Evaluation préclinique d'une nouvelle stratégie de radiosensibilisation pharmacologique : l'inhibition des histones désacétylases

Sofia Rivera

▶ **To cite this version:**

Sofia Rivera. Evaluation préclinique d'une nouvelle stratégie de radiosensibilisation pharmacologique : l'inhibition des histones désacétylases. Cancer. Université Paris-Saclay, 2016. Français. NNT : 2016SACLS507 . tel-01648406v1

HAL Id: tel-01648406

https://theses.hal.science/tel-01648406v1

Submitted on 26 Nov 2017 (v1), last revised 6 Dec 2017 (v2)

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.

NNT : 2016SACLS507

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
Préparée au laboratoire de radiothérapie moléculaire INSERM U1030

ECOLE DOCTORALE N°582
Cancérologie : biologie-médecine-santé (CBMS)
Spécialité de doctorat :
aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par
Mlle Sofia Rivera

Evaluation préclinique d'une nouvelle stratégie de radiosensibilisation pharmacologique : l'inhibition des histones désacétylases

Thèse présentée et soutenue à Gustave Roussy, le 12 décembre 2016

Composition du jury :

Dr Jean Luc PERFETTINI	Gustave Roussy, Université Paris Sud	Président
Dr Stéphane SUPIOT	Institut de Cancérologie de l'Ouest, Université de Nantes	Rapporteur
Pr Nicolas MAGNE	Centre Lucien Neuwirth, Université Jean Monnet	Rapporteur
Pr Philippe MAINGON	Hôpital Pitié-Salpêtrière, APHP, Université P. et M. Curie	Examinateur
Pr Eric DEUTSCH	Gustave Roussy, Université Paris Sud	Directeur de thèse
Pr Christophe HENNEQUIN	Hôpital Saint Louis, APHP, Université Paris Diderot	Co-directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Éric Deutsch et le Professeur Christophe Hennequin, qui m'ont fait l'honneur de diriger cette thèse. Éric, Christophe, merci pour vos conseils, votre confiance et vos encouragements qui m'ont permis de mener ce travail à son terme. Merci également pour votre amitié, votre enthousiasme, votre capacité à me remotiver en toutes circonstances et votre soutien concernant tous mes projets et les moments importants de ma vie professionnelle.

Merci à Céline Leteur, sans qui ce travail n'aurait pas abouti. Merci pour ton aide scientifique et technique, merci pour tout le travail fourni, tes efforts et ta patience.

Merci au Docteur Jean Luc Perfettini, qui a bien voulu me faire l'honneur de présider le Jury de cette thèse. Jean Luc, merci pour ton expertise et tes conseils précieux sur ces dernières années de thèse.

Je remercie le Professeur Nicolas Magné et le Docteur Stéphane Supiot, qui ont accepté de juger ce travail et d'en être rapporteurs. Merci d'avoir accepté de consacrer du temps à ce travail et de vous être déplacés pour participer à la soutenance de cette thèse. Je tiens à vous témoigner toute ma gratitude et mon respect.

Je remercie le Professeur Philippe Maingon, mon maître, et le Professeur Guy Kantor qui ont accepté de participer au Jury de cette thèse et de la juger. Merci d'avoir accepté de consacrer du temps à ce travail et bien plus de temps encore à ma formation Je tiens à vous témoigner toute ma reconnaissance et mon respect.

Je souhaite exprimer ma gratitude à tous ceux qui m'ont encouragé à réaliser ce travail de recherche et ont aidé à le rendre possible acceptant bien souvent une charge de travail supplémentaire tant en clinique qu'au laboratoire : toute mon équipe à Gustave Roussy, les collègues et amis de l'hôpital Saint Louis et de l'INSERM1030, les amis de l'ESTRO pour leur aide, leurs conseils, et les discussions enrichissantes que nous avons eues sur ce projet et sur d'autres.

Je remercie également les patients qui ont accepté de participer à notre étude.

Merci à mes amis pour leur soutien moral et leur contribution en particulier Pierre, Cyrus, Jean, Stéphanie, Laurence, Sandrine et Chacha, Eleonor, Hanene, Michael (sans qui cette thèse n'aurait jamais commencée) Jérémy et Amandine (ma grande sœur).

Enfin et surtout, merci à ma famille, mes parents, ma sœur, mes amours Jérôme et Gabriel et mes beaux-parents pour leur amour, leur patience au quotidien, leurs encouragements, leur contribution et leur soutien sans faille sans lesquels je n'aurai jamais terminé ce travail.

TABLE DES MATIERES

Remerciements **3**
TABLE DES MATIERES **5**
LISTE DES FIGURES **9**
LISTE DES TABLEAUX **11**
DEFINITION DES ACRONYMES **13**
1 – INTRODUCTION **17**
1.1 Préambule : le concept d'épigénétique **17**
1.1.1 Méthylation de l'ADN et des histones : 19
1.1.2 Sumoylation : 21
1.1.3 Ubiquitination : 22
1.1.4 Acétylation et désacétylation des histones : 24
1.2 Épigénétique et cancer : **27**
1.3 HDACi en cancérologie : **29**
1.3.1 Développement et classification des HDACi : 30
1.3.2 Effets biologiques des HDACi : 31
1.3.2.1 HDACI et apoptose : 32
1.3.2.2 HDACI et arrêt du cycle cellulaire : 37
1.3.2.3 HDACi et angiogenèse tumorale : 41
1.3.2.4 HDACi, capacités invasives et métastases: 43
1.3.2.5 Immunité cellulaire 44
1.3.2.5.1 Immunité innée 45
1.3.2.5.2 Réponse immunitaire spécifique (adaptative) 45
1.3.2.5.3 HDACi et immunomodulation 46
1.3.3 Combinaison d'HDACi et d'autres drogues 51
1.3.3.1 HDACi et autres modulateurs de la transcription : 51
1.3.3.2 HDACi et chimiothérapies conventionnelles : 52
1.3.3.3 HDACi et ligands des récepteurs de mort : 53
1.3.3.4 HDACi et inhibiteurs de kinases : 54
1.3.3.5 HDACi et régulateurs de la dégradation par le protéasome: 55
1.3.3.6 HDACi et anti angiogéniques : 56
1.4 Place de la radiothérapie et concept de radiosensibilisation: 57
1.4.1 Mécanismes d'action des rayonnements ionisants : 58
1.4.1.1 Dommages des protéines 59
1.4.1.2 Dommages des lipides 59
1.4.1.3 Dommages de l'ADN 60
1.4.1.3.1 Les cassures simple et double brin de l'ADN 61
1.4.1.3.2 Les dommages du cytosquelette de l'ADN 63
1.4.2 Mécanismes de réparation des dommages 63
1.4.2.1 La recombinaison homologue 64
1.4.2.2 La réparation par suture non homologue (NHEJ) 66
1.4.2.3 La réversion du dommage in situ 68
1.4.2.4 La réparation des mésappariements de bases 69
1.4.2.5 Le système de réparation par excision de bases (BER) 71
1.4.2.6 La réparation par excision de nucléotides (NER) 72
1.4.3 Mécanismes de mort cellulaire après irradiation 74
1.4.3.1 Mort mitotique ou catastrophe mitotique 75
1.4.3.2 Apoptose 77
1.4.3.3 La sénescence 79
1.4.3.4 L'autophagie 80
1.4.3.5 La nécrose 81
1.4.3.6 L'entose ou cannibalisme cellulaire 82

1.4.3.7 La mort immunogénique 82
1.4.4 Concept de radiosensibilisation 82
1.4.5 Modulation de la radiosensibilité 87
1.4.5.1 Hypoxie tumorale et modulation de la radiosensibilité 87
1.4.5.2 HDACi et modulation de la radiosensibilité 89
1.4.5.3 Effet radio sensibilisant du cisplatine 90
1.5 Cancer bronchique non à petites cellules 92
2 – OBJECTIFS 94
3 – PRESENTATION DES TRAVAUX 96
3.1 Evaluation de la modulation de la radiosensibilité tumorale par l'abexinostat in vitro et in vivo 96
3.1.1 Rationnel 96
3.1.2 Résultats (données partiellement soumises à Oncotarget, en révision mineure sous la référence n° #018532) 97
3.1.2.1 L'Abexinostat radio sensibilise les cellules de CBNPC *in vitro* en normoxie et en hypoxie 97
3.1.2.2 L'Abexinostat induit l'apoptose des cellules de CBNPC *in vitro* en normoxie et majore l'apoptose radio-induite 105
3.1.2.3 L'apoptose des cellules H460 induite par l'abexinostat est caspase dépendante et implique la voie mitochondriale 109
3.1.2.4 L'abexinostat augmente le nombre et la persistance des cassures double brin de l'ADN (CDB) induites par l'irradiation dans les cellules H460 113
3.1.2.5 L'abexinostat diminue la signalisation et la réparation des dommages de l'ADN induits par l'irradiation dans les cellules H460 115
3.1.2.6 L'abexinostat potentialise le retard de croissance tumorale en combinaison avec différentes modalités thérapeutiques avec une toxicité acceptable in vivo dans des modèles de CBNPC 119
3.1.2.7 Evaluation de l'effet de la combinaison abexinostat et irradiation sur les tissus sains pulmonaires *in vivo* 127
3.2 Evaluation de la toxicité et de la tolérance de la combinaison abexinostat et radiothérapie chez l'homme dans le cadre d'un essai de phase I (données soumises à Oncotarget, en révision sous la référence n° #018377) ... 131
3.2.1 Rationnel 131
3.2.2 Résultats 131
3.2.2.1 Patients de l'étude 131
3.2.2.2 Etude d'efficacité 135
3.2.2.3 Etude de la toxicité 137
3.2.2.3.1 Dose maximale tolérée (MTD) et toxicité dose limitante (DLT) 137
3.2.2.3.2 Effets secondaires 138
4 – DISCUSSION ET PERSPECTIVES 141
5 – CONCLUSION 151
6 – REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 152
ANNEXE 1 - MATERIELS ET METHODES 182
Réactifs, lignées cellulaires et anticorps 182
Milieux, conditions de culture et irradiation 182
Sensibilité aux agents pharmacologiques 183
Tests clonogéniques 183
Analyse du cycle cellulaire 184
Western blots 185
Immunofluorescence 185
Xénogreffes tumorales 186
Etude histologique et immunohistochimique 187
Modèles de fibrose pulmonaire radio induite 187
Etude de phase I 188
Méthode statistique 190
ANNEXE 2 - ARTICLES 192
Articles acceptés pour publication (Oncotarget) 192

- "Time dependent modulation of tumor radiosensitivity by a pan HDAC inhibitor : abexinostat" 192
- "A phase I dose-escalation study of the oral histone deacetylase inhibitor abexinostat in combination with standard hypofractionated radiotherapy in advanced solid tumors" 210

Articles publiés 226

- "PhaseI trial of everolimus in combination with thoracic radiotherapy in non-small-cell lung cancer" 227
- "New challenge of developing combined radio-drug therapy" ... 234
- "Cellules souches cancéreuses : nouvelle cible thérapeutique dans le traitement des cancers broncho-pulmonaires" 242
- "Thérapies ciblées et radiothérapie dans les cancers bronchiques non à petites cellules" 253
- "Lung Cancer Stem Cell : New Insights on Experimental Models and Preclinical Data" 263

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Régulation de l'activité transcriptionnelle par la structure conformationnelle de la chromatine (1)....18
Figure 2 : Modifications épigénétiques par méthylation de l'ADN et conséquences en cancérologie (8)....20
Figure 3 : Un faible niveau de sumoylation de facteurs de transcription peut entraîner une répression de l'expression des gènes cibles de ces facteurs (10)....21
Figure 4 : - Schéma du protéasome 26S (13)....24
Figure 5 : Représentation schématique du concept de létalité synthétique (31)....28
Figure 6 : Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose (66)....33
Figure 7 : Effet pro apoptotique des HDACi sur les cellules cancéreuses (45)....35
Figure 8 : cycle cellulaire des cellules de mammifère normale et comparaison avec les cellules cancéreuses (78)....38
Figure 9 : Angiogenèse tumorale (107)....42
Figure 10 : Effets de l'inhibition des histones désacétylases sur les protéines non histone (45)....50
Figure 11 : Voies de signalisation du VEGF dans la cellule endothéliale (210)....57
Figure 12 : Radiolyse de l'eau....58
Figure 13 : Représentation schématique des lésions de l'ADN induites par les effets directs et indirects des rayonnements ionisants (adapté de C. Prouillac, schéma non publié)....61
Figure 14 : Principaux dommages radio induits de l'ADN et leurs spécificités (217)....62
Figure 15 : Lésions de l'ADN et systèmes de réparation (220)....64
Figure 16 : Schématisation de la réparation par recombinaison homologue (213)....65
Figure 17 : Schématisation de la réparation par suture non homologue (NHEJ) (213)....67
Figure 18 : Schéma hypothétique du système de réparation par réversion du dommage in situ (213)....69
Figure 19 : Schéma hypothétique des étapes de la réparation des mésappariements de bases (213)....70
Figure 20 : Réparation par excision de bases (213)....71
Figure 21 : réparation par excision de nucléotides (213)....73
Figure 22 : Mort mitotique après irradiation (268)....76
Figure 23 : Voies de signalisation de l'apoptose (284)....79
Figure 24 : Coopération spatiale et moléculaire conduisant à une radiosensibilisation (106)....84
Figure 25 : Stratégies de combinaison à la radiothérapie développées pour augmenter l'efficacité anti tumorale de la radiothérapie (315)....86
Figure 26 : L'abexinostat inhibe la prolifération des cellules tumorales en normoxie (O^2=21%)....97
Figure 27 : L'abexinostat combiné à l'irradiation inhibe la survie clonogénique des cellules tumorales en normoxie (O^2 = 21%)....98
Figure 28 : Le panobinostat (LBH 589) combiné à l'irradiation inhibe la survie clonogénique des cellules tumorales en normoxie (O^2 = 21%)....99
Figure 29 : L'abexinostat combiné à l'irradiation inhibe la survie clonogénique des cellules tumorales en hypoxie (O^2 = 0.1%)....99
Figure 30 : modélisation linéaire quadratique des courbes de survie clonogénique en normoxie et hypoxie pour A549 et H460....101
Figure 31 : Effet supra-additif de la combinaison irradiation et abexinostat sur les cellules de CBNPC *in vitro* en conditions hypoxiques....102
Figure 32 : L'effet radio sensibilisant de l'abexinostat combiné à l'irradiation dépend de la séquence thérapeutique : Absence d'effet radio sensibilisant de la combinaison concomitante sur les cellules tumorales en normoxie (O^2 = 21%)....103
Figure 33 : Activité HDAC inhibitrice de l'abexinostat en normoxie: augmentation du niveau de l'histone H3 acétylé....104

