazoquinoxaline derivatives were designed. They have been obtained using the same strategy of synthesis. The advantage of this new synthetic method remains in the fact that all considered imidazoquinoxalines can be obtained from the same and common intermediate, the compound **1** (Scheme 1). The substitution for diversity is then performed at the last steps of the synthesis. The use of microwave assistance allows to dramatically optimize the time of reactions, purity of the intermediates, and global yields. It is also to be noted that the synthesis of the parent compound **1** can also be optimized using microwave assistance by treating the 4,5-lactame derivative precursor with phosphorus oxychloride and *N,N*-diethylaniline in a sealed vial using a Biotage[®] initiator microwave synthesizer. Nevertheless, the crude compound obtained still requires further purification on silica gel column chromatography for the next steps of the synthetic scheme.

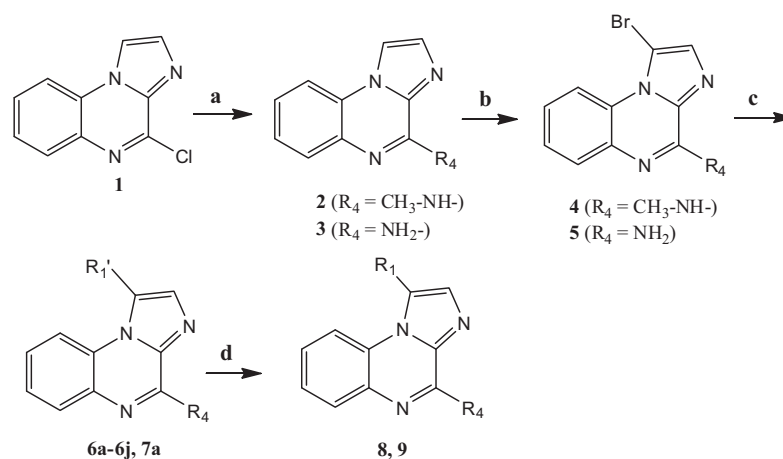
First diversity on position 4 is obtained by substitution of the chlorine on compound **1** by the appropriate amine under microwave heating to give compounds **2** and **3**. The bromination on position 1 of compounds **2** and **3** by *N*-bromosuccinimide under microwave conditions leads to compound **4** and **5**, respectively. In comparison to the initial synthetic procedure,^{26–28} steps *a* and *b* (Scheme 1) as well as the step leading to the parent compound **1**, have been optimized using microwave irradiation instead of conventional heating.

A second step for diversity is obtained using different arylboronic acids in Suzuki–cross coupling reactions. As expected, the palladium catalyzed substitution selectively occurs on the bromo position to obtain compounds **6a** to **6j**, and **7a** under microwave assistance (140 °C, 20 min) with good to acceptable yields. The phenol derivatives **8** and **9** can be obtained by a treatment of the methoxy compounds **EAPB0503** and **7a** with iodocyclohexane under conventional heating. Compounds **2** to **4**, **EAPB0503**, **6a** and **6b** were described with their analytical data in previous studies.^{26–28}

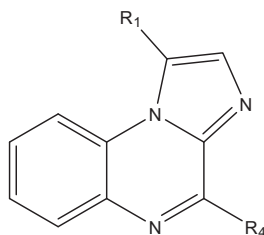
2.2. Biological evaluation

2.2.1. *In vitro* cell growth inhibition

All compounds were tested for their cytotoxic effect on human melanoma cell line (A375), our *in vitro* model used previously for screening,^{26–28} using **EAPB0503** as reference, which showed previously an important cytotoxic activity comparing to fotemustine, clinically used for human melanoma treatment.^{26–28} The screening results reported in Table 1 demonstrate that all our new



Scheme 1. Synthesis of **EAPB0503** derivatives. (a) EtOH, NH₂CH₃ in ethanol or NH₄OH in water, MW (180 °C, 20 min); (b) NBS, CHCl₃, reflux 1 h 30 min; (c) Suzuki-cross coupling (R₁'-B(OH)₂), Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, DME, MW (140 °C, 20 min); (d) iodocyclohexane, DMF, reflux 16 h.

Table 1Imidazoquinoxaline derivatives: general formula, IC₅₀ values against A375 cells and effect on tubulin polymerization inhibition

Compounds	R1	R4	IC ₅₀ ^a (μM) on A375 ^b	% Of tubulin polymerization inhibition/DMSO 5 μM ^c
EAPB0503	3-OCH ₃ -C ₆ H ₄ -	CH ₃ -NH-	0.2 ± 0.02	84.0 ± 3.2
6a	2-OCH ₃ -C ₆ H ₄ -	CH ₃ -NH-	122 ± 25	0
6b	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄ -	CH ₃ -NH-	0.37 ± 0.4	99.0 ± 3.4
8	3-OH-C ₆ H ₄ -	CH ₃ -NH-	1.25 ± 0.18	0
7a	3-OCH ₃ -C ₆ H ₄ -	H ₂ N-	0.20 ± 0.0014	41.0 ± 7.8
9	3-OH-C ₆ H ₄ -	H ₂ N-	2.4 ± 0.6	11.33 ± 6.3
6c	2,3-di-OCH ₃ -C ₆ H ₃ -	CH ₃ -NH-	5.9 ± 0.3	0
6d	3,4-di-OCH ₃ -C ₆ H ₃ -	CH ₃ -NH-	0.3 ± 0.003	63.0 ± 8.0
6e	3,5-di-OCH ₃ -C ₆ H ₃ -	CH ₃ -NH-	0.22 ± 0.005	98.5 ± 4.0
6f	2,5-di-OCH ₃ -C ₆ H ₃ -	CH ₃ -NH-	1.20 ± 0.044	3.0 ± 2.4
6g	2-OH-3-OCH ₃ -C ₆ H ₃ -	CH ₃ -NH-	0.077 ± 0.005	90.0 ± 7.7
6h	2,3,4-tri-OCH ₃ -C ₆ H ₃ -	CH ₃ -NH-	1.50 ± 0.30	0
6i	3,4,5-tri-OCH ₃ -C ₆ H ₂ -	CH ₃ -NH-	1.80 ± 0.38	0
6j	2,4,6-tri-OCH ₃ -C ₆ H ₂	CH ₃ -NH-	2.30 ± 0.09	0
Colchicine			0.010 ± 0.002	52 ± 5