Figure 34 : L'augmentation d'expression d'HIF1-alpha confirme la validité de nos conditions expérimentales hypoxiques 104
Figure 35 : Activité HDAC inhibitrice de l'abexinostat en hypoxie: augmentation du niveau de l'histone H3 acétylé 105
Figure 36 : L'abexinostat induit une augmentation concentration dépendante de la population de H460 en subG1 106
Figure 37 : L'abexinostat induit une augmentation concentration dépendante de l'apoptose des cellules H460 108
Figure 38 : L'apoptose induite par l'abexinostat est caspase dépendante 110
Figure 39 : L'apoptose induite par l'abexinostat est médiée par la dépolarisation mitochondriale et l'activation de la caspase 3 112
Figure 40 : L'abexinostat augmente le niveau d'expression de la caspase 3 clivée 112
Figure 41 : L'abexinostat majore les CDB radio-induites de manière prolongée 114
Figure 42 : L'abexinostat augmente l'expression de phospho-H2AX de manière prolongée 115
Figure 43 : L'abexinostat diminue l'expression de MRE11, NBS1 et Rad51 de manière temps et dose dépendante 116
Figure 44 : L'abexinostat réduit le nombre de foci Rad51radio-induits 118
Figure 45 : Schéma de traitement de la combinaison abexinostat et radiothérapie 119
Figure 46 : Suivi du poids des souris 120
Figure 47 : L'abexinostat induit un retard de croissance tumorale et majore l'effet anti tumoral de l'irradiation 121
Figure 48 : L'abexinostat améliore la survie des souris porteuses de tumeur A549 et H460 traitées par radiothérapie +/- abexinostat 123
Figure 49 : Schéma de traitement de la combinaison abexinostat +/- cisplatine +/- radiothérapie 124
Figure 50 : Suivi du poids des souris lors de la combinaison abexinostat +/- cisplatine +/- radiothérapie 125
Figure 51 : L'abexinostat majore l'effet anti tumoral de la combinaison irradiation et cisplatine 126
Figure 52 : Effet de la triple combinaison par abexinostat, cisplatine et irradiation sur la survie des souris porteuses de tumeur A549 127
Figure 53 : Schéma de traitement du modèle d'évaluation de la fibrose pulmonaire radio induite 128
Figure 54 : Suivi du poids des souris lors de la combinaison abexinostat +/- radiothérapie 128
Figure 55 : Effet de l'abexinostat sur les tissus sains pulmonaires 10 semaines après traitement par abexinostat +/- irradiation thoracique 129
Figure 56 : Effet de l'abexinostat sur les tissus sains pulmonaires 22 semaines après traitement par abexinostat +/- irradiation thoracique 130
Figure 57 : Schémas de traitement de l'étude de phase I de combinaison abexinostat et radiothérapie 132
Figure 58 : Les modifications covalentes des histones et de l'ADN sont des mécanismes clé de la régulation épigénétique de l'expression des gènes (440) 148

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Famille des HDAC : classification, localisation et principaux substrats (21) .26
Tableau 2 - Statut d'avancement clinique des principaux HDAC inhibiteurs (17) 30
Tableau 3 - Effet immunomodulateur des HDACi (161) 49
Tableau 4 - Estimation des paramètres α et β en conditions normoxique et hypoxique pour A549 et H460 100
Tableau 5 - Répartition du nombre de patients selon chaque schéma de traitement et selon chaque groupe en fonction du site irradié 133
Tableau 6 - Caractéristiques de la population de l'étude dans les schémas de traitement 1 et 2.....134
Tableau 7 - Statut de complétude de l'étude par schéma de traitement 135
Tableau 8 - Meilleure réponse globale et locorégionale par schéma de traitement 136
Tableau 9 - Meilleure réponse globale et locorégionale par groupe de traitement (sus ou sous diaphragmatique).....137
Tableau 10 - DLT en fonction des niveaux de dose et des groupes de radiothérapie (sus ou sous diaphragmatique).....138
Tableau 11 - Aperçu des effets secondaires fréquents (> 10 %) et de grade ≥ 3 chez plus d'un patient.....139

DEFINITION DES ACRONYMES

17-AAG	17-allyl-aminodemethoxy geldanamycine
53BP1	P53-binding protein 1
AACR	American Association for Cancer Research
AE	Effet secondaire (Adverse Event)
a-GalCer	a-galactosylceramide (agent inducteur de l'IFNγ)
AGPI	Acides gras polyinsaturés
AIF	Facteur inductible d'apoptose (Apoptosis inducible factor)
AML	Leucémies myéloïdes aigues
ADN	Acide désoxyribo nucléique
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
Apaf1	Apoptotic protease activating factor 1
APC	Cellule présentatrice d'antigène (antigen-presenting cells)
APL	leucémie aigüe promyelocytaire (acute promyelocytic leukaemia)
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosine triphosphate
ATR	Rad3-related protein
ATRA	Acide trans-rétinoïque
BAD	Bcl2-associated agonist of death
Bax	Bcl2-like protein
BER	Système de réparation par excision de bases (base excision repair)
BET	Protéines constituées de 2 bromodomaines et d'un domaine extra-terminal
BID	BH3-interacting domain
BRCA	Breast Related Cancer gene
CARD	Domaines de reconnaissance des caspases (Caspase recognition domains)
CBNPC	Cancer bronchique non à petites cellules

CDB	Cassures double brin
CHK2	CSK-homologous kinase 2
CPP	Comité pour la protection des patients
CR	Réponse complète
CTCAE	Common Toxicity Criteria for Adverse Events
CTL	cytotoxic T lymphocytes
DAMP	Molécules particulières associées aux dommages (damage-associated molecular patterns)
DC	Cellules dendritiques
DISC	Complexe de signalisation inducteur de mort (Death-inducing signaling complex)
DIOC6	3.3' dihexyloxacarbocyanine iodide
DLT	Toxicités doses-limitantes
DSBR	Double-strand break repair
EBCTCG	Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group
FADD	Domaines de mort associés à Fas (Fas-associated death domain)
FAK	Focal adhesion kinase
FLT-3	Fms-like tyrosine kinase 3
GGT	Gamma glutamyl transférases
GVHD	Maladie aigüe du greffon contre l'hôte (acute graft-versus-host disease)
Gy	Gray
HDAC	Histone désacétylase
HDACi	Histone désacétylase inhibiteur
HIF-1	Facteur inductible en hypoxie (Hypoxia Inducible Factor)
HNPCC	Cancer colorectal non polyposique héréditaire (heredetary non polyposis colorectal cancer)
Hsp90	Protéine Heat shock 90
IAP	Inhibiteur d'apoptose
IKKβ	Protéine kinase β IκB

IL-1	Interleukine 1
IL-12	Interleukine 12
IFNγ	Interferon-γ
IP	Intrapéritonéale
LAM	Leucémies aiguës myéloblastiques
LMC	Leucémie myéloïde chronique
MGMT	O6-methylguanine DNA methyltransférase
MHC	Complexe majeur d'histocompatibilité (Major histocompatibility complexe)
MICA	MHC class I polypeptide-related sequence A
MICB	MHC class I polypeptide-related sequence B
MMR	Missmatch repair
MRN	Complexe formé de la nucléase Mre11, l'ATPase RAD50 et la protéine NBS1
MTD	dose maximum tolérée
NF-κB	Facteur nucléaire κB (nuclear factor-κB)
NHEJ	Système de réparation par suture non homologue (non homologous end-joining)
NK	Natural Killer
NKG2D	Protéine du groupe 2D à la surface des cellules « natural killer »
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Oxyde nitrique synthase
PI	Iodure de propidium (propidium iodide)
PIPE	Product of Independent beta Probabilities dose Escalation
PKC	Protéine kinase de type C
PLCγ	Phospholipase C gamma
PML	Gène de la leucémie promyélocytaire
PR	Réponse partielle
PUMA	Modulateurs de l'apoptose régulé positivement par p53 (p53 upregulated modulator of apoptosis)

RAR-alpha	Récepteur alpha de l'acide rétinoïque (RAR-α)
RECIST	Revised Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RH	Recombinaison homologue
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène (Reactive oxygen species)
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
SAE	Effet indésirable grave (Serious adverse events)
SDSA	Synthesis-dependent strand annealing
SER	Sensitization enhancement ratio
SF6	Fraction survivante à 6 Gy
SMAC	Second mitochondria-derived activator of caspases
STAT1	Gène codant pour la protéine transductrice du signal et activatrice de la transcription 1 (Signal transducer and activator of transcription 1)
STAT3	Gène codant pour la protéine transductrice du signal et activatrice de la transcription 1 (Signal transducer and activator of transcription 3)
TAA	Tumor associated antigen
TAM	Tumor associated macrophage
TLR	Récepteur Toll-like
TNF-α	Facteur α de nécrose tumorale (Tumor necrosis factor alpha)
TNK	Lymphocyte T « Natural Killer »
TRAIL	ligand inducteur d'apoptose liée au TNF (TNF-related apoptosis-inducing ligand)
Tregs	Lymphocytes T régulateurs
XIAP	Protéine inhibitrice d'apoptose liée à X (X-linked inhibitor of apoptosis protein)
XRCC4	X-ray cross complementing 4

1 – INTRODUCTION

1.1 PREAMBULE : LE CONCEPT D'EPIGENETIQUE

La génétique à elle seule ne permet pas d'expliquer toute la diversité des phénotypes au sein d'une population. Elle ne permet pas non plus d'expliquer comment, avec des séquences d'ADN identiques, des jumeaux monozygotes peuvent avoir des phénotypes différents ou des susceptibilités différentes aux maladies et en particulier aux cancers. Le concept d'épigénétique apporte une explication partielle de ces phénomènes. Les modifications épigénétiques font partie des phénomènes de modulation de l'expression génique les plus étudiés. En effet, ces modifications n'altèrent pas la composition de l'ADN mais uniquement la régulation de l'expression et sont, par nature, des phénomènes réversibles sans altération inscrite dans le code génétique. Leur caractère réversible en fait des cibles thérapeutiques de choix. De plus, ces mécanismes sont fréquemment dérégulés dans différents types tumoraux. Les mécanismes de régulation épigénétique les plus étudiés sont l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation. Ces mécanismes conduisent à une modification de la structure des nucléosomes qui impacte la condensation de la chromatine, la conformation de l'ADN et la transcription. En effet, la structure de la chromatine est un facteur déterminant pour l'expression des gènes. L'ensemble du génome humain est comme empaqueté dans la chromatine qui est un complexe macromoléculaire dynamique qui comporte l'ADN, les histones et les protéines non-histones. Les nucléosomes sont les unités de base de la chromatine et sont constitués d'ADN enroulée autour d'octamères d'histones formés par 4 histones partenaires : un tétramère d'histones H3-H4 et deux dimères d'histones H2A-H2B. L'histone H1 lie et stabilise l'ensemble. La structure dynamique du nucléosome définie ainsi différent niveau d'organisation de la chromatine et par conséquent différents niveaux d'expression et d'activité des gènes codés par l'ADN au sein de ces nucléosomes (1). La chromatine existe sous forme d'hétérochromatine qui est intensément compactée et transcriptionnellement inactive ou sous forme d'euchromatine où les nucléosomes sont moins compacts et arrangés de manière plus linéaire, ce qui lui confère une structure plus ouverte et accessible à la transcription.

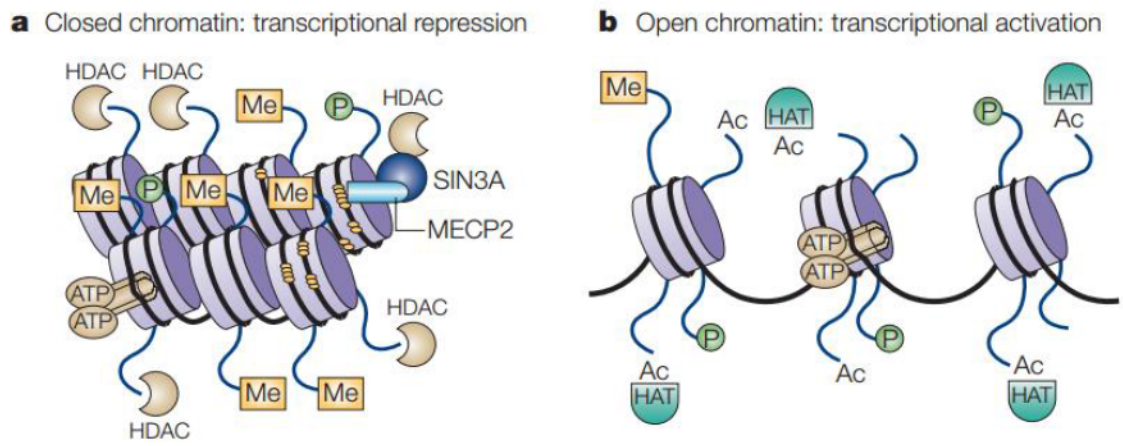


Figure 1 : Régulation de l'activité transcriptionnelle par la structure conformationnelle de la chromatine (1)

L'ADN est représenté par la ligne noire. Les octamères d'histones sont représentés par les cylindres mauves. Les modifications post traductionnelles sont représentées par Me pour la méthylation, P pour la phosphorylation et Ac pour l'acétylation sur les queues des histones (lignes bleues). Les régulateurs ATP dépendants de la structure du nucléosome sont représentés par un cylindre avec 2 ATP associés. Les histones acétyl tansférases (HAT) et les histones désacétylase (HDAC) sont représentées respectivement en bleu et gris. Les protéines se liant aux groupes méthyl comme la « Méthyl-CpG binding protein » (MECP2) cible l'ADN méthylé et recrute les HDACs. La méthylation de l'ADN et la désacétylation des histones induisent une conformation compactée et une répression de la transcription (Figure 1 a). A l'inverse, l'acétylation des histones et la déméthylation de l'ADN permettent une relaxation de l'ADN, avec une conformation plus relâchée qui permet l'activation de la transcription (Figure 1 b).