IC₅₀: compound concentration required for A375 growth inhibition by 50%.^a Values are derived from three independent experiments, the standard deviation are also noted.^b A375 human melanoma cells.^c Values are expressed in percentages, derived from three independent experiments and the SD are also calculated.

compounds showed significant antiproliferative activity with IC₅₀ in the range of 0.077–122 μM against human melanoma cell line used. Compounds **6b**, **6d**, **6e**, **6g**, **7a** and **8** were distinctly more potent from the other compounds. However, **6g** was the only compound presenting the highest significant antiproliferative activity in comparison to **EAPB0503** ($P = 0.002 < 0.05$). It displayed an IC₅₀ values about 0.077 μM, 3 time-folds more potent than **EAPB0203** (0.2 μM). Compound **6a** showed the lowest cytotoxic activity ($P < 0.05$). Based on the cytotoxicity data, the structure–activity relationship (SAR) for these new imidazoquinoxaline derivatives was examined. It is interesting to observe that the compounds with a methoxy or hydroxy substitution at *meta*-position (**7a**, **8** and **9**), and the dimethoxy substitutions at 3,4 or 3,5 and 3,6 positions (**6d**, **6e**, and **6f**) on the phenyl ring (R1) showed similar or slightly reduced activity on A375 cancer cell in comparison to **EAPB0503**. Moderate decrease in activity than **EAPB0503** was observed for the trimethoxy substituted compounds (**6h**, **6i** and **6j**). The *ortho*-methoxy substitution (**6a**) showed an important decrease in the cytotoxic activity. It is important to note that the 2-hydroxy-3-methoxy compound (**6g**) presented the most important antiproliferative activity. These findings conducted us to highlight that at least one methoxy or hydroxy substitution at *meta*-position on the phenyl ring is recommended to maintain the cytotoxic activity of these derivatives.

2.2.2. In vitro effect on tubulin polymerization

To investigate whether the antiproliferative activities of these compounds were related or not to the interaction with tubulin and in order to more investigate the mechanism of action of our derivatives, we evaluated their capacity for binding and inhibiting tubulin polymerization. For this issue, tubulin was purified from pig brain tissue according the protocol described in Section 4. Colchicine, a known natural antitubulin inhibitor, was used as reference. The results on tubulin polymerization are illustrated in Table 1.

Compounds **6b**, **6e**, **6g**, and **EAPB0503** (at 5 μM) were highly effective in their ability to inhibit tubulin assembly with percentages of inhibition values of 99%, 98%, 90% and 84%, respectively. These compounds exhibited significant high potency on tubulin inhibition in comparison with colchicine which demonstrated a percentage up to 52% of inhibition ($P = 0.01, 0.01, 0.04$, and 0.02 , respectively < 0.05). The high effect on tubulin inhibition is correlated with their potent antiproliferative effect on human melanoma cell line. This reported data showed an important role of these derivatives as antiproliferative and antimitotic agents. Based on the structural analogy with colchicine, we decided to introduce methoxy groups, presents on colchicine, on our compounds to improve their antitubulin inhibition. Surprisingly, compounds (**6a**, **6h**, **6i**, and **6j**) bearing three methoxy substitutions did not show any inhibition of tubulin assembly.

2.2.3. EAPB0503, 6b and 6e causes G2/M cell-cycle arrest

Cellular DNA contents were determined by Flow cytometer analysis on cell treatment. **EAPB0503**, **6b** and **6e** induced significant dose-dependent changes in the cell-cycle distribution (Fig. 2). Indeed, all 3 compounds induce a dramatic blockage in G2/M phase. Those results were agreed to those of antitubulinic agents that usually caused a block of cells in the G2/M phase of the cell cycle. In fact, their ability to inhibit tubulin assembly will avoid the mitotic spindle formation and so the mitosis.

2.3. Molecular modeling

In order to better precise and in line with SAR the tubulin affinity and selectivity of our compounds, molecular docking simulations were determined with this series of compounds. The 3D structures of all chemical compounds were generated using PRODRG interface.³¹ Molecular docking studies were performed using the GOLD software³² to examine a possible binding mode