Les modifications épigénétiques comme la méthylation de l'ADN ou l'acétylation des histones sont connues pour leur impact sur l'expression des gènes. Il existe d'autres formes de régulation de la structure du nucléosome par phosphorylation, sumoylation et ubiquitination des queues d'histones. De plus, la structure de la chromatine peut également être régulée par des complexes protéiques qui utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour repositionner les nucléosomes en les faisant « glisser » le long de l'ADN. Il existe des régulateurs de la chromatine ATP dépendants, initialement identifiés comme des facteurs provoquant l'activation de gènes. Actuellement, il est établi que ces régulateurs peuvent coopérer avec les histones acétyl transférases (HAT) ou les histones désacétylases (HDAC) et donc avoir un rôle contributif dans l'expression ou la répression de la transcription de gènes. La chromatine peut donc être remodelée par l'activité propre d'enzymes modifiant les queues des histones, ainsi que par des facteurs régulateurs du remodelage ATP dépendants. Les liens fonctionnels et biochimiques entre les facteurs régulateurs ATP dépendants et les HAT, les facteurs répresseurs et les HDAC, la méthylation et les HDAC indiquent que différents signaux de régulation peuvent cibler des voies moléculaires communes

pour induire ou réprimer l'expression de gènes. Il est aujourd'hui clairement démontré (2, 3) que ces modifications peuvent induire une répression de l'expression (« silencing ») de certains gènes ou, au contraire, une surexpression d'autres gènes. Bien que certaines régions du génome aient été identifiées comme sujettes aux modifications épigénétiques responsables de ces variations d'expression, les mécanismes déclencheurs de ces modifications épigénétiques demeurent inconnus. Toutefois, la position et la conformation de la chromatine dans le noyau semble avoir une importance clé (2).

1.1.1 Méthylation de l'ADN et des histones :

La méthylation de l'ADN est un processus épigénétique très étudié par lequel un groupe méthyl est ajouté sur l'ADN, ce qui provoque des modifications fonctionnelles. Lorsque la méthylation a lieu sur la région promotrice d'un gène, elle induit le plus souvent une répression de la transcription de ce gène, le rendant « silencieux ». Chez les eucaryotes, l'ADN ne peut être méthylé que sur des cytosines. L'ADN peut être méthylé sur la position C5 d'une cytosine principalement au sein de dinucléotides cystosine-phosphate-guanine (CpG) ou d'îlots de CpG (CGI) par les ADN méthyl transférases DNMT1, DNMT3A et DNMT3B (1, 4). De plus, ces enzymes peuvent recruter directement des histones désacétylases (HDAC) entraînant une désacétylation qui contribue également à une répression transcriptionnelle. Les CGI méthylés sont fixés par les « methyl-CpG binding proteins » comme MECP2, MBD1, MBD2 et MBD3, qui peuvent recruter des HDAC et des facteurs régulateurs du remodelage de la chromatine dépendants de l'ATP pour donner une structure compacte (Figure 1 a). Lorsque la méthylation se fait au niveau d'une région promotrice d'un gène, elle agit principalement comme un répresseur de transcription de ce gène. Dans le développement humain, la méthylation de CGI est par exemple requise pour l'inactivation du chromosome X mais, comme nous le verrons ultérieurement, ce mécanisme ou sa dérégulation sont également impliqués dans de nombreuses pathologies et en particulier en cancérologie (5). La réalisation récente d'une cartographie des sites de méthylation du génome entier a montré que les régions régulatrices pauvres en CG ont généralement un taux bas de méthylation, lorsque ces sites sont occupés par des facteurs de transcription. Ces niveaux variables de méthylation reflètent les changements de niveau d'expression des gènes. Par conséquent, les données du méthylome sont une importante source d'information sur l'activité des gènes. Les profils de méthylation de l'ADN pourraient ainsi servir de marqueurs biologiques car un biomarqueur est défini par sa capacité à prédire l'évolution d'une pathologie ou la réponse au traitement, indépendamment du fait que le paramètre mesuré ait un lien de causalité ou non. L'étude des niveaux de méthylation ne nécessite pas de cellule vivante, elle requiert des quantités d'ADN faibles et peut être réalisée dans tous les laboratoires de séquençage du génome, ce qui en fait une technique particulièrement accessible. Toutefois l'hétérogénéité cellulaire au sein d'un prélèvement tissulaire reste un facteur confondant limitant. Mais dans certains types tumoraux comme le médulloblastome, l'analyse des niveaux de méthylation dans les régions régulatrices à partir de prélèvements histologiques a tout de même permis l'identification de modifications

spécifiques de certains sous types tumoraux (6, 7). Il semble donc que la méthylation de l'ADN chez les mammifères reflète la régulation cellulaire intrinsèque en rapport avec la densité de CG sur l'ADN et les motifs de fixation de facteurs de transcription. Mais l'effet de la répression de CGI par méthylation pourrait bien être l'exception plutôt que la règle car les phénomènes d'inactivation et d'activation se produisent également à d'autres endroits du génome. Une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de ce phénomène est nécessaire pour comprendre les conséquences et l'impact des dérégulations de ces mécanismes en pathologie humaine.

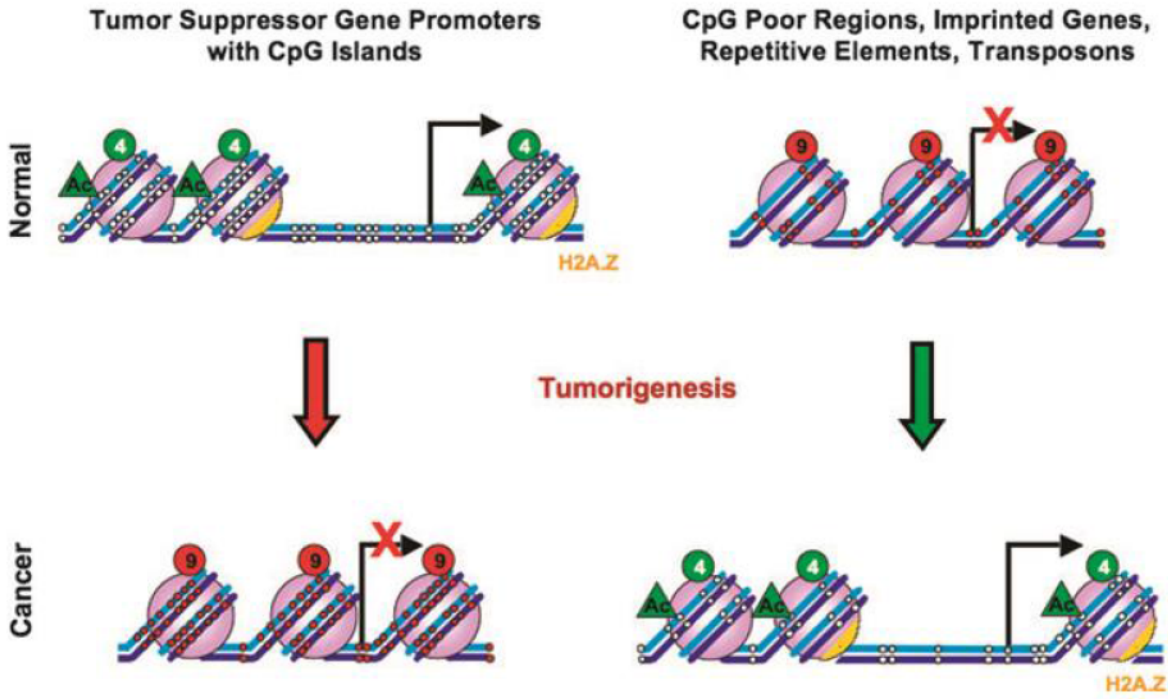


Figure 2 : Modifications épigénétiques par méthylation de l'ADN et conséquences en cancérologie (8)

Dans les cellules normales, les îlots de CpG au sein des promoteurs sont en général déméthylés. Lorsque ces promoteurs sont actifs comme dans le cas des gènes suppresseurs de tumeur, ils sont associés à des formes actives d'histones, comme l'acétylation des histones, et H3K4 méthylés (cercles verts portant le numéro 4), qui permettent une structure ouverte de la chromatine transcriptionnellement active. Toutefois, les cellules normales comportent également des régions d'ADN inter géniques pauvres en CpG, des éléments répétitifs, des transposons, ainsi que des gènes soumis à empreinte parentale dont, en général, l'une des 2 copies est totalement éteinte du fait d'une intense méthylation, alors que l'autre est active. Sur les promoteurs des gènes ainsi réprimés, on retrouve des histones sous forme « répressive » comme l'histone H3K9 méthylée (cercles rouges portant le numéro 9), qui confèrent un état silencieux à la chromatine. Pendant la cancérogénèse, les promoteurs des gènes suppresseurs de tumeur comportant des îlots de CpG sont méthylés, ce qui confère une structure silencieuse à la chromatine et donc une répression aberrante (indiquée par la flèche rouge). Contrairement à cela, les régions d'ADN inter géniques pauvres en CpG, les éléments répétitifs, les transposons, ainsi que les gènes soumis à

empreinte sont hypométhylés, ce qui aboutit à une activation aberrante (indiquée par une flèche verte).

1.1.2 Sumoylation :

La sumoylation est une modification post-traductionnelle aboutissant à la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO (« small ubiquitin-related modifier ») sur un résidu lysine d'une protéine cible. À ce jour, quatre protéines SUMO ont été caractérisées (SUMO-1, -2, -3 et -4). Le processus de sumoylation est très proche biochimiquement de celui de l'ubiquitination, notamment en impliquant une cascade similaire d'enzymes. En revanche, alors que l'ubiquitination entraîne principalement la dégradation de la protéine ciblée par le protéasome, la sumoylation semble plutôt réguler les propriétés biochimiques des protéines cibles (trafic intracellulaire, interaction protéique, interaction ADN-protéine, activité transcriptionnelle...). De plus, quelques exemples démontrent que la sumoylation de certaines protéines inhibe leur ubiquitination (9, 10).

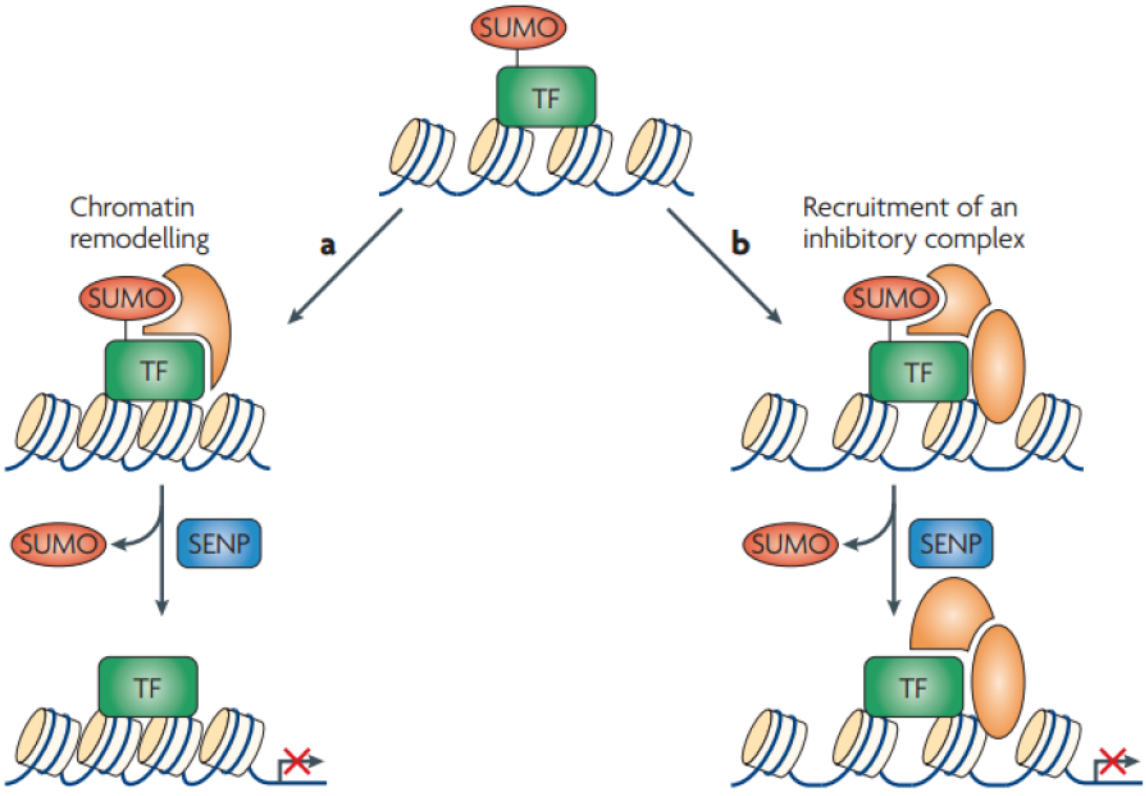


Figure 3 : Un faible niveau de sumoylation de facteurs de transcription peut entraîner une répression de l'expression des gènes cibles de ces facteurs (10)

a/ La sumoylation d'un facteur de transcription (TF en vert) peut permettre le recrutement d'effecteurs répresseurs sous-jacents, qui agissent enzymatiquement sur l'état de la chromatine (comme par exemple des facteurs régulateurs du remodelage de la chromatine). Après désumoylation par des peptidases spécifiques de SUMO (« sentric-specific proteases : SENPs), des modifications de la chromatine induisant une répression de l'expression peuvent persister comme par exemple une désacétylation.

b/ La sumoylation d'un facteur de transcription peut initier le recrutement de facteurs inhibiteurs sur le promoteur. Après la formation d'un complexe répresseur stable, SUMO peut être retiré par SENP, sans affecter le complexe.

Le processus de sumoylation met en jeu une série de trois étapes enzymatiques.

La première étape, nommée maturation, correspond au clivage de la partie C-terminale de la protéine SUMO. Elle est assurée par des enzymes carboxy-hydrolases et engendre l'exposition du dipeptide de glycines (GG) de SUMO pour l'enzyme d'activation E1.

La deuxième étape est dite d'activation et consiste en la création d'un lien thioester de haute énergie (étape ATP-dépendante) entre SUMO-GG et la cystéine catalytique de l'enzyme E1 activatrice (hétérodimère SAE1/SAE2).

La troisième étape est la conjugaison du SUMO «activé» (SUMO-GG), qui est transféré de l'enzyme E1 à la cystéine catalytique de l'enzyme de conjugaison E2 (Ubc9). Ici encore, il existe une différence majeure avec l'ubiquitination puisque, à ce jour, Ubc9 est la seule enzyme de conjugaison E2 caractérisée pour la sumoylation, alors qu'il existe de multiples E2 pour l'ubiquitination.

Contrairement à l'ubiquitination qui nécessite l'intervention d'enzymes de type E3 ligases *in vitro*, Ubc9 est capable d'interagir et de modifier directement les substrats protéiques ciblés. Ainsi, Ubc9 peut aussi jouer le rôle de ligase. Néanmoins, de nombreuses enzymes du type E3 ligases ont été récemment caractérisées pour SUMO. Celles-ci semblent favoriser le processus de sumoylation, en stabilisant la formation du complexe UBC9/substrat. À ce titre, les SUMO-E3 ligases sembleraient particulièrement déterminer une certaine spécificité de substrat *in vivo*.