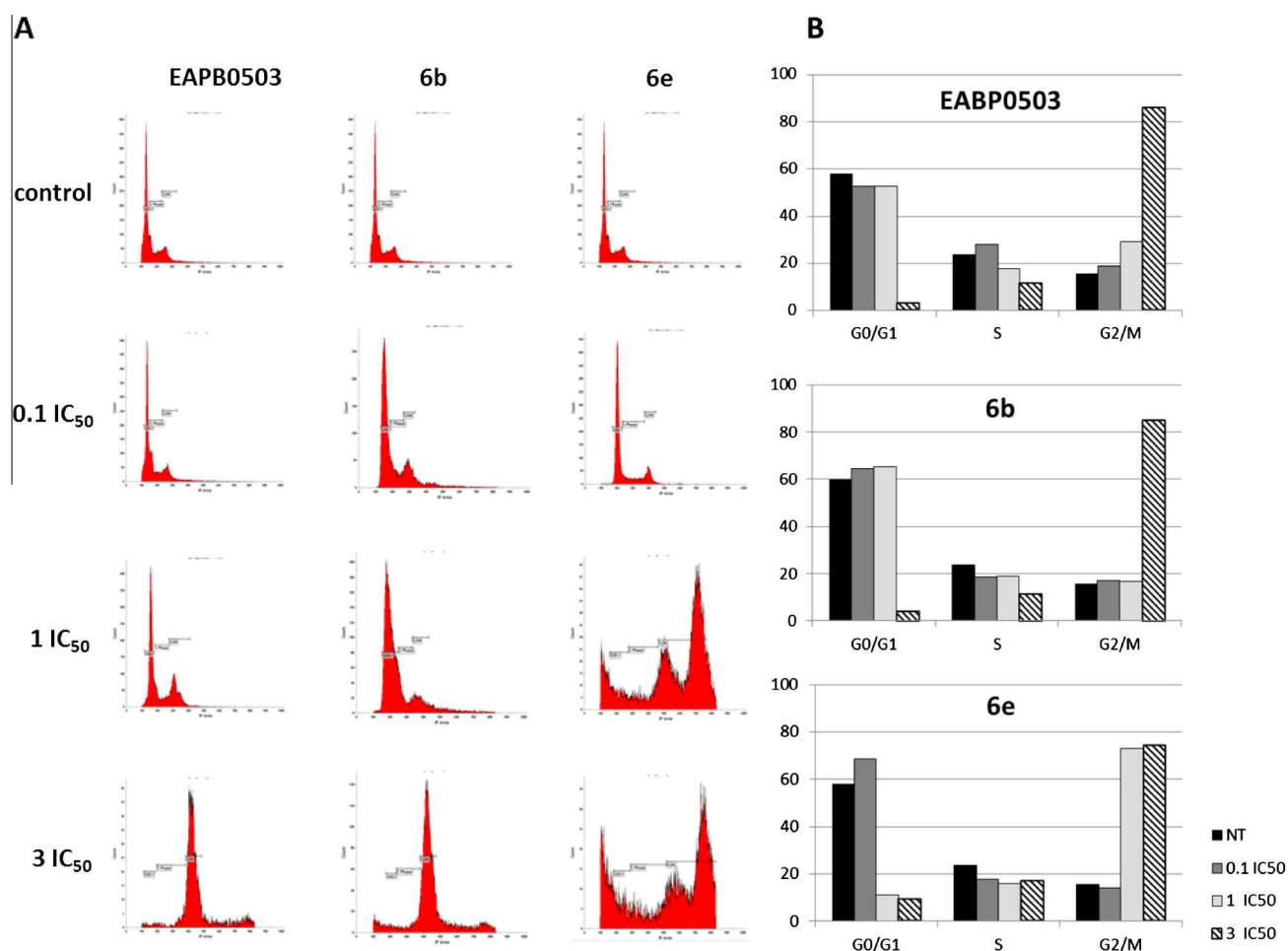


Figure 2. EABP0503, 6b and 6e induce G2/M cell arrest on A375 cell line. (A) Effects of EABP0503, 6b and 6e on the cell-cycle distribution on A375 cell line. Treated cells were stained with PI (25 µg/ml), and the cell-analysis was performed by a Gallios flow cytometer. (B) The G0/G1, S and G2/M percentage measured in treated cells.

of all compounds in the colchicine binding domains of tubulin. Colchicine binds between the two chains (α and β) of tubulin making a hydrogen bond with Val181 of chain β ³³ and a hydrogen bond with Thr353 of chain α connected with a water molecule (Fig. 3a). The tri-methoxyphenyl ring of colchicine is buried in a hydrophobic pocket of chain α form by the side chain of residues Cys241, Leu242, Leu248, Ala250, Leu255, Ile318, Ala354 and Ile378 (Fig. 3a). The tropolone ring of colchicine is at the entrance of this pocket and made Van der Waals interactions with the side chain of residues Leu255, Met259, Ala316 and Lys352. Docking studies of all compounds into the colchicine site of tubulin showed a good correlation with the inhibition of tubulin polymerization. As an example, compounds 6a, 6c, 6h, 6i and 6j could not be docked in this colchicine site and demonstrated absence of tubulin polymerization inhibition. On the contrary, compounds EABP0503, 6b, 6e, 6g and 7a could be docked in the colchicine site. Compound 6g with the highest activity on A375 cells showed a good superimposition of the tropolone ring with the phenyl substituted (Fig. 3b–d) by making a hydrogen bond with Val181 of chain β as the colchicine. Imidazoquinoxaline ring made a hydrogen bond with residue Asn101 from chain β and Van der Wall interaction with Leu255, Met259, Ala316 and Lys352 from chain α . These finding suggested that compound 6g does not mimic the tri-methoxyphenyl ring of the colchicine fitting into the hydrophobic pocket of chain α . This result can explain the inactivity of compounds 6h, 6i and 6j bearing three methoxy groups on the phenyl ring due to clash with Met259.

The results obtained from the docking simulations provided us a general binding mode that was able to justify the biological activity of the compounds and gave some indication for further rational improvement of imidazoquinoxaline derivatives.

3. Conclusion

A library of new heterocyclic compounds, imidazo[1,2-*a*]quinoxaline derivatives were synthesized under microwave assistance. The total reaction time and the yield of the products have been optimized comparing to the conventional heating. These new derivatives exhibited remarkable antiproliferative effects on human melanoma cell lines (A375). Compound 6g presented the most important antiproliferative activity. SAR studies showed that at least one methoxy or hydroxy substitution at *meta*-position on the phenyl ring is mandatory to maintain the cytotoxic activity of these derivatives. Compounds 6b, 6e, 6g, and EABP0503, showed potent inhibitions of the tubulin polymerization which are correlated to the antiproliferative activities. Compound 6g is able to make a hydrogen bond with Val181 of chain β as colchicine and another hydrogen bond with residue Asn101 from chain β and Van der Wall interaction with Leu255, Met259, Ala316 and Lys352 from chain α . On the basis of these important properties, these derivatives can be promising leads in the development of anti-cancer agents.