1.1.3 Ubiquitination :

L'ubiquitination est un processus de modification post traductionnelle multi-étapes, qui aboutit à la fixation covalente d'une ou plusieurs protéines ubiquitine sur un ou plusieurs résidus lysine de la protéine ubiquitinée. Ce phénomène, rapide et dynamique, modifie la fonction et le

devenir de la protéine substrat. En effet, l'ubiquitination a pour principale conséquence d'entraîner la dégradation par le protéasome de la protéine ubiquitinée. Le système Ubiquitination-protéasome (UPS) est essentiel à la régulation de nombreuses voies de signalisation et de nombreux mécanismes biologiques comme la réparation de l'ADN, l'endocytose, l'autophagie, la transcription, la réponse immunitaire et l'inflammation (11, 12). La spécificité des signaux induits par l'ubiquitination est due à la capacité de l'ubiquitine à former des monomères et différents types de polymères (chaînes d'ubiquitines), capables d'interagir avec les protéines récepteurs de l'ubiquitine (« ubiquitin-binding proteins : UBP »), qui décodent le signal présenté par les protéines ubiquitinées et induisent le déclanchement de cascades biochimiques dans la cellule. Ainsi, l'ubiquitine peut former 8 différents types de chaînes d'ubiquitines, liées sur leurs résidus lysine (K) (K6, K11, K27, K29, K33, K48, et K63) ou sur leur partie N-terminale. Un niveau supplémentaire de complexité est obtenu par la possibilité de former des chaînes de polyubiquitines utilisant des liaisons identiques (homotypiques) ou mixtes (hétérotypiques). Chaque type de chaîne de polyubiquitine induit des signaux intracellulaires différents, devant être identifiés spécifiquement et décodés par des protéines récepteurs « UBP », pour permettre l'activation des différents mécanismes intracellulaires qui lui sont propres (13).

L'exemple le plus classique du rôle de l'ubiquitination est celui de la dégradation par le protéasome des protéines liées à des chaînes de polyubiquitines-K48, alors que les protéines liées aux chaînes de polyubiquitines-K63 sont impliquées dans des voies biologiques ne faisant pas intervenir le protéasome, comme par exemple la réparation de l'ADN ou le système endosome-lysosome. La dégradation des protéines intracellulaires solubles est principalement médiée par le protéasome 26S. Le protéasome est un complexe protéique de 2.5MDa qui comprend une chambre cylindrique 20S, où a lieu la protéolyse, et un complexe régulateur 19S, qui se lie aux protéines polyubiquitinées et régule leur entrée dans la chambre catalytique 20S. Grâce à ses 6 sous-unités ATPase, le complexe 19S catalyse l'ouverture de la chambre 20S, le déploiement de la protéine ubiquitinée et sa translocation à l'intérieur de la chambre protéolytique 20S. Les substrats polyubiquitinés sont alors reconnus, étroitement liés et efficacement dégradés par le protéasome 26S, selon un processus multi-étapes intégré. L'étape initiale est ATP dépendante et est facilement réversible. Il s'agit d'une étape de liaison de la protéine ubiquitinée qui se fait grâce à la forte affinité des sites récepteurs d'ubiquitine du complexe 19S (sous unités Rpn10 (S5a) et Rpn13) (14). Puis certaines chaînes sont liées plus fortement que d'autres et sont protéolysées par un processus nécessitant le déploiement d'un domaine de la protéine ubiquitinée et l'hydrolyse d'ATP. Les protéines sont désubiquitinées par une ou plusieurs enzymes de désubiquitination (DUB), associées au complexe 26S comme Usp14, Uch37, ou Rpn11 (15). Enfin, la protéine est déployée et transférée dans la chambre 20S qui a été ouverte.

Les chaînes de polyubiquitine K-48 sont reconnues comme le signal canonique pour la dégradation par le protéasome mais certaines études récentes suggèrent une capacité du protéasome à se fixer également aux protéines monoubiquitinées ou à d'autres types de chaînes polyubiquitinées.

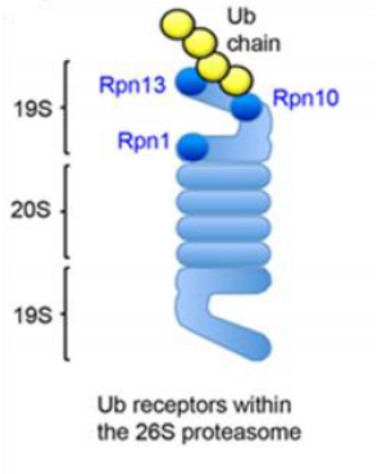


Figure 4 : - Schéma du protéasome 26S (13)

Ce schéma illustre la position du récepteur intrinsèque à l'ubiquitine sur le complexe 19S, en périphérie. Rpn10 et Rpn13 sont les principaux sites de haute affinité sur lesquels se fixent les protéines ubiquitinées.

1.1.4 Acétylation et désacétylation des histones :

L'acétylation et la désacétylation sont les mécanismes par lesquels un groupement acétyl est ajouté ou retiré aux résidus lysine de la queue N-terminale des histones. Ces mécanismes sont des éléments clés de la régulation de l'expression génique. Ces mécanismes sont catalysés par des enzymes aux activités « pro acétylante » : les histones acétyl transférases (HAT), ou « désacétylante » : les histones désacétylases (HDAC).

L'acétylation des histones est un processus actif régulé à la fois par la quantité relative et la localisation des HAT et des HDAC nucléaires (16). L'acétylation est une modification post-traductionnelle ; c'est un phénomène dynamique dont la demi-vie est inférieure à 15 minutes, ce qui nécessite un contrôle continu. L'acétylation des protéines induit une neutralisation de la charge des queues de lysine des histones. Les queues des histones se séparent alors du squelette de phosphodiester de l'ADN, du fait de sa charge négative. Ceci réduit l'encombrement stérique au niveau de l'ADN et permet l'accès de facteurs de transcription, ce qui crée un état de « transcription permissive » et favorise l'expression génique d'un locus spécifique (16).

La majorité des HAT identifiés chez l'homme fonctionne comme des co-activateurs de la transcription et sont recrutés sur la chromatine, par interaction avec des protéines capables de se lier à des séquences spécifiques de l'ADN. De nombreuses protéines de la famille p300/CBP (« p300/cyclic-AMPresponse-element binding protein ») peuvent jouer ce rôle. Les HAT sont classés en différentes familles, selon leurs similitudes de séquence et leurs substrats. Outre leur

activité d'acétylation des queues d'histone, les HAT ont également une fonction d'acétylation de facteurs transcriptionnels cellulaires, qui augmente généralement l'activité transcriptionnelle (Figure 1) (1).

Les HDAC fonctionnent de manière opposée aux HAT, en désacétylant les résidus lysine de la queue des histones et en induisant une répression de la transcription, associée à une condensation de la chromatine (Figure 1) (1). Par ailleurs, certains HDACs fonctionnent comme des lecteurs du code des histones. A ce jour, 18 protéines HDAC ont été identifiées chez l'homme. Elles peuvent être groupées en 4 classes, selon leur homologie de séquences avec les levures (17).

La classe I comporte les HDAC 1-2-3 et 8. Ces HDAC ont une homologie de séquence avec la levure Rpd3 et se localisent dans le noyau. Les HDAC de classe I comportent un seul domaine désacétylase à leur partie N terminale.

Les HDAC de classe II peuvent être subdivisés en 2 sous-classes : la sous classe Iia, comportant les HDAC 4-5-7 et 9, localisées dans le noyau et le cytoplasme, et la sous classe IIb, comportant les HDAC 6 et 10. L'HDAC6 est principalement localisée dans le cytoplasme et comporte 2 domaines catalytiques, alors que l'HDAC10 comporte un domaine fonctionnel N-terminal et un domaine C-terminal incomplet.

Les HDACs de classe III sont également nommées sirtuines (SIRT1–SIRT7). Elles sont les homologues de SIRT2, un facteur de répression de la transcription chez la levure, et diffèrent structurellement des autres classes. Elles nécessitent le NAD+ comme cofacteur. Ces protéines n'ont pas encore été extensivement étudiées chez les mammifères mais il a été récemment décrit que SIRT2 peut désacétyler p53 à son extrémité carboxy-terminale et inhiber l'apoptose et l'activation transcriptionnelle médiée par p53 (18, 19).

La classe IV contient un seul HDAC, l'HDAC11, avec un domaine catalytique partagé avec les HDAC de classe I et II.

Les HDAC de classe I, II et IV exercent leurs fonctions en faisant partie de larges complexes macromoléculaires, en association avec d'autres facteurs. Les HDAC1 et HDAC2 font partie des complexes mSin3A (complexe multi protéique de répression de la transcription), NURD (complexe multi protéique de remodelage du nucléosome) et Co-REST complexes, et l'HDAC3 est associé à N-CoR (corépresseur de récepteurs nucléaires) et SMRT (médiateur pour la répression des récepteurs aux hormones thyroïdiennes et rétinoïdes), alors que plusieurs protéines impliquées dans la voie de l'ubiquitine sont associées à l'HDAC6 (20). Il existe 11 HDAC zinc dépendants, qui font partie des classes I, II et IV.

Bien que les HDAC de classe I et II puissent désacétyler les queues des histones, il semble que d'autres protéines cellulaires puissent être la cible de différents HDAC. Par exemple, HDAC7, exprimé dans le cytoplasme, se lie au récepteur de l'endothéline-A, ce qui souligne la spécificité de substrat de différents HDAC, possiblement dépendante de leur localisation

subcellulaire. Le tableau suivant résume la classification de la famille des HDAC, leur localisation et leurs principaux substrats.

Tableau 1 - Famille des HDAC : classification, localisation et principaux substrats (21)

HDAC		Location	Substrates	Biological functions	Main HDAC inhibitor
Class	Member				
I	HDAC1	Nucleus	Histones, MEF2, GATA, YY1, NF-κB, DNMT1–SHP, ATM, MyoD, p53, AR, BRCA1, MECP2, pRb	Cell survival and proliferation	Valproic acid, vorinostat, TSA, RGFP1-36 (HDAC3)
	HDAC2	Nucleus	Histones, HOP, NF-κB, GATA2, BRCA1, pRb, MECP IRS-1	Insulin resistance; cell proliferation	
	HDAC3	Nucleus	Histones, HDAC4, 5, 7–9, SHP, GATA1, NF-κB, pRb	Cell survival and proliferation	
	HDAC8	Nucleus	HSP70	Cell proliferation	
IIa	HDAC4	Nucleocytoplasmic traffic	Histones, SRF, Runx2, p53, p21, GATA, FOXO, HIF-1α, SUV39H1, HP1, HDAC3, MEF2, CaM, 14-3-3	Regulation of skeletogenesis and gluconeogenesis	TSA, vorinostat, phenylbutyrate
	HDAC5	Nucleocytoplasmic traffic	Histones, HDAC3, YY1, MEF2, Runx2, CaM, 14-3-3	Cardiovascular growth and function; cardiac myocytes and endothelial cell function; gluconeogenesis	
	HDAC7	Nucleocytoplasmic traffic	Histones, HDAC3, MEF2, PML, Runx2, CaM, 14-3-3, HIF-1α	Thymocyte differentiation–endothelial function–gluconeogenesis	
	HDAC9	Nucleus	Histones, HDAC3, MEF2, CaM, 14-3-3	Thymocyte differentiation; cardiovascular growth and function	
IIb	HDAC6	Cytoplasm	α-tubulin, Cortactin, HSP90, HDAC11, SHP, PP1, Runx2, LcoR	Cell motility–control of cytoskeletal dynamics	Vorinostat, TSA, tubacin (HDAC6)
	HDAC10	Nucleocytoplasmic traffic	LcoR, PP1	Homologous recombination	
III	SIRT1	Nucleus	Histones, p53, p73, p300, NF-κB–FOXO, PTEN, NICD, MEF2, HIFs, SREBP-1c, β-catenin, PGC1α, Bmal, NF-κB, Per2, Ku70, XPA, SMAD7, Cortactin, Ku70, IRS-2, APE1, PCAF, TIP60, p300, AceCS1, PPARγ, ER-α, AR, LXR	Aging; redox control–cell survival–autoimmune system regulation	Nicotinamide (SIRT1), suramin (SIRT1 and SIRT2)
	SIRT2	Nucleus	Histones, α-tubulin	Cell survival–cell migration and invasion	
	SIRT3	Mitochondria	Histones, Ku70, IDH2, HMGCS2, GDH, AceCS, SdhA, SOD2, LCAD	Redox control	
	SIRT4	Mitochondria	GDH	Enegry metabolism	
	SIRT5	Mitochondria	Cytochrome c, CPS1	Urea cycle	
	SIRT6	Nucleus	Histone H3, TNF-α	Metabolic regulation	
	SIRT7	Nucleus	p53	Apoptosis	
IV	HDAC11	Nucleus	Histones, HDAC6, Cdt1	Immunomodulators–DNA replication	Sodium butyrate, TSA, vorinostat

AceCS, Acetylcoenzyme A synthetase; AR, Androgen receptor; ATM, Ataxia-telangiectasia-mutated; APE, Apurinic/apyrimidinic endonuclease-1; BRCA, Breast cancer; Bmal, Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)-like; CaM, Calmodulin; CPS1, Carbamoyl phosphate synthetase 1; DNMT, DNA methyltransferase; ER-α, estrogen receptor-α; FOXO, Forkhead box O; GATA, GATA binding protein; GDH, Glutamate dehydrogenase; HP1, Heterochromatin protein 1; HMGCS, Hydroxymethyl-glutaryl-CoA synthase; HOP, Homeodomain only protein; HIF, Hypoxia-inducible factor; HSP, Heat shock protein; IDH, Isocitrate dehydrogenase; IRS, Insulin receptor substrate; LCAD, Long chain acyl coenzyme A dehydrogenase; LcoR, ligand-dependent receptor co-repressor; LXR, Liver X receptor; MECP, Methyl-CpG-binding domain protein; MEF, myocyte enhancer factor; NICD, Notch1 intracellular domain; NF-κB, Nuclear transcription factor-kappa B; PCAF, p300/CBP-associated factor; Per-2, Period circadian protein homolog-2; PTEN, Phosphatase and tensin homolog; PGC, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator; PP1, Protein phosphatase; PPAR, Peroxisome proliferator-activated receptor; pRb, Retinoblastoma protein; PML, Promyelocytic leukaemia protein; Runx, Runt-related transcription factor; SdhA, Succinate dehydrogenase complex subunit A; SHP, Src homology region 2-domain-containing phosphatase; SOD, Superoxide dismutase; SUV39H1, Histone-lysine N-methyltransferase; SREBP, Sterol regulatory element-binding protein; TNF, tumor necrosis factor.

1.2 ÉPIGENETIQUE ET CANCER :

La répression ou l'activation inappropriée de l'expression de certains gènes par des mécanismes génétiques ou épigénétiques est un phénomène fréquent dans l'initiation et la progression de la cancérogénèse. En cancérologie, l'un des mécanismes épigénétiques les plus étudiés est la méthylation de l'ADN, en particulier au niveau des CpG comme nous l'avons vu précédemment (Figure 2). Ces régulateurs épigénétiques agissent de concert pour bloquer la transcription ou interférer avec les régions responsables du maintien de la conformation de la chromatine. L'équilibre entre la méthylation de l'ADN, les modifications des histones et la compaction des nucléosomes détermine si la transcription d'un gène particulier ou d'un groupe de gènes, situés dans une même région, est activée ou réprimée (22). Il existe de nombreux liens entre méthylation de l'ADN et modifications post-transcriptionnelles des histones. Les histones désacétylases sont fréquemment surexprimées dans les cellules cancéreuses conduisant à une hypo acétylation des histones et à une compaction de l'ADN, réprimant l'expression de gènes à proximité (1). Ces modifications épigénétiques peuvent conduire à la répression de gènes suppresseurs de tumeurs, indépendamment ou concomitamment de mutations ou de délétions génétiques. Ces modifications épigénétiques peuvent alors constituer le deuxième évènement déclencheur, selon le modèle du « two hit » proposé par Knudson *et al*. ou être considéré comme un déclencheur de létalité synthétique (8, 23).

La létalité synthétique est un concept décrit au début du 20ème siècle par les généticiens américain Calvin Bridges et Theodore Dobzhansky, à partir d'observations chez la mouche drosophile, où certains gènes non alléliques sont létaux uniquement en combinaison, bien que les parents homozygotes soient parfaitement viables (24). Le terme synthétique est ici utilisé pour son sens en grec ancien, qui signifie la combinaison de deux entités pour former quelque chose de nouveau. La létalité synthétique est donc définie comme un type d'interaction génétique, où la cooccurrence de deux évènements génétiques aboutit à la mort cellulaire et/ou à la mort de l'organisme hôte (25, 26). La létalité synthétique est un phénomène bien connu en cas de perte de fonction par mutation, mais elle peut aussi résulter de la combinaison d'autres altérations comme la surexpression de gènes, l'action d'un agent chimique ou un changement environnemental (27-30).

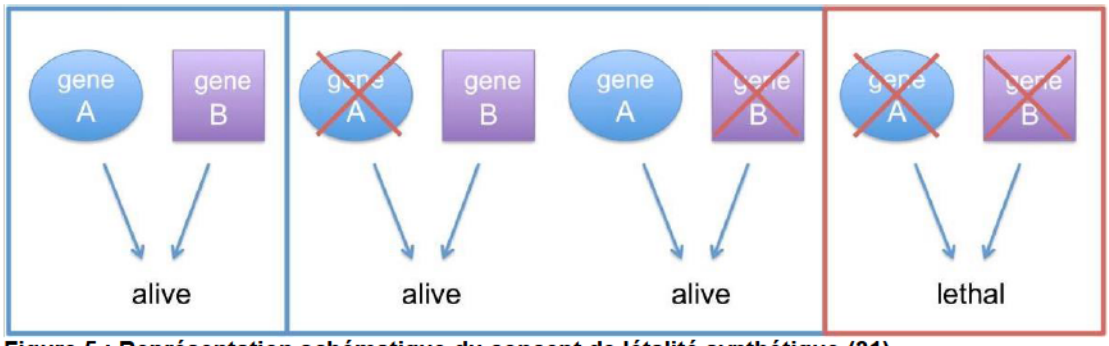


Figure 5 : Représentation schématique du concept de létalité synthétique (31)

Deux gènes sont considérés comme synthétiquement létaux seulement lorsque leur inactivation simultanée conduit à la mort cellulaire ou à la mort de l'organisme auquel ils appartiennent. Dans l'exemple schématisé ici, la délétion soit du gène A soit du gène B n'affecte pas la viabilité alors que l'inactivation des deux gènes en même temps est létale.

De plus, ces modifications épigénétiques peuvent aussi activer la cancérogénèse par activation d'oncogènes. Les mécanismes initiant ces phénomènes épigénétiques restent mal connus mais le dysfonctionnement de la régulation épigénétique fait partie des caractéristiques distinctives des cellules cancéreuses. La répression aberrante de gènes suppresseurs de tumeur ou de gènes régulant la prolifération cellulaire, par une combinaison d'hypo acétylation et d'hyper méthylation sur des régions promotrices, est responsable d'une perte des fonctions normales de contrôle cellulaire. Ainsi, l'état d'acétylation des histones est un déterminant crucial dans la régulation de la transcription de gènes clés de la prolifération cellulaire.

La cartographie complète du génome humain a permis d'identifier les modifications de la chromatine lors de la cancérogénèse. Ces études ont révélé une perte globale d'acétylation de lysines 16 et 20 des histones H4 (H4K16ac et H4K20me3) dans les cellules cancéreuses, à la différence des cellules non tumorales, faisant considérer cette perte d'acétylation comme une marque distinctive et caractéristique des cellules tumorales (32). Cette perte d'acétylation, médiée par les HDAC, provoque la répression des gènes concernés. Les HDAC sont fréquemment surexprimés dans différents types de cancers et, par conséquent, constituent une cible thérapeutique de choix (33, 34). Les HAT, qui travaillent de concert avec les HDAC pour maintenir le niveau d'acétylation, peuvent aussi être altérés en cancérologie. La formation aberrante de protéines de fusion par translocation de HAT et de gènes reliés aux HAT (comme MOZ, MORF, CBP et p300) est retrouvé dans certaines leucémies (35). Ces protéines de fusion délétères contribuent à l'altération globale du profil d'acétylation des histones.

En plus de ces altérations d'acétylation des histones, les cellules cancéreuses présentent une large variété de modifications des profils de méthylation des histones. Les altérations de méthylation en H3K9 et H3K27 sont associées à des répressions aberrantes de gènes dans différentes types de cancers (36, 37). La dérégulation des histones méthyl transférases est également responsable de répression aberrante de gènes suppresseurs de tumeur dans différents

types de cancers. Par exemple, EZH2, qui est l'histone méthyl transférase de H3K27, est surexprimée dans certains cancers du sein et de la prostate (37). Un niveau élevé d'expression de G9a, qui est l'histone acétyl transférase de H3K9, est retrouvé dans les cancers du foie et est impliqué dans le maintien du phénotype tumoral, possiblement par modulation de la structure de la chromatine (38, 39). Les évènements conduisant à ces modifications épigénétiques restent encore mal compris mais comme ces anomalies sont mitotiquement héritables, elles sont fréquemment retrouvées dans les cellules tumorales à forte prolifération.

De plus, les déméthylases lysine-spécifiques, qui travaillent de concert avec les histones méthyl transférases pour maintenir le profil global de méthylation, sont également impliquées dans la progression des cancers (40). LSD1, la première lysine déméthylase identifiée, est capable de supprimer à la fois des signaux activateurs et répresseurs comme H3K4 et H3K9, selon le partenaire auquel elle se lie (41, 42). Ces partenaires agissent alors comme un co-répresseur ou un co-activateur. Après LSD1, plusieurs autres lysines déméthylases ont été identifiées, comme les protéines Jumonji. Plusieurs de ces histones déméthylases sont hyperactivées dans le cancer de la prostate, ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle (43). Puisque les histones déméthylases, comme LSD1, peuvent à la fois avoir des fonctions activatrices et répressives, il est essentiel de comprendre leurs rôles, eux-mêmes dépendant du contexte, avant d'envisager leur inhibition à visée thérapeutique en cancérologie. En dépit de ces challenges, cibler les histones déméthylases est une option prometteuse, comme l'ont montré des études récentes d'inhibition de LSD1 dans le neuroblastome, en réduisant la prolifération *in vitro* et la croissante tumorale de xenogreffes *in vivo* (44). De même, les HDAC peuvent être des cibles thérapeutiques de choix, du fait de leur potentiel de réactivation de l'expression de gènes qui serait réprimée de manière aberrante dans certains types tumoraux. Le développement d'HDAC inhibiteur (HDACi) a donc ouvert la voie à de nombreux travaux, explorant la place des HDACi comme agents thérapeutiques antinéoplasiques.

1.3 HDACI EN CANCEROLOGIE :

Les HDACi développés ces dernières années ont prouvé leur capacité à inhiber les fonctions des HDAC, en induisant une hyper acétylation des histones, mais également de protéines non histones. Ainsi les HDACi sont capables de provoquer une induction d'apoptose, un arrêt de la croissance cellulaire, la senescence, la différentiation cellulaire, l'immunogénicité et l'inhibition de l'angiogenèse dans différents types de tumeurs (1, 45).

1.3.1 Développement et classification des HDACi :

Un nombre important et croissant d'HDACi, de structures variées, d'origine naturelle ou synthétique, ont été purifiés et développés, au moins 20 étant passés en développement clinique seul ou en combinaison à d'autres agents thérapeutiques (voir tableau ci-dessous).

Tableau 2 - Statut d'avancement clinique des principaux HDAC inhibiteurs (17)

Compounds	Target	Class	Highest phase trial
Panobinostat (LBH-589)	Pan-HDAC inhibitor	Hydroxamic acids	Approved in 2015 for multiple myeloma
Belinostat (PXD101)	Pan-HDAC inhibitor	Hydroxamic acids	Approved in 2014 for PTCL
Romidepsin (desipeptide-FK228)	Pan-HDAC inhibitor	Cyclic tetrapeptides	Approved in 2009 for CTCL
SAHA(Vorinistat, Zolinza)	Pan-HDAC inhibitor	Hydroxamic acids	Approved in 2006 for CTCL
Valproic acid	Pan-HDAC inhibitor	Short-chain fatty acids	Phase III
Tacedinaline (CI994)	Subclass I-selective inhibitor (HDACs 1, 2 and 3)	Benzamides	Phase III
Givinostat (ITF2357)	Pan-HDAC inhibitor	Hydroxamic acids	Phase II
Resminostat (4SC201)	Pan-HDAC inhibitor	Hydroxamic acids	Phase II
Abexinostat (PCI24781)	Pan-HDAC inhibitor	Hydroxamic acids	Phase II
Rocilinostat (ACY1215)	Selective class II HDAC inhibitor	Hydroxamic acids	Phase II
Quisinostat (JNI-26481585)	Pan-HDAC inhibitor	Hydroxamic acids	Phase II
Practinostat (SB939)	Inhibit class I, II and IV HDACs	Hydroxamic acids	Phase II
Mocetinostat (MGCD0103)	Specific against class I and IV HDACs	Benzamides	Phase II
Entinostat (MS275-SNDX-275)	Class I HDAC inhibitor	Benzamides	Phase II
Sodium phenylbutyrate	Inhibit class I and II HDACs	Short-chain fatty acids	Phase II
AR42	Pan-HDAC inhibitor	Hydroxamic acids	Phase I
4SC202	Selective class I HDAC inhibitor	Benzamides	Phase I
Pyroxamide (NSC696085)	Inhibitor of affinity-purified HDAC1	Hydroxamic acids	Phase I
CHR-3996	Selective class I HDAC inhibitor	Hydroxamic acids	Phase I
CHR-2845		Hydroxamic acids	Phase I

Abbreviations: CTCL=cutaneous T-cell lymphoma; HDAC=histone deacetylase; PTCL=peripheral T-cell lymphoma.

Adapted from Valente and Mai (2014), http://www.fda.gov/default.htm.

Historiquement, le butyrate a initialement été proposé comme agent anti néoplasique, du fait de sa capacité à induire la différenciation cellulaire (46). Il a ensuite été montré que le butyrate est capable d'induire l'hyper acétylation des histones (47). Mais à cette époque, dans les années 1970, les HDAC n'étaient pas encore considérés comme la cible moléculaire du butyrate. C'est dans les années 1990, que le lien entre inhibition de la croissance cellulaire tumorale (ou survie des cellules tumorales) et inhibition de l'activité des HDAC a été établi (48, 49).

Les HDACi peuvent être classés en 6 groupes selon leur structure chimique et ils ont une capacité d'inhibition enzymatique variable selon les agents considérés (45). La difficulté à produire des HDAC recombinants purifiés fonctionnellement actifs a limité l'identification de spécificité des HDACi. Toutefois, des études utilisant des HDAC recombinants partiellement purifiés et catalytiquement actifs ont été réalisées (50-52). Par exemple, il a été rapporté qu'un HDACi comme le depsipeptide a une activité d'inhibition d'HDAC1 et d'HDAC2 (qui sont des HDAC de classe I) supérieure à son activité d'inhibition des HDAC4 et HDAC6 (qui sont des HDAC classe II) (53). En revanche, un autre HDACi, le MS-275 inhibe préférentiellement l'HDAC1, est moins actif sur l'HDAC3 et induit une inhibition marginale seulement de l'HDAC8 (qui sont pourtant tous les 3 des HDAC de classe I) (51). D'autres études suggèrent une inhibition sélective des HDAC par

certains HDACi en évaluant l'hyper acétylation des histones H3 ou H4 et de l'α-tubuline (qui agit comme un témoin de l'activité d'HDAC6 (54-57). La tubacine, un inhibiteur spécifique de HDAC6, induit une hyper acétylation de l'α-tubuline et n'a pas d'effet sur l'acétylation des histones (55). Les autres HDACi contenant de l'hydroxamate, à l'exception de l'oxamflatine, induisent une hyper acétylation des histones H3 et H4 ainsi que de l'α-tubuline, alors que la plupart des autres classes d'HDACi n'ont pas d'effet sur l'acétylation de l'α-tubuline. Des HDACi d'iso formes spécifiques ont été développés mais leurs profils de toxicité et d'activité anticancéreuse ne se sont pas montrés, à ce jour, globalement supérieurs à ceux des autres HDACi de plus large spectre.

1.3.2 Effets biologiques des HDACi :

Comme nous venons de le voir, les effets biologiques de HDACi sont multiples. Parmi ces effets, il a été montré que certains HDACi peuvent être inducteurs d'apoptose (45). Tout comme une large majorité des drogues anti-cancéreuses, les HDACi peuvent induire une mort cellulaire, qui s'accompagne de toutes les caractéristiques biochimiques et morphologiques de l'apoptose. Le potentiel thérapeutique des HDACi vient de leur capacité à induire sélectivement l'apoptose des cellules tumorales. Les preuves de cette sélectivité anti-tumorale viennent d'essais cliniques et d'expérimentations animales précliniques, *in vitro* et *in vivo* (58-60). Les études *in vitro* montrant que les cellules transformées peuvent être jusqu'à 10 fois plus sensibles aux HDACi que les cellules normales constituent des éléments de preuve en faveur de la spécificité anti-tumorale des HDACi (58).