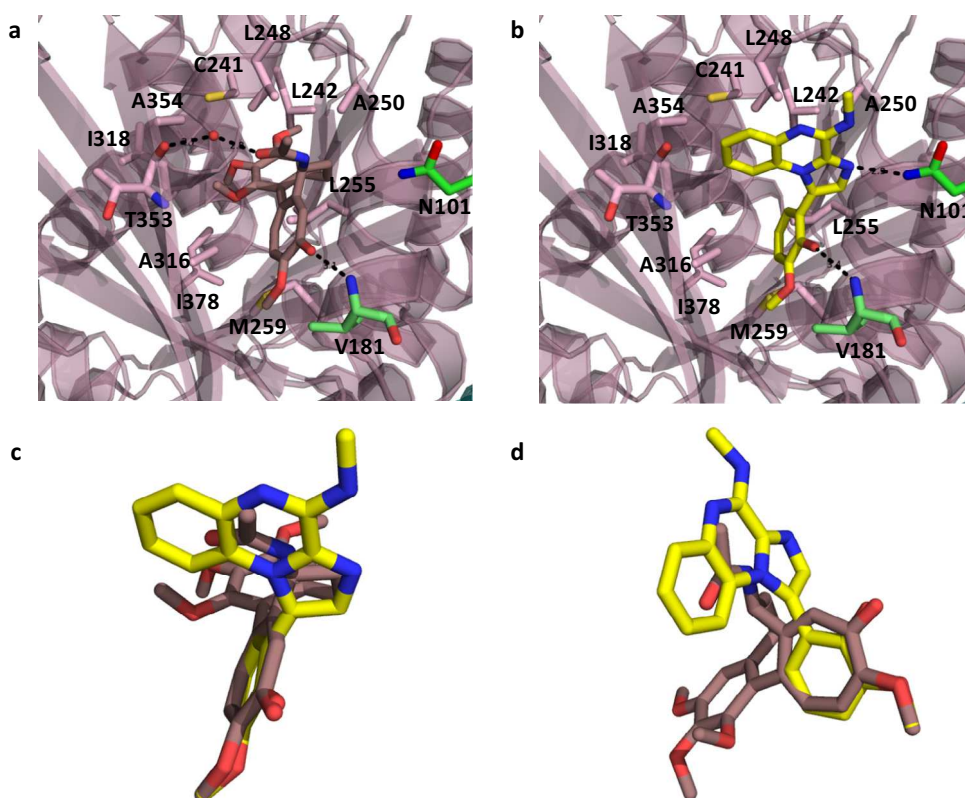


Figure 3. Compound **6g** in the colchicine binding pocket of tubulin chains α and β . (a) Structure of tubulin with colchicine bound PDB 4O2B; (b) hydrogen bonds interaction between compound **6g** and tubulin (view from the top of the ligand); (c) superposition of compound **6g** and colchicine (view from the top). (d) superposition of compound **6g** and colchicine (view from the side). Color coding: nitrogen atoms blue, oxygen atoms red, carbon atoms pale pink for tubulin chain α , carbon atoms green for tubulin chain β , carbon atoms yellow for compound **6g** and brown for colchicine; hydrogen bonds were showed by black dash-line, the distance was denoted by Å; water molecule is shown as non-bond sphere.

4. Experimental

4.1. Chemistry

All solvents and reagents were obtained from commercial sources and used without further purification unless indicated otherwise. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded using a Bruker AC 400 or 300 spectrometer. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) from the tetramethylsilane resonance in the indicated solvent. Coupling constants are reported in Hertz (Hz), spectral splitting partners are designed as follow: (s) singlet, (br s) broad singlet, (d) doublet, (dd) doublet of doublets (t) triplet, (td) triplet of doublets, (m) multiplet. High Resolution Mass Spectra (HRMS) (ElectroSpray Ionization method (ESI) and Q-T of high resolution) were recorded on Synapt G2-S (Waters) by the physical measure department (IBMM, Montpellier, France). Column chromatography was performed on Aldrich silica gel 60 (230–400 mesh). The microwave organic synthesis was assisted by the Biotage[®] initiator (temperature range: 40–300 °C; pressure range: 0–30 bar; power range: 0–400 W from magnetron at 2.45 GHz).

4.1.1. Imidazo[1,2-*a*]quinoxalin-4-amine (**3**)

NH_4OH of a 33% (w/v) aqueous solution (2.7 mL, 19.7 mmol) was added to a solution of **1** (0.500 g, 2.5 mmol) in acetonitrile (5 mL). The mixture was placed under microwave heating at 180 °C during 20 min. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was dissolved in CH_2Cl_2 (20 mL). The organic fraction was successively washed with saturated NaCl solution (15 mL) and water (15 mL), dried (Na_2SO_4), and concentrated under reduced pressure. The product was obtained

(yield, 94%) and used without purification. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.92 (d, 1H), 7.79 (d, 1H), 7.72 (m, 2H), 7.65 (m, 2H), 6.66 (br s, 2H); ^{13}C NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 142.49, 131.92, 129.26, 128.88, 127.58, 125.81, 125.26, 124.72, 114.26, 111.75.

4.1.2. 1-Bromoimidazo[1,2-*a*]quinoxalin-4-amine (**5**)

A solution of **3** (1.25 g, 6.8 mmol) and *N*-bromosuccinimide (1.3 g, 7.5 mmol) in CHCl_3 (200 mL) was heated under reflux for 1h30. The resulting solution was cooled, washed with 5% sodium hydrogen carbonate (50 mL), dried with Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. Yield 80%. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.95 (d, 1H), 7.75 (m, 2H), 7.71 (m, 1H), 7.68 (m, 1H), 6.65 (br s, 2H); ^{13}C NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 142.20, 138.78, 129.66, 128.16, 127.17, 126.95, 126.18, 125.51, 113.98, 99.27. HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{Br}$ $[\text{M}]^+$ 277.0089; found 277.0088.

General procedure for the Suzuki cross-coupling reaction^{21–23}.

The Suzuki coupling of **4** (300 mg, 1.09 mmol) or **5** with the corresponding aryl boronic acid in the presence of palladium catalyst $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (60 mg), basic conditions Na_2CO_3 (250 mg), DME (10 mL), H_2O (5 mL) and under microwave assistance (140 °C, 20 min) led to **6c–6j** and **7a**. These compounds were purified by column chromatography on silica gel, leading to the pure desired products.

4.1.3. 1-(2,3-Dimethoxyphenyl)-*N*-methylimidazo[1,2-*a*]quinoxalin-4-amine (**6c**)

2,3-Dimethoxyphenyl boronic acid (218 mg, 1.2 mmol). Yellow solid (66%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.80 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.32–7.10 (m, 4H), 7.02–6.90 (m, 2H), 6.28 (br s, 1H), 3.95

(s, 3H), 3.55 (s, 3H), 3.28 (d, 3H). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 153.07, 148.16, 137.72, 133.95, 132.28, 126.91, 126.68, 126.17, 125.23, 124.32, 123.68, 122.68, 115.58, 114.26, 60.72, 55.98, 27.87. HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_2$ [M]⁺ 335.1508; found 335.1510.

4.1.4. 1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-N-methylimidazo[1,2-a]quinoxalin-4-amine (6d)

3,4-Dimethoxyphenyl boronic acid (218 mg, 1.2 mmol). Off white solid (30%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.87 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.38–7.35 (m, 2H), 7.13–6.97 (m, 4H), 6.50 (br s, 1H), 3.96 (s, 3H), 4.02 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.37 (br s, 3H). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 149.99, 149.11, 148.28, 138.02, 133.66, 132.06, 130.73, 127.11, 125.82, 123.19, 122.81, 122.37, 115.98, 113.39, 111.28, 56.08, 56.03, 27.59. HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_2$ [M]⁺ 335.1508; found 335.1510.

4.1.5. 1-(3,5-Dimethoxyphenyl)-N-methylimidazo[1,2-a]quinoxalin-4-amine (6e)

3,5-Dimethoxyphenyl boronic acid (218 mg, 1.2 mmol). Yellow solid (40%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.79 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.37–7.26 (m, 3H), 6.94 (td, 1H), 6.59–6.56 (m, 3H), 6.43 (br s, 1H), 3.75 (s, 6H), 3.29 (br s, 3H). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 161.05, 132.24, 126.64, 123.02, 116.33, 108.29, 55.58, 28.11. HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_2$ [M]⁺ 335.1508; found 335.1505.

4.1.6. 1-(2,5-Dimethoxyphenyl)-N-methylimidazo[1,2-a]quinoxalin-4-amine (6f)

2,5-dimethoxyphenyl boronic acid (218 mg, 1.2 mmol). White solid (83%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.86 (d, J = 4 Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.38–7.28 (m, 2H), 7.11–6.96 (m, 4H), 6.51 (br s, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.58 (s, 3H), 3.37 (br s, 3H). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 153.55, 152.34, 147.89, 132.25, 126.36, 122.72, 120.15, 117.63, 116.07, 115.54, 112.00, 55.89, 55.84, 28.08. HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_2$ [M]⁺ 335.1508; found 335.1509.

4.1.7. 1-(2-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-N-methylimidazo[1,2-a]quinoxalin-4-amine (6g)

2-Hydroxy-3-methoxyphenyl boronic acid (201 mg, 1.2 mmol). White solid (9%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.80 (br s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.36–7.26 (m, 2H), 7.06–6.93 (m, 4H), 6.35 (br s, 1H), 6.05 (br s, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.27 (br s, 3H). ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 146.32, 143.50, 142.84, 139.57, 131.13, 130.76, 129.38, 129.02, 125.91, 124.90, 124.47, 121.72, 121.48, 117.99, 114.94, 108.52, 55.93, 29.30. HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2$ [M]⁺ 321.1352; found 321.1354.

4.1.8. 1-(3-Methoxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-amine (7a)

5 (320 mg, 1.21 mmol), 3-methoxyphenyl boronic acid (370 mg, 2.4 mmol). Yield 79%. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.98 (s, 1H), 7.65 (m, 2H), 7.55 (m, 2H), 7.3 (m, 2H), 6.97 (m, 2H), 6.2 (br s, 2H), 3.52 (s, 3H). ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 160.89, 143.10, 131.06, 130.68, 129.88, 129.73, 128.27, 127.39, 126.20, 125.02, 124.86, 119.97, 118.73, 115.08, 111.87, 108.79, 55.30. HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}$ [M]⁺ 291.1246; found 291.1251.

4.1.9. N-Methyl-1-(2,3,4-trimethoxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-amine (6h)

2,3,4-Trimethoxyphenyl boronic acid (365 mg, 2.17 mmol). Yellow solid (15%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.80 (br s, 1H), 7.35–7.19 (m, 3H), 7.05 (d, J = 8 Hz, 1H), 6.95–6.88 (m, 1H), 6.74 (d, J = 8 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.53 (s, 3H), 3.30 (br s, 3H). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 154.61, 151.73, 146.64, 141.37, 131.13, 131.03, 125.31, 121.88, 114.49, 106.14, 60.05,

59.86, 55.12, 28.67. HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_3$ [M]⁺ 365.1614; found 365.1615.

4.1.10. N-Methyl-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-amine (6i)

3,4,5-Trimethoxyphenyl boronic acid (365 mg, 2.17 mmol). Yellow solid (28%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.76 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.31–7.26 (m, 2H), 6.93 (td, 1H), 6.66 (s, 2H), 6.38 (br s, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.78 (s, 6H), 3.26 (br s, 3H). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 153.54, 147.92, 138.99, 132.10, 128.34, 125.47, 122.73, 119.10, 116.15, 107.56, 61.12, 56.32, 27.97. HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_3$ [M]⁺ 365.1614; found 365.1616.

4.1.11. N-Methyl-1-(2,4,6-trimethoxyphenyl)imidazo[1,2-a]quinoxalin-4-amine (6j)

2,4,6-Trimethoxyphenyl boronic acid (365 mg, 2.17 mmol). Yellow solid (20%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.70 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.30–7.21 (m, 3H), 6.88 (td, 1H), 6.41 (br s, 1H), 6.18 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.56 (s, 6H), 3.22 (br s, 3H). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 163.06, 160.18, 148.20, 132.16, 132.06, 126.41, 125.90, 122.62, 115.04, 114.45, 100.45, 90.78, 55.79, 55.53, 27.77. HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_3$ [M]⁺ 365.1614; found 365.1613.

General procedure for the demethylation reaction. To **EAPB0503** and **7a** under nitrogen atmosphere in anhydrous dimethylformamide, iodocyclohexane was added to the mixture and the reactions were heated to reflux for 16 h. Iced water (20 mL) was added to the residues and the products were extracted with CH_2Cl_2 (3 \times 30 mL). The combined organic extracts were washed with water (40 mL), dried (Na_2SO_4) and concentrated to dryness under reduced pressure. The crude products were purified by column chromatography on silica gel using C_6H_{12} –EtOAc (50:50 v/v) as eluent, leading to products, which were then taken into chloroform at 0 °C, filtrated and washed with iced chloroform, yielding to the pure compounds **8** and **9**.

4.1.12. 3-(4-Methylamino)imidazo[1,2-a]quinoxalin-1-yl)phenol (8)

EAPB0503 (200 mg, 0.64 mmol), dimethylformamide (2 mL), iodocyclohexane (3.3 mmol, 0.424 mL). Yield 22%. ^1H NMR (300 MHz, MeOD) δ : 9.84 (br s, 2H), 7.78 (dd, 1H), 7.62 (dd, 1H), 7.4 (m, 2H), 7.35 (m, 1H), 7.29 (m, 2H), 6.85 (m, 2H), 3.25 (s, 3H), ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 160.07, 142.83, 139.57, 131.46, 131.13, 130.35, 129.59, 129.02, 126.92, 124.90, 124.47, 122.10, 117.66, 114.96, 114.43, 112.32, 29.32. HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}$ [M]⁺ 291.1246; found 291.1245.