Ces études démontrent également que les HDACi ont une puissante activité anti-cancéreuse à des concentrations pour lesquelles la toxicité et les effets secondaires observés chez l'hôte sont minimes. Les toxicités dose-limitantes rapportées comprennent en premier lieu les thrombocytopénies, puis les nausées et la fatigue. Pour le depsipeptide, l'arythmie cardiaque a également été rapportée comme toxicité dose-limitante (61). Dans la majorité des cas, les effets secondaires rapportés sont tout à fait gérables cliniquement. Toutefois, il a été peut être un peu optimiste de croire que les traitements par HDACi n'auraient pas d'effets secondaires. Bien que la capacité des HDACi à tuer des cellules cancéreuses soit irréfutable, les mécanismes et les voies moléculaires sous-jacents restent incomplètement élucidés. De plus, comme la durée d'exposition à la drogue pour les expériences d'apoptose *in vitro* varie considérablement de celle utilisable *in vivo*, il n'a pas encore été démontré que l'activité thérapeutique des HDACi est directement reliée à leur capacité d'induction de mort cellulaire. Du fait de l'effet biologique pléiotropique des HDACi il est fort peu probable qu'une seule voie moléculaire conduisant à la mort cellulaire des cellules tumorales puisse être identifiée pour tous les HDACi dans tous les types cellulaires tumoraux. Il est beaucoup plus probable que les effets des HDACi soient dépendants du type cellulaire et il existe de plus en plus de preuves suggérant que des HDACi de structure différente ont des effets biologiques différents dans un même type cellulaire. Ceci est peut être lié aux profils de spécificité des différents HDACi, avec certains composés comme l'acide suberoylanilide hydroxamique

(SAHA) qui ont une activité biologique plus large que d'autres, comme la tubacine qui sont beaucoup plus sélectifs.

1.3.2.1 HDACI et apoptose :

Plusieurs études ont montré que les HDACi peuvent induire une apoptose, impliquant les voies extrinsèque (impliquant les récepteurs de mort) et/ou intrinsèque (mitochondriale).

La voie « intrinsèque » (voie mitochondriale) est la voie principale de l'apoptose. L'exposition à un stress cellulaire (irradiation, hypoxie profonde, chaleur, privation en nutriments, etc.) entraîne la phosphorylation de p53 par ATM. La protéine p53 activée induit la transcription des protéines à domaine BH3 PUMA (p53 tub modulator of apoptosis) et NOXA. Ces protéines interagissent au niveau de la mitochondrie avec les protéines anti apoptotiques de la famille Bcl2. Dans la mitochondrie, il existe un équilibre entre Bcl2, qui empêche l'ouverture des pores, et la protéine pro apoptotique Bax, qui active au contraire cette ouverture. L'interaction entre les protéines à domaine BH3 et les protéines de la famille Bcl2 entraîne l'ouverture des pores de transition de la membrane mitochondriale et le relargage de protéines activatrices (AIF : apoptosis inducible factor), en particulier la libération cytoplasmique de cytochrome C. Le cytochrome C entraine des modifications conformationnelles de la protéine Apaf1 (Apoptotic protease activating factor 1) qui permettent, en présence d'ATP, la formation irréversible d'un complexe heptamérique, l'apoptosome. Dans l'apoptosome, Apaf1 et la procaspase 9 interagissent par leurs domaines CARD (Caspase recognition domains). La procaspase 9 est activée en caspase 9, puis la procaspase 3 est activée en caspase 3 effectrice. De nombreux régulateurs interviennent dans cette cascade. Parmi les acteurs anti apoptotiques, hsp-27 inhibe la libération cytoplasmique de cytochrome C, hsp-70 inhibe la formation de l'apoptosome, et hsp-90 inhibe l'activation de la caspase 9 (62).

La voie extrinsèque de l'apoptose est plus marginale. Elle fait intervenir l'activation de récepteurs de mort de type FAS à la surface des cellules par des ligands de type FAS-ligand, qui sont des membres de la famille des TNF. L'interaction de FAS et FAS-ligand entraîne la trimérisation de FAS et la formation du complexe de signalisation d'induction de mort cellulaire DISC (death-inducing signaling complex), qui recrute la caspase 8 et active l'apoptose (63). La protéine p53 est également impliquée dans la voie extrinsèque car l'activation de p53 entraîne la transcription de gènes codant pour les récepteurs de mort FAS, DR4 et DR5 (death receptor). L'activation de ces récepteurs de la famille du TNF par la fixation du ligand TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) génère une apoptose dépendante de l'activation en aval de la caspase 8 (64). L'activation de la caspase 8 active la caspase effectrice 3. Outre le rôle de p53 dans les deux voies de l'apoptose, il existe des convergences entre les voies de l'apoptose intrinsèque et de l'apoptose extrinsèque et la caspase 8 peut également activer la protéine BID (BH3-interacting domain), qui va activer l'apoptose intrinsèque en agissant sur l'ouverture des pores mitochondriaux (65).

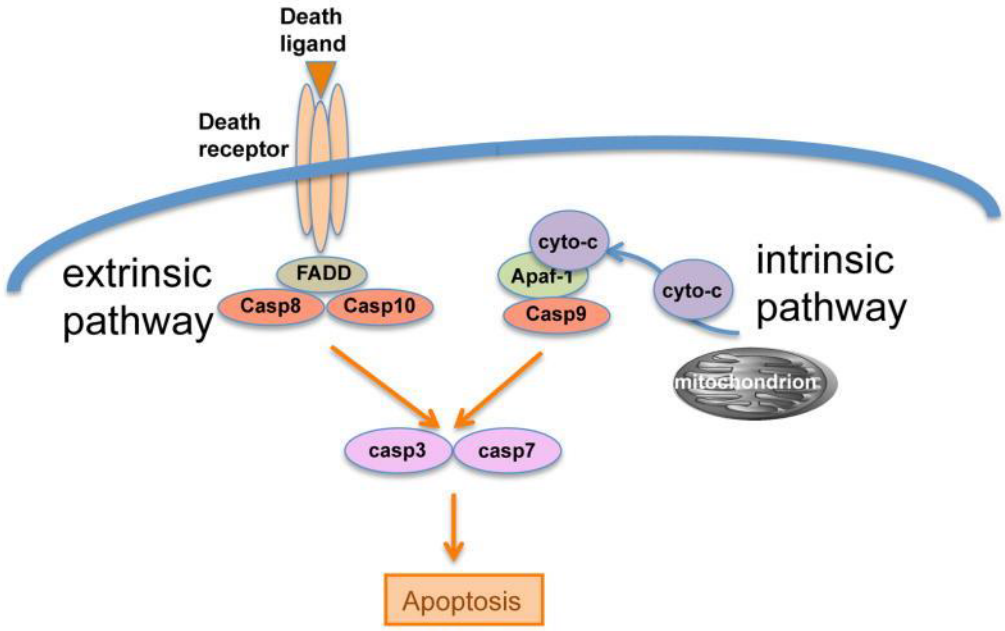


Figure 6 : Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose (66)

Les signaux extrinsèques et intrinsèques régulant l'apoptose sont aujourd'hui bien décrits ; ont été intégrés les éléments mécanistiques comme la mort médiée par les récepteurs de mort (appelés « Death receptors » en anglais, DRs), qui correspond à la voie extrinsèque, et la mort médiée par des phénomènes mitochondriaux, qui correspond à la voie intrinsèque (67, 68). Ces voies entraînent l'activation de différentes caspases apicales (les caspases 8 et 10 pour la voie extrinsèque et la caspase 9 pour la voie intrinsèque), qui activent des caspases effectrices communes (les caspases 3 et 7), conduisant au clivage d'un nombre encore inconnu de protéines pour exprimer le phénotype apoptotique.

Concernant la voie extrinsèque, il a été montré que des membres de la superfamille des récepteurs du TNF et leurs ligands sont transcriptionnellement activés, après traitement par HDACi, et que l'apoptose induite par les HDACI est corrélée à l'induction d'un ou plusieurs récepteurs de mort et/ou de leurs ligands (45) (1, 61). Toutefois, la nécessité d'une activation de la signalisation par la voie des récepteurs de mort pour déclencher l'apoptose induite par les HDACi reste controversée. La majorité des études d'activation de la voie des récepteurs de mort par les HDACi a été réalisée in vitro avec des lignées tumorales humaines. Des modèles murins précliniques ainsi que des données cliniques d'essais thérapeutiques, utilisant des HDACi chez l'homme, pourraient permettre d'étudier de manière plus pertinente la nécessité d'activation de cette voie. Pour essayer de répondre à cette question, Insinga et al ont réalisé une étude *in vivo* utilisant des souris transgéniques PML-RAR qui développent des leucémies myéloïdes aigües (69). Le traitement de ces souris par l'acide valproic (VPA) induit l'expression de TRAIL et Fas. TRAIL est une protéine transmembranaire, qui possède un domaine commun à la famille du TNF

portant la fonction cytokinique à l'extérieur de la cellule. TRAIL est capable de se lier aux récepteurs de mort et induit ainsi une mort de type apoptotique dans diverse cellules cancéreuses. Fas est également une protéine de la famille du TNF, capable d'induire la mort par apoptose de diverses cellules cancéreuses. L'expression de TRAIL et Fas induite par les HDACi dans les cellules de leucémie aigüe myéloïde peut être bloquée par l'utilisation *in vivo* de petits ARN interférents (siRNA) spécifiques de TRAIL et Fas, conduisant à une réduction de 50% de l'apoptose induite par le traitement de ces souris par le VPA. Dans ce modèle, il n'a toutefois pas été montré que la réduction d'apoptose médiée par TRAIL ou Fas supprime l'effet thérapeutique du VPA. La question de l'importance du rôle de l'apoptose induite par la voie des récepteurs de mort dans l'effet thérapeutique des HDACi reste ouverte.

Concernant la voie intrinsèque, de nombreuses études indépendantes sont en faveur du rôle de la voie mitochondriale de l'apoptose dans la mort cellulaire induite par les HDACi. Plusieurs équipes ont montré que la surexpression de BCL2 ou BCL-XL, qui bloque la voie intrinsèque de l'apoptose, inhibe l'apoptose induite par les HDACi indépendamment du type cellulaire étudié. Bien qu'il s'agisse majoritairement d'études *in vitro*, certaines données préliminaires *in vivo* suggèrent que les cellules primaires de lymphome B surexprimant Bcl2 sont complètement résistantes aux HDACi comme le SAHA et le LBH589 (45). Ceci indique que l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose est requise pour l'effet thérapeutique des HDACi, au moins dans ce modèle syngénique de souris développant des lymphomes de Burkitt. Il reste encore à comprendre comment les HDACi déclenchent l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. Une des possibilités étudiées est celle de l'induction globale de modifications de l'expression de gènes par les HDACi, perturbant l'équilibre entre l'expression de gènes pro et anti apoptotique qui basculerait en faveur d'une réponse biologique pro apoptotique (Figure 7). Il est également possible que le déclenchement de l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose par les HDACi corresponde à un processus plus spécifique, médié par l'activation d'une protéine ou d'une voie moléculaire située en amont de la mitochondrie. Ces deux hypothèses ont été étudiées par différentes équipes. L'une des hypothèses proposées comme processus plus spécifique d'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose est l'activation ou l'induction de protéines pro apoptotiques à domaine BH3 exclusif.

Les membres de la famille de protéines de Bcl2 ont en commun un à quatre domaines d'homologie caractéristiques de cette famille, que l'on appelle les domaines BH et qui sont numérotés de 1 à 4. Ces domaines BH ont un rôle fonctionnel crucial. En effet, la délétion de ces domaines affecte la balance survie/apoptose des cellules. Les protéines anti apoptotiques de la famille Bcl2 comme Bcl2 et Bcl-xL conserve les 4 domaines d'homologie (BH1, BH2, BH3 et BH4). Les domaines BH permettent également de subdiviser les protéines pro apoptotiques de la famille Bcl2 en 2 catégories : celle des protéines pro apoptotiques avec plusieurs domaines BH, comme Bax et Bak, et celle des protéines qui n'ont que le domaine BH3 (protéine à domaine BH3 exclusif), comme Bim, Bid et Bad, que l'on appelle en anglais des « BH3-only proteins ». Le domaine BH3 est retrouvé dans toutes les protéines pro apoptotiques de la famille de Bcl2 et ce domaine est nécessaire pour la dimérisation avec d'autres protéines de la famille et leur activité apoptotique.

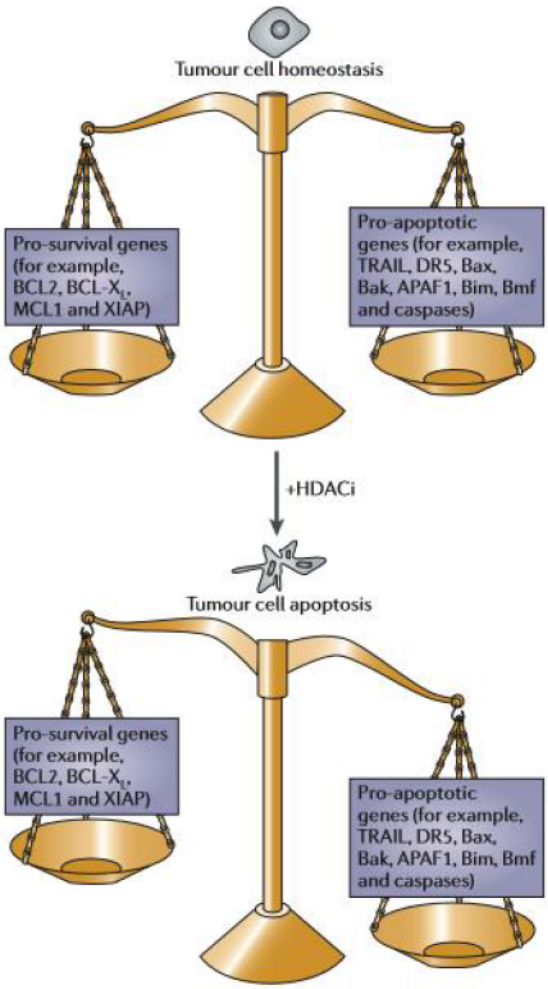


Figure 7 : Effet pro apoptotique des HDACi sur les cellules cancéreuses (45)

Au cours de leur transformation, les cellules cancéreuses atteignent un état d'homéostasie apoptotique dans lequel l'activation de protéines pro apoptotiques est contrebalancée par une expression et une activation importante de protéines anti apoptotiques. Cet état d'équilibre assure la survie des cellules tumorales. Les profils d'expression génique de cellules tumorales traitées par HDACi montrent que les gènes pro apoptotiques impliqués dans la voie des récepteurs de mort (comme par exemple TRAIL et DR5) et/ou la voie mitochondriale (comme par exemple Bax, Bak, et APAF1) sont généralement régulés positivement. Inversement, les gènes favorisant la survie cellulaire (comme BCL2 et XIA) sont généralement régulés négativement, ce qui aboutit à un abaissement du seuil apoptotique se traduisant par un effet pro apoptotique du traitement par HDACi. APAF1, apoptotic peptidase-activating factor (facteur activateur d'apoptose); BCL, lymphome à cellules B; DR5, death receptor (récepteur de mort) 5; MCL, myeloid cell leukaemia (cellules de leucémie myeloïde); TRAIL, tumour-necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (ligand inducteur d'apoptose relié au facteur de nécrose tumorale); XIAP, X-linked inhibitor of apoptosis (inhibiteur d'apoptose X-lié).