4.1.13. 3-(4-Amino)imidazo[1,2-a]quinoxalin-1-yl)phenol (9)

7a (200 mg, 0.689 mmol), dimethylformamide (5 mL), iodocyclohexane (8.26 mmol, 1.00 mL). Yield 17%. ^1H NMR (300 MHz, MeOD) δ : 9.88 (br s, 3H), 7.55 (m, 2H), 7.45 (m, 2H), 7.32 (m, 2H), 7.20 (s, 1H), 6.98 (m, 2H). ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 160.07, 143.10, 131.58, 131.06, 130.35, 129.35, 129.97, 129.97, 129.73, 126.78, 126.20, 125.02, 124.85, 119.97, 118.37, 115.08, 114.43, 113.03. HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}$ [M]⁺ 277.1089; found 277.1093.

4.2. Biological evaluation

4.2.1. Materials and reagents

Compounds and reactants used in this study were bought from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), isopropyl alcohol and chlorhydric acid were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All other reagents were of analytical grade and were obtained from commercial sources. Statistical analysis

for the values was performed using *t*-test and *P* values are calculated. Probably values of less than 0.05 were considered statistically significant.

4.2.2. Cell lines and culture techniques

Melanoma human cancer cell line (A375) was obtained from American Type Culture Collection (Rockville, Md., USA). Cells were cultured in RPMI medium containing RPMI-1640 (LONZA, Basel, Switzerland), supplemented with 10% heat-inactivated (56 °C) foetal bovine serum (FBS) (Gibco, Waltham, MA, USA), 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin G sodium, 100 µg/ml streptomycin sulfate and 0.25 µg/ml amphotericin B. Cells were maintained in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37 °C.

4.2.3. Cytotoxicity assay

Previously to the experiments, the number of cells by well, the doubling time and the MTT concentration have been optimized. In all the experiments, A375 were seeded at a final concentration of 5000 cells/well in 96-well microtiter plates and allowed to attach overnight. After 20–24 h incubation, the medium was aspirated carefully from the plates using a sterile Pasteur pipette, and cells were exposed (i) to vehicle controls (1% DMSO/culture medium and culture medium alone), (ii) to **EAPB0503**, of 10⁻⁴–10⁻¹⁰ µM, diluted in the culture medium, and (iii) to the synthesized compounds (10⁻⁴–10⁻¹⁰ µM) dissolved in a mixture 1% DMSO/culture medium (v/v). After 96 h of incubation, 10 µl of MTT solution in PBS (5 mg/ml, phosphate-buffer saline pH 7.3) were added to each well and the wells were incubated at 37 °C for 4 h. This colorimetric assay is based on the ability of live and metabolically unimpaired tumor-cell targets to reduce MTT to a blue formazan product. At the end of the incubation period, the supernatant was carefully aspirated, then, 100 µl of a mixture of isopropyl alcohol and 1 M hydrochloric acid (96/4, v/v) were added to each well. After 10 min of incubation and vigorous shaking to solubilize formazan crystals, the optical density was measured at 570 nm in a microculture plate reader (Dynatech MR 5000, France). For each assay, at least three experiments were performed in triplicate. The individual cell line growth curves confirmed all tumor lines in control medium remained in the log phase of cell growth 96 h after plating. Cell survival was expressed as percent of vehicle control. The IC₅₀ values defined as the concentrations of drugs which produced 50% cell growth inhibition; 50% reduction of absorbance, were estimated from the sigmoidal dose–response curves.

4.2.4. In vitro tubulin polymerization analysis

Tubulin was prepared from pig brain according to the purification procedure described by Williams and Lee.^{34,35} To evaluate the effect of the compounds on tubulin assembly in vitro, tubulin polymerization was monitored turbidimetrically at 350 nm with a MC2 spectrophotometer (Safas, Monaco) equipped with a thermal-jacketed cuvette holder. The reaction mixture was prepared at 0 °C, and contained PEM (Pipes 0.1 M, EGTA 2 mM, MgSO₄ 1 mM pH 6.9) buffer, 25% glycerol (v/v), 1 mM GTP, MgSO₄ 5 mM, and 12 µM tubulin. GTP and tubulin were added at the very last minute. **EAPB0503**, its derivatives and colchicine stock solutions were diluted in DMSO to the desired concentration, and 2 µl of the compound solution was added to the medium (final concentration: 5 µM). The same volume of DMSO alone was used for negative control. The final volume of the sample was 200 µl. The reaction was started by placing the cuvette in the spectrophotometer cell compartment thermostated at 37 °C. Ice was added 45 min later to initiate depolymerization to check for signal specificity.

4.2.5. Flow cytometric analysis

The cell cycle distribution was monitored by flow cytometric analysis as previously described by Brons et al.³⁶ A375 cells were

harvested after treatment with **EAPB0503**, **6e** or **6b** for 24 h, washed with PBS and were spun down (400 g, 5 min at 4 °C), the supernatant was discarded, and the pellet placed on ice for 10 min. Subsequently 900 µl of an ice-cold hypotonic PI solution (221, containing 25 µg/ml Propidium iodure (Sigma), 0.1% w/v tri-sodium citrate dihydrate (Sigma, St Louis), 10% v/v RNA-se A solution (Sigma, St. Louis) and 0.1% v/v Triton X-100 in distilled water, was added. Cells were kept overnight on ice and analyzed for DNA content. The stained cells were performed by a Gallios 10 photomultipliers (Beckman coulter) in Montpellier Rio Imaging facilities (MRI platform, Montpellier, France). The cell cycle distribution was analyzed using KALUZA flow analysis software (Beckman coulter). For each experiment, 20,000 events per sample were recorded.

4.2.6. Molecular docking analysis

The molecular modeling studies were performed with GOLD.³² The crystal structure of tubulin complexed with colchicine (PDB 4O2B)³⁷ was retrieved from the RCSB Protein Data Bank. The binding sphere with a radius of 25.0 Å was defined with residue Leu255 as the binding site. All compounds were drawn with PRODRG³¹ and protonated using BABEL. Finally, they were docked into the binding site using the GOLD³² protocol with the default settings. The pictures were generated by the program PYMOL.³⁸

Acknowledgements

This work was supported by the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) ANR-10-INSB-05-01. Zahraa Zghaib thanks Islamic Association for Guidance and Higher Education for its financial support. Flow cytometry was performed at MRI-Cytométrie-IRB, Institute For Regenerative Medicine and Biotherapy, Hôpital St Eloi, CHU de Montpellier.

References and notes

1. Yaqiong, M.; Senbiao, F.; Li, L. H.; Han, C.; Lu, Y.; Zhao, Y.; Liu, Y.; Zhao, C. *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *82*, 12.
2. Janke, C.; Kneusse, M. *Neuroscience* **2010**, *33*, 362.
3. Kamal, A.; Reddy, C. R.; Vishnuvardhan, M. V. P. S.; Mahesh, R.; Nayak, V. L.; Prabhakar, S.; Reddy, C. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *24*, 2309.
4. Jordan, A.; Hadfield, J. A.; Lawrence, N. J.; McGown, A. T. *Med. Res. Rev.* **1998**, *18*, 259.
5. Giannakakou, P.; Sackett, D.; Fojo, T. *J. Natl Cancer Inst.* **2000**, *92*, 182.
6. Mishra, R. C.; Karna, P.; Gundala, S. R.; Pannu, V.; Stanton, R. A.; Gupta, K. K.; Robinson, M. H.; Lopus, M.; Wilson, L. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *82*, 110.
7. Jordan, M. A.; Wilson, L. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 253.
8. Mollinedo, F.; Gajate, C. *Apoptosis* **2003**, *8*, 413.
9. Zhou, J.; Giannakakou, P. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2005**, *5*, 65.
10. Pasquier, E.; Honore, S.; Braguer, D. *Drug Resist. Update* **2006**, *9*, 74.
11. Zheng, C. H.; Chen, J.; Liu, J.; Zhou, X. T.; Liu, N.; Shi, D.; Huang, J. J.; Lv, J. G.; Zhu, J.; Zhou, Y. *J. Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2012**, *345*, 454.
12. Ravelli, R. B.; Gigant, B.; Curmi, P. A.; Jourdain, I.; Lachkar, S.; Sobel, A.; Knossow, M. *Nature* **2004**, *428*, 198.
13. Risinger, A. L.; Giles, F. J.; Mooberry, S. L. *Cancer Treat. Rev.* **2009**, *35*, 255.
14. Brossi, A.; Yeh, H. J.; Chrzanoswska, M.; Wolff, J.; Hamel, E.; Lin, C. M.; Quin, F.; Suffness, M.; Silverton, J. *Med. Res. Rev.* **1988**, *8*, 77.
15. Bhattacharyya, B.; Panda, D.; Gupta, S.; Banerjee, M. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 155.
16. Paños, J.; Díaz-Oltra, S.; Sánchez-Peris, M.; García-Pla, J.; Murga, J.; Falomir, E.; Carda, M.; Redondo-Horcajo, M.; Díaz, J. F.; Barasoain, I.; Marco, J. A. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 5809.
17. Lu, Y.; Chen, J.; Xiao, M.; Li, W.; Miller, D. D. *Pharm. Res.* **2012**, *29*, 2943.
18. Kaur, R.; Kaur, G.; Kaur Gill, R.; Soni, R.; Bariwal, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *87*, 89.
19. Lamberth, C.; Murphy Kessabi, F.; Beaudegnies, R.; Quaranta, L.; Trah, S.; Berthon, G.; Cederbaum, F.; Knauf-Beiter, G.; Grasso, V.; Bieri, S.; Corran, A.; Thacker, U. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 3922.
20. Suman, P.; Ramalinga Murthy, T.; Rajkumar, K.; Srikanth, D.; Dayakar, C.; Kishor, C.; Addlagatta, A.; Kalivendi, S. V.; China Raju, B. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *90*, 603.
21. Kale, S. S.; Jedhe, G. S.; Meshram, S. N.; Santra, M. K.; Hamel, E.; Sanjayan, G. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 1982.
22. Beaudegnies, R.; Quaranta, L.; Murphy Kessabi, F.; Lamberth, C.; Knauf-Beiter, G.; Fraser, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 444.

23. Kingston, D. G. I. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 507.
24. Becker, T.; Mahboobi, S. *Drugs Future* **2003**, *28*, 767.
25. Jordan, J. A.; Hadfield, J. A.; Lawrence, N. J.; McGown, A. T. *Med. Res. Rev.* **1998**, *18*, 259.
26. Moarbess, G.; Deleuze-Masquefa, C.; Bonnard, V.; Gayraud-Paniagua, S.; Vidal, J. R.; Bressolle, F.; Pinguet, F.; Bonnet, P. A. *Biorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 6601.
27. Masquefa, C.; Moarbess, G.; Bonnet, P. A.; Pinguet, F.; Bazarbachi, A.; Bressolle, F. U.S. Patent 8,378,098, 2013.
28. Deleuze-Masquefa, C.; Moarbess, G.; Khier, S.; David, N.; Gayraud-Paniagua, S.; Bressolle, F.; Pinguet, F.; Bonnet, P. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3406.
29. Moarbess, G.; El-Hajj, H.; Kfoury, Y.; El-Sabban, M. E.; Lepelletier, Y.; Hermine, O.; Deleuze-Masquefa, C.; Bonnet, P. A.; Bazarbachi, A. *Blood* **2008**, *111*, 3770.
30. Saliba, J.; Deleuze-Masquefa, C.; Iskandarani, A.; El Eit, R.; Hmadi, R.; Mahon, F. X.; Bazarbachi, A.; Bonnet, P. A.; Nasr, R. *Anticancer Drugs* **2014**, *25*, 624.
31. <<http://www.davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrg>>.
32. PLANTS: Korb, O.; Stütze, T.; Exner, T. E. *Lect. Notes Comput. Sci.* **2006**, *4150*, 247.
33. La Regina, G.; Bai, R.; Coluccia, A.; Famigliani, V.; Pelliccia, S.; Passacantilli, S.; Mazzoccoli, C.; Ruggieri, V.; Verrico, A.; Miele, A.; Monti, L.; Nalli, M.; Alfonsi, R.; Di Marcotullio, L.; Gulino, A.; Ricci, B.; Soriani, A.; Santoni, A.; Caraglia, M.; Porto, S.; Da Pozzo, E.; Martini, C.; Brancale, A.; Marinelli, L.; Novellino, E.; Vultaggio, S.; Varasi, M.; Mercurio, C.; Bigogno, C.; Dondio, G.; Hamel, E.; Lavia, P.; Silvestri, R. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 5789.
34. Hamel, E.; Lin, C. M. *Biochemistry* **1984**, *23*, 4173.
35. Williams, R. J.; Lee, J. *Methods Enzymol.* **1982**, *85B*, 376.
36. Brons, P. P. T.; Pennings, A. H. M.; Haanen, C.; Wessels, H. M. C.; Boezeman, J. B. M. *Cytometry* **1990**, *11*, 837.
37. Prota, A. E.; Danel, F.; Bachmann, F.; Bargsten, K.; Buey, R. M.; Pohlmann, J.; Reinelt, S.; Lane, H.; Steinmetz, M. O. *J. Mol. Biol.* **2014**, *426*, 1848.
38. <<http://pymol.sourceforge.net>>.