Les protéines à domaine BH3 exclusif régulent l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose par interaction directe avec les protéines pro apoptotiques (Bax et Bak) ou anti apoptotiques (Bcl2, Bcl-xL, Mcl1, Bcl-w et A1) (70). L'activité des protéines à domaine BH3 exclusif peut être régulée non seulement au niveau transcriptionnel mais aussi en post traductionnel, par des modifications comme le clivage protéolytique de Bid ou la phosphorylation de Bad et Bim (70). L'activation et/ou l'induction transcriptionnelle de protéines à domaine BH3 exclusif en réponse aux HDACi comme mécanisme activateur de la voie intrinsèque de l'apoptose a été étudié. Bid est clivée et activée en réponse à différents HDACi mais les protéases responsables du clivage de Bid médié par les HDACi et les mécanismes d'initiation de ce processus restent à étudier (71-73). D'autres protéines à domaine BH3 exclusif comme Bim et Bmf ont également été impliquées comme acteur direct de l'apoptose induite par les HDACi. Ces deux protéines sont transcriptionnellement actives en réponse aux traitements par HDACi. L'induction de Bmf résulte probablement de l'hyper acétylation des histones du promoteur de BMF, alors que les HDACi semblent induire l'activation de Bim via l'activation du facteur de transcription E2F1 et l'augmentation de fixation d'E2F1 sur le promoteur de Bim (74, 75). L'ensemble de ces études soulignent le rôle des différentes protéines à domaine BH3 exclusif dans l'initiation de la voie intrinsèque de l'apoptose lors des traitements par HDACi et illustrent l'existence de différents mécanismes d'activation en réponse à ces drogues.

D'autres hypothèses moins spécifiques ont également été étudiées pour expliquer les mécanismes d'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose et, en particulier, la régulation de la production et/ou de l'activité des dérivés réactifs de l'oxygène. Les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO, en anglais : reactive oxygen species, ROS) sont des espèces chimiques oxygénées telles que des radicaux libres, des ions oxygénés et des peroxydes, rendus chimiquement très réactifs par la présence d'électrons de valence non appariés. Il peut s'agir par exemple de l'anion super oxyde $O2-$, de l'oxygène singulet $O2*$, du peroxyde d'hydrogène $H2O2$, ou encore de l'ozone $O3$. Les DRO peuvent être d'origine exogène — produits par des rayonnements ionisants par exemple — ou bien endogène, apparaissant comme sous-produits du métabolisme normal de l'oxygène et jouant alors un rôle important dans la communication entre les cellules. Leur concentration peut cependant croître significativement en période de stress — sous l'effet de la chaleur ou de l'exposition aux ultraviolets par exemple — et endommager les structures cellulaires en provoquant, en particulier, des cassures au niveau des brins d'ADN, ce qu'on appelle le stress oxydant. Après traitement par HDACi, des taux élevés de DRO sont détectés et les traitements capables de piéger les DRO (en anglais free-radical scavengers) peuvent supprimer l'activité pro apoptotique des HDACi. De plus, l'augmentation du niveau des DRO précède les changements de potentiel membranaire mitochondriaux et il a été proposé que la régulation des DRO puisse être un élément expliquant la sélectivité d'activité des HDACi à l'égard des cellules tumorales (58, 76). Les mécanismes déclenchants l'augmentation des DRO en réponse aux HDACi restent inconnus. Il reste également à déterminer s'il s'agit d'un processus actif d'augmentation de production de DRO ou d'une augmentation des DRO liée à une altération d'expression de protéines régulatrices des DRO, comme TBP2 et la thioredoxine. Il est également intéressant de noter que la production de

DRO peut conduire à l'induction transcriptionnelle et l'activation de Bim (77). Ceci soulève l'intrigante possibilité d'un lien entre les traitements par HDACi, l'augmentation des DRO, l'activation des protéines à domaine BH3 exclusif et le déclenchement de l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. Enfin, l'augmentation des DRO lors du traitement par les HDACi et leur effet différentiel anti-tumoral est un élément intéressant comme rationnel en faveur d'une combinaison thérapeutique associant les HDACi à d'autres agents pro apoptotiques ou producteurs de DRO comme certaines drogues ou la radiothérapie.

1.3.2.2 HDACI et arrêt du cycle cellulaire :

Le cycle cellulaire comprend quatre phases successives : la phase de croissance (G1), la phase de synthèse (S), la phase pré mitotique (G2), et la phase de mitose (M). Le démarrage de chaque phase dépend de l'accomplissement de la phase précédente. La progression dans le cycle cellulaire s'effectue sous la dépendance des cyclines, protéines qui s'accumulent et sont dégradées à différents temps et différentes phases du cycle cellulaire. Ces dernières sont nécessaires à l'activation de sérines/thréonines kinases, appelées kinases dépendant des cyclines (CDK : cycline dependent kinases), qui régulent la phosphorylation de protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire. Les cyclines ne présentent pas d'activité catalytique propre. Mais elles forment ,avec la sous-unité catalytique des CDK, un complexe qui contrôle les étapes clés du cycle cellulaire (78).

La cycline D est produite en phase G1 sous le contrôle de signaux mitogéniques. Elle forme un complexe avec les kinases CDK4 ou CDK6. Ces complexes cyclines D/CDK phosphorylent la protéine suppresseur de tumeur du rétinoblastome Rb, entraînant sa dissociation du complexe E2F/DP1/Rb. L'activation du facteur de transcription E2F a pour conséquence la transcription de nombreux gènes, codant pour des enzymes nécessaires à la synthèse de l'ADN (ADN polymérase, thymidine kinase), mais également pour la cycline E, qui forme avec CDK2 un complexe de pré-réplication nécessaire à la transition G1/S (79). Puis CDK2 se dissocie de la cycline E et forme un complexe avec la cycline A, durant les stades tardifs de la réplication, pour permettre l'initiation de la synthèse d'ADN. En phase S tardive, la cycline A s'associe à CDK1, jusqu'à la fin de la phase G2. Lorsque l'enveloppe nucléaire commence à se désintégrer au moment de la mitose, les cyclines A sont dégradées, permettant la formation du complexe cycline B1/CDK1 (également appelé MPF en anglais: Mitosis Promoting Factor). Ce complexe est inactivé par la kinase Wee1 et activé par la phosphatase cdc25c (en anglais : Cell division control protein). Le complexe MPF subit une translocation du cytoplasme vers ce qui était le noyau de la cellule. Il effectue plusieurs phosphorylations, activatrices de protéines mitotiques impliquées dans la condensation de la chromatine, les remaniements membranaires et la réorganisation des microtubules permettant l'entrée de la cellule en phase M (80). La destruction de CDK1 par le cyclosome permet le passage en anaphase (81).

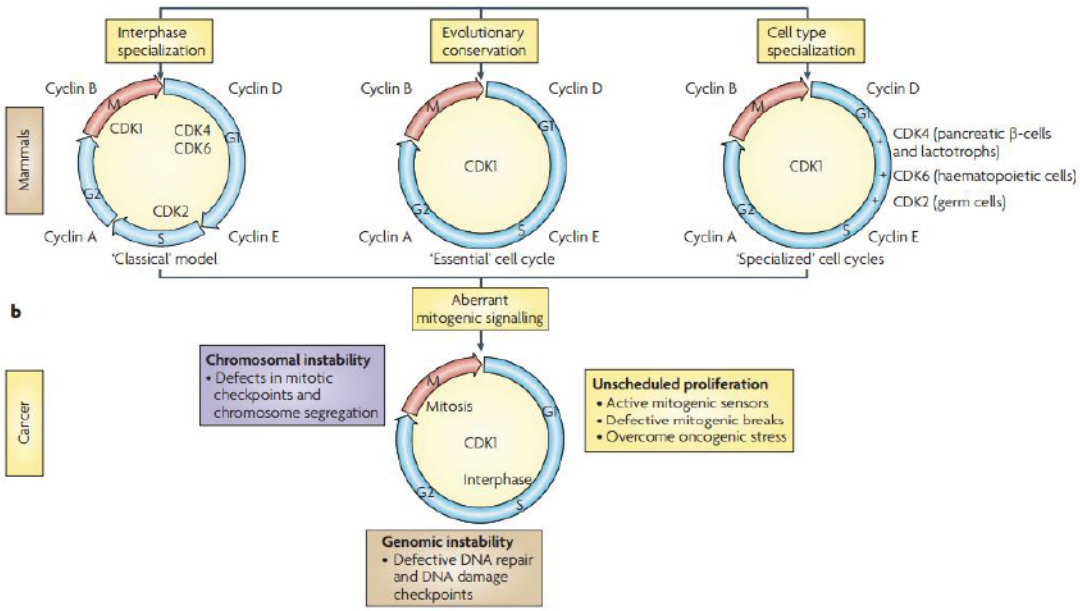


Figure 8 : cycle cellulaire des cellules de mammifère normale et comparaison avec les cellules cancéreuses (78)

Dans le modèle classiquement accepté, basé sur les données biochimiques, chacun des principaux évènements qui ont lieu pendant l'interphase (G1, S, G2) est régulé par une cycline dépendante de kinase (CDK) unique, qui se lie à une cycline spécifique (« classical » model sur la figure ci-dessus). Il a été montré que CDK1 est suffisante pour réguler la prolifération de tous les types cellulaire jusqu'à mi- gestation et pour la régénération hépatique chez l'adulte (82). CDK1 est donc considérée comme essentielle pour le cycle cellulaire. Les cycles cellulaires dits spécialisés sont basés sur la notion de nécessité de types cellulaires spécialisés pour certaines CDK spécifiques. La prolifération cellulaire anarchique des cellules tumorales nécessite des signaux mitogéniques aberrants, qui sont régulés soit par des signaux exogènes excessifs (comme par exemple des facteurs de croissance surexprimés) ou des mutations oncogéniques endogènes. D'autres mutations affectant les freins mitogéniques (comme les gènes suppresseurs de tumeurs), qui réduisent le seuil des signaux mitogéniques, contribuent également à la prolifération anarchique. L'activation du cycle cellulaire induite par les oncogènes provoque un stress réplicatif au niveau de l'ADN, qui est détecté par les points de contrôles de réplication de l'ADN. L'échec de ces mécanismes de contrôle aboutit à une augmentation du taux de mutation et peut conduire à une instabilité génomique. Pendant la mitose, les anomalies du point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique induisent une dérégulation de l'activité de CDK1 qui peut aboutir à une mauvaise ségrégation chromosomique. Toutes ces anomalies aboutissent à une dérégulation de l'activité des CDK qui peuvent conduire au développement de tumeurs.

Il existe des points de contrôle du cycle cellulaire, ou checkpoints, qui permettent à la cellule de se protéger lorsque des anomalies surviennent au cours des étapes précédemment décrites, ce qui peut être le cas lors d'exposition à des agents génotoxiques comme les rayonnements ultraviolets, les rayonnements ionisants ou différentes drogues. Ainsi, la

reconnaissance de lésions de l'ADN active des voies signalisation qui conduisent à l'inhibition des CDK et l'arrêt du cycle cellulaire (83). Il existe trois points de contrôle du cycle cellulaire pour l'exposition à un stress génotoxique :

- le point de contrôle (ou de restriction) G1 intervient juste avant l'entrée en phase S (transition G1/S). Ce point de restriction est typiquement activé lorsque la cellule est exposée à un stress qui induit des dommages sur l'ADN et empêche la cellule de se diviser. En présence de cassures double brins, l'activation de la protéine Chk2 (checkpoint kinase 2) par ATM (Ataxia telangectasia mutated) et dans une moindre mesure par ATR (Ataxia-Telangiectasia Related, une kinase qui se lie à l'ADN et qui inhibe le complexe Cdk1-CyclineB par l'intermédiaire de Chk1) entraine l'inactivation de cdc25A et l'inactivation du complexe cycline E/CDK2, ce qui empêche la transition G1/S.

Chk2 est une sérine thréonine kinase qui stabilise p53 et inhibe le complexe cycline D/CDK4 ou CDK6 (84, 85). L'activation de p53 par ATM en présence de lésions de l'ADN radio-induites provoque donc un arrêt du cycle cellulaire en G1/S. En effet, p53 active la transcription de p21, qui bloque l'activité des complexes cyclines E/CDK2 et empêche le déroulement de la phase S, régulant la défense contre le stress oxydatif, permettant la réparation des cassures de l'ADN ou l'adaptation métabolique de la cellule à son environnement énergétique, ce qui lui vaut le surnom de « gardien du génome ». Mais l'inactivation de la fonction de p53 est une caractéristique presque universelle des cellules cancéreuses humaines. La perte de la fonction « suppresseur de tumeur » du gène p53 est souvent due à une mutation somatique. Environ 50 % des tumeurs sont mutées pour p53 (86-88). La fréquence des mutations inactivatrices de p53 dans les tumeurs humaines explique qu'il soit relativement rare d'observer en pratique des arrêts des cellules cancéreuses en G1/S. Le point de restriction G1 est également sous le contrôle de la protéine p16, qui inhibe les kinases CDK4 et CDK6 et ce qui empêche la formation du complexe avec la cycline D. Le point de restriction G1/S peut être franchi en situation d'exposition à un signal oncogénique : l'expression de la cycline D augmente, sa fixation aux CDK4 et 6 est rendue possible et le complexe cycline D/CDK4-6 peut phosphoryler la protéine Rb (89).

- le second point de contrôle, dit « intra-S », se manifeste au cours du cycle cellulaire comme une diminution transitoire de la synthèse de l'ADN, lors de l'exposition à un stress génotoxique. Contrairement au point de restriction G1, ce point ne dépend pas de p53 ou de p21. Cependant, il semble faire intervenir l'axe de signalisation ATM/Chk1/Cdc25A/CDK2 : l'activation de Chk1 entraine l'inactivation de cdc25A et donc des complexes cycline A/CDK2 et cycline E/CDK2 (89).

- le troisième point de contrôle se situe en phase G2 tardive (point G2/M). La phosphatase cdc25c active le complexe cycline B/CDK1. En présence de lésions de l'ADN, l'activation de Chk1 par ATR (dans une moindre mesure par ATM) entraine l'inactivation de cdc25A et de cdc25C (qui inhibe le complexe cycline B/CDK1). En parallèle, Chk1 active Wee1, inhibiteur de CDK1. L'activation de Chk1 a donc pour effet d'empêcher l'entrée en mitose, en inhibant le complexe cycline B1/CDK1 (90).