Résumé

Les imidazoquinoxalines (imiqualines), molécules bioactives originales analogues chimiques de l'imiquimod et présentant un important potentiel anticancéreux, ont été explorées afin d'élucider leurs mécanismes d'action. Les molécules **EAPB0203** et **EAPB0503**, identifiées lors d'études antérieures comme étant les « têtes de séries », ont montré un effet cytotoxique puissant *in vitro* sur des lignées cellulaires cancéreuses humaines de mélanome et de lymphomes T. Nous avons étudié l'effet cytotoxique de 13 imiqualines nouvellement synthétisées sur une lignée cellulaire de mélanome humain (A375). Tous les composés ont montré un effet cytotoxique important. L'effet cytotoxique a été démontré sur d'autres lignées cellulaires cancéreuses humaines (côlon, sein et lymphome T de l'adulte).

Un blocage du cycle cellulaire en phase G2/M a été mis en évidence par cytométrie en flux sur des cellules A375 traitées par **EAPB0203** et **EAPB0503**. Cet arrêt du cycle cellulaire semble être en relation avec un effet inhibiteur de la polymérisation de la tubuline. En effet, nos résultats ont montré que l'**EAPB0503** et 3 autres imiqualines inhibent la polymérisation de la tubuline. L'étude de modélisation moléculaire de la liaison à de la tubuline a montré que ces composés se fixent sur le site de la colchicine.

Une analyse transcriptomique sur **EAPB0503** a été effectuée pour élucider le mécanisme d'action des imiqualines. Cette étude a été faite sur la lignée A375 en comparaison avec 13 anticancéreux de référence. L'étude transcriptomique a montré que **EAPB0503** a une composante antitubuline tout en révélant un mécanisme d'action original. Deux hypothèses mécanistiques pour **EAPB0503** ont ainsi été identifiées : 1/ altération de la voie de signalisation liée aux intégrines, 2/ altération de la voie de signalisation du récepteur TNFR et de FasL.

Des analyses fonctionnelles *in vitro* nous ont permis d'explorer ces hypothèses. Ainsi, une altération uniquement des voies de signalisation PI3K/AKT et RAS/MAPK, toutes deux liées aux intégrines, a été observée. La première hypothèse semble donc validée. De plus, ce résultat a été confirmé par l'étude de l'expression et de la phosphorylation de ERK.

Finalement, nous avons développé une formulation injectable par voie intraveineuse de **EAPB0503** à base de nanocapsules. Cette formulation a d'abord été testée *in vitro* et *in vivo* sur un modèle de lymphome. Ces études ont pu mettre en évidence l'absence de toxicité des nanoparticules vides et le maintien de l'activité cytotoxique de **EAPB0503** encapsulé *in vitro*, avec un effet immunomodulateur *in vivo* qui demande à être exploré.

Mots clés : Imidazoquinoxalines, antitubuline, mélanome, lymphome, transcriptomique, mécanisme d'action

Keywords: imidazoquinoxalines, antitubulin, melanoma, lymphoma, transcriptomic, mechanism of action

Abstract

The imidazoquinoxalines (imiqualines), original bioactive molecules and chemical analogues of imiquimod and with significant anti-cancer potential, were explored in order to elucidate their mechanisms of action. The molecules EAPB0203 and EAPB0503 identified in previous studies as leader, showed potent *in vitro* cytotoxic effect on human cancer cell lines of melanoma and T lymphoma. We studied the cytotoxic effect 13 newly synthesized imiqualines on a cell line of human melanoma (A375). All compounds showed a significant cytotoxic effect. The cytotoxic effect was shown on other human cancer cell lines (colon, breast and adult T lymphoma).

A cell cycle block in G2 / M phase was demonstrated by flow cytometry on A375 cells treated with EAPB0203 and EAPB0503. This cell cycle arrest seems to be related with an inhibitory effect on the polymerization of tubulin. Indeed, our results showed that EAPB0503 and three other imiqualines inhibit tubulin polymerization. The molecular modeling study of binding to tubulin showed that these compounds bind at the colchicine site.

A transcriptomic analysis on EAPB0503 was performed to elucidate the mechanism of action of imiqualines. This study was made on the A375 line compared with 13 approved anticancer molecules. This transcriptomic study showed that EAPB0503 has an antitubulin effect while revealing a novel mechanism of action. Two mechanistic hypotheses for EAPB0503 were identified: 1/ alteration of the signaling pathway linked to integrin, 2/ alteration of the signaling pathway TNFR receptor and FasL.

In vitro functional analyses have allowed us to explore these hypotheses. Thus, alteration only PI3K / AKT and RAS / MAPK signaling pathways, both related to integrins, was observed. The first hypothesis seems confirmed. Moreover, this result was confirmed by the study of the expression and phosphorylation of ERK.

Finally, we developed an intravenously injectable formulation of EAPB0503 based on nanocapsules. This formulation was first tested *in vitro* and *in vivo* on lymphoma model. These studies could highlight the lack of toxicity of empty nanoparticles and retention of the cytotoxic activity of encapsulated EAPB0503 *in vitro*, with an *in vivo* immunomodulatory effect which needs to be explored.