Les HDACi ont initialement été développés pour leur capacité à induire la différentiation cellulaire et cette propriété est intimement liée à l'arrêt du cycle cellulaire en G1/S médié par la protéine du rétinoblastome (pRb) et les protéines associées. Il a été montré que la majorité des HDACi étudiés à ce jour peuvent induire un arrêt du cycle cellulaire en G1/S (1, 55, 91-94) (Figure 10). Cet arrêt en G1/S semble le plus souvent associé à une induction (indépendante de p53) du gène CDKN1A, qui code pour la protéine p21WAF1/CIP1 qui promeut l'hypo phosphorylation de pRb (95, 96). L'induction de CDKN1A pourrait ne pas être le seul élément responsable de cet arrêt en G1. En effet, les HDACi peuvent réprimer l'expression des gènes de la cycline D et de la cycline A qui, comme l'ensemble des cyclines, sont des protéines de contrôle du cycle cellulaire. Les cyclines contrôlent en particulier le passage de la phase G1 à la phase S du cycle par activation enzymatique de leurs partenaires les kinases dépendantes des cyclines (CDK) et en particulier CDK2 et CDK4. La répression des gènes des cyclines D et A médiée par les HDACi contribue probablement aussi à la perte de l'activité kinase des CDK2 et CDK4 et à l'hypo phosphorylation de pRb (97-99).

Par ailleurs, il a été montré que certains gènes impliqués dans la synthèse d'ADN sont réprimés par les HDACi. C'est le cas du gène de la cytosine triphosphate (CTP) synthase, dont la protéine est une enzyme impliquée dans la synthèse des bases pyrimidiques, qui convertit un uracile triphosphate (UTP) en CTP, et de la thymidylate synthase, dont la protéine est une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse de la thymidine (100). La perte d'expression de ces enzymes aurait le même effet qu'un traitement anti métabolite, qui bloque la progression du cycle lors de l'entrée en phase S, contribuant ainsi à un arrêt en G1/S. D'autres mécanismes inhibiteurs de croissance cellulaire ont été évoqués, par exemple l'induction d'autres gènes régulateurs du cycle cellulaire comme GADD45 α et GADD45 β (en anglais : Growth arrest and DNA-damage-inducible protein), qui codent pour des protéines d'arrêt du cycle cellulaire également inductibles par les dommages de l'ADN, ou comme la régulation positive de la voie de signalisation du récepteur du TGFβ, qui conduit à la répression de c-MYC et à l'arrêt du cycle cellulaire (101, 102). En effet, c-MYC (ou MYC) est un proto-oncogène, qui est surexprimé dans certains cancers humains. Quand il est soumis à des mutations ou à une surexpression, il stimule la prolifération des cellules et se conduit comme un oncogène. Le gène MYC produit un facteur de transcription qui régule l'expression de tous les gènes de 15 %, en se liant aux séquences « Enhancer Box » et en recrutant des enzymes HAT, capables d'acétyler les acides aminés lysine des histones. Dans ces mécanismes, l'arrêt du cycle médié par les HDACi se produit possiblement via un effet direct sur l'architecture de la chromatine, au niveau de loci spécifiques conduisant à des modifications d'expression génique. Certains HDACi peuvent également induire un arrêt en G2/M, par activation du point de contrôle de la phase G2, mais ce phénomène semble beaucoup plus rare que l'induction de l'arrêt en G1 par les HDACi (98, 103). Dans certaines circonstances, la perte du point de contrôle de la phase G2 peut déterminer l'effet des HDACi sur la modulation de l'apoptose. La majorité des cellules cancéreuses ont un point de contrôle de la phase G2 déficient et les cellules traitées par HDACi peuvent initialement s'accumuler dans le cycle cellulaire en G2/M puis passer ce checkpoint déficient et s'orienter vers l'apoptose (71, 73). En revanche, les cellules qui

conservent un checkpoint fonctionnel sont résistantes aux effets des HDACi. Qiu et al ont montré que les lignées cellulaires sensibles à l'acide azelaique bishydroxamique (ABHA), qui est un HDACi, sont déficientes pour le checkpoint de la phase G2 et que la réintroduction d'un arrêt en G2 les protège de l'apoptose induite par les HDACi (98). Contrairement à l'arrêt en G1 médié par les HDACi, pour lequel il existe une activation transcriptionnelle de CDKN1A, les mécanismes responsables de l'arrêt en G2 médié par les HDACi sont encore peu compris. L'une des hypothèses explicatives proposées est que le checkpoint en G2 médié par les HDACi serait lié à une hyper acétylation de l'hétérochromatine péri centrique et que la perte de ce checkpoint pourrait conduire à une ségrégation chromosomique anormale et à une fragmentation nucléaire (104).

Les HDACi acétylent les histones des cellules normales et tumorales de la même manière. Les cellules normales passent le checkpoint en G2 et survivent au traitement alors que les cellules tumorales peuvent répliquer leur ADN et être ensuite arrêtées et orientées vers l'apoptose. L'arrêt des cellules en G1 inhibe l'apoptose et est associé avec la différenciation. La protéine anti-apoptotique BCL2 peut inhiber l'apoptose induite par les HDACi mais n'affecte pas la régulation du cycle cellulaire ou la différenciation. L'induction de gènes codants pour les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe I et II, des molécules d'activation (CD40), des molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM1) majore l'immunogénicité des cellules tumorales. L'angiogenèse peut être inhibée par la répression du facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF).

1.3.2.3 HDACi et angiogenèse tumorale :

L'angiogenèse tumorale ou néo angiogenèse est une étape critique de la croissance tumorale locale et de sa propagation à distance, elle assure la néo vascularisation de la tumeur. Celle-ci est indispensable à la croissance tumorale dès que le volume tumoral dépasse quelques mm^3. Le « Switch » angiogénique est alors nécessaire et l'obstruction physique des vaisseaux tumoraux peut entraîner une disparition complète de la tumeur elle-même (105, 106). Une étape précoce de la néo angiogenèse consiste en la sécrétion par les cellules tumorales de métallo protéases et de l'urokinase activatrice qui entraînent une protéolyse de la membrane basale vasculaire permettant la migration de cellules endothéliales. Les cellules endothéliales s'organisent en une néo angiogenèse anarchique sous le contrôle d'adhésines. En raison de nombreux shunts et d'anomalies de la couverture péricytaire, une hyperpression interstitielle s'installe dans l'environnement tumoral, ce qui entraîne une hypoxie secondaire et stimule l'activation de la néo angiogenèse (106).

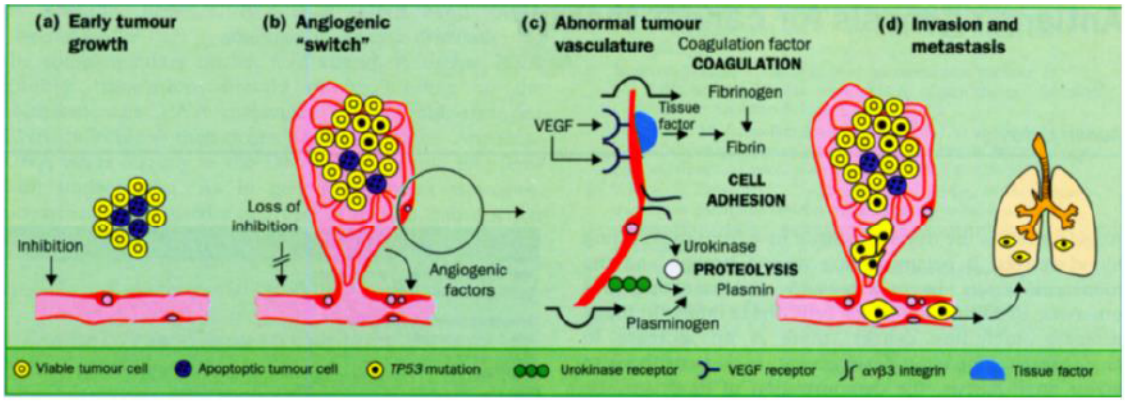


Figure 9 : Angiogenèse tumorale (107)

(a) Les petites tumeurs de moins de 1 mm^3 avec un niveau élevé d'apoptose ne peuvent plus se développer d'avantage sans apport sanguin.

(b) L'environnement hypoxique et l'instabilité génétique permet l'évolution de clones tumoraux ayant perdu la fonction de p53. Ces cellules ont un taux d'apoptose plus bas et produisent des facteurs angiogéniques qui induisent la formation de néo vaisseaux. Il existe également une inhibition fréquente des facteurs anti angiogéniques au sein des tumeurs.

(c) La vascularisation tumorale est anormale. Les néo vaisseaux sont plus perméables et laissent passer le fibrinogène. Dans ces conditions les facteurs tissulaires exprimés à la surface de l'endothélium tumoral permettent la production de dépôts de fibrine. Les récepteurs au facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) et les intégrines αvβ3 et αvβ5 des récepteurs à l'urokinase sont surexprimés. La fuite de plasminogène génère des niveaux élevés de plasmine et favorise la protéolyse.

(d) Ces processus favorisent l'invasion et la formation de métastases et surviennent à différents endroits permettant ainsi la dissémination métastatique.

Le ciblage de l'angiogenèse tumorale pourrait permettre d'éviter le phénomène de résistance tumorale acquise aux drogues antinéoplasiques puisque les cellules endothéliales présentent davantage de stabilité génétique que les cellules tumorales et qu'elles constituent une population cellulaire relativement homogène (106-108). Deux classes d'agents pharmacologiques ont été évalués : les agents anti angiogéniques et les agents anti vasculaires (VDA = vascular disrupting agents). Ces agents diffèrent principalement par trois aspects : leur cible physiologique, le stade auquel la maladie cancéreuse est susceptible de répondre à l'agent et la séquence d'administration (109). Pourtant, la distinction entre ces deux classes n'est pas forcément claire, puisque plusieurs agents présentent à la fois des propriétés anti angiogéniques et anti vasculaires (110).

Les HDACi ont un effet anti-angiogénique *in vitro* et *in vivo* qui peut contribuer à l'inhibition du développement et de la progression tumorale. L'effet anti-angiogéniques des HDACi a été corrélé à une réduction d'expression de gènes pro-angiogéniques sous HDACi. La majorité des HDACi peuvent réguler négativement le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF), le facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF), le facteur 1α inductible en hypoxie (HIF1 α), l'angiopoietine, la kinase 2 de l'intima endothélial (TIE2) et l'oxide nitrique synthase endothéliale (eNOS) et ceci dans un ordre de grandeur compatible avec un effet inhibiteur sur la néo-angiogenèse in vitro et in vivo (56, 111-115). De plus, il a été montré que les HDACi peuvent induire une répression de l'expression des chimiokines au motif C-X-C du récepteur 4 (CXCR4) qui sont importantes pour l'adressage des progéniteurs de la moelle osseuse et des cellules endothéliales circulantes vers les sites d'angiogenèse à la fois dans les cellules endothéliales normales et tumorales (56, 116). Enfin, les HDACi peuvent réprimer la différenciation de cellules progénitrices endothéliales (56). Tous ces éléments sont donc en faveur d'un rôle des HDACi dans l'inhibition de la néo vascularisation par altération de l'expression de gènes directement impliqués dans l'angiogenèse. Cet effet anti-angiogénique pourrait d'une part réduire l'apport de nutriments à la tumeur primitive et d'autre part inhiber la propagation métastatique de la tumeur.

1.3.2.4 HDACi, capacités invasives et métastases:

Ce possible effet anti-métastatique des HDACi pourrait être renforcé par l'inhibition des métallo protéinases de la matrice extracellulaire (MMP). Cette inhibition pourrait être obtenue soit par répression transcriptionnelle des MMP clés comme MMP2 et MMP9 ou par surexpression de TIMP1 et TIMP2 qui sont 2 membres de la famille des inhibiteurs tissulaires des métallo protéinases (glycoprotéines impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire) et/ou par induction d'expression de RECK qui est une glycoprotéine membranaire qui régule négativement l'activité de MMP2 (117-119). A ce jour les preuves de l'effet anti-métastatique des HDACi restent limitées. On peut toutefois noter un exemple in vivo d'étude portant sur le butyrate de sodium qui montre une inhibition significative des métastases de carcinome hépatocellulaire (120). Cependant, il existe des résultats divergents voir opposés. En effet, Lin et al ont testé un total de 30 lignées cellulaire humaines de cancer comportant 12 lignées de cancer du foie, 10 lignées de cancer du poumon, 5 lignées de cancer gastrique et 3 lignées de cancer du sein traitées par un HDACi le TSA. Ils ont montré que de manière très surprenante, le traitement par TSA augmente de manière statistiquement significative la capacité de migration cellulaire jusqu'à plusieurs centaines de fois et ceci de manière dose dépendante dans 13 des 30 lignées humaines de cancer étudiées soit 43 %. Il est intéressant de noter que cette augmentation de la migration cellulaire est observée pour de faibles doses non cytotoxiques d'HDACi comme le MS-275, l'acide valproique ou le SAHA. Ces résultats suggèreraient que l'augmentation de la migration cellulaire puisse être liée à des activations épigénétiques de gènes favorisant la progression tumorale dans les cellules traitées par HDACi plutôt qu'à une sélection de cellules survivantes/résistantes au traitement par HDACi (121). *In vivo*, cette équipe a montré des résultats contradictoires en utilisant deux modèles

métastatiques différents. Les expériences utilisant un modèle d'injection de cellules cancéreuses humaines dans la veine caudale des souris ont montré une majoration de la formation de métastases sous traitement par HDACi alors le modèle orthotopique de formation de métastases spontanées après injection intra-splénique de cellules cancéreuses humaines a montré une diminution de la tumorigénèse et de la formation des métastases (121). Toutefois le modèle d'injection caudale directement dans la circulation sanguine est probablement moins relevant de la réalité chez l'homme dans la mesure où il n'évalue pas les étapes précoces du processus de formation des métastases et reflète directement la capacité des cellules tumorales à former des métastases une fois dans la circulation sanguine (122). A l'inverse, le modèle d'injection intra-splénique semble plus proche de la réalité chez l'homme et plus pertinent car il reflète mieux la complexité des mécanismes de formation de métastases spontanées.

1.3.2.5 Immunité cellulaire

Il existe plusieurs types de cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral (123) mais les cellules cancéreuses peuvent échappent au système immunitaire via divers mécanismes.

Au cours du processus oncogénique, l'émergence de cellules tumorales avec un potentiel immunogène réduit permet à la tumeur d'échapper au contrôle du système immunitaire. Le terme de cancer « immunoediting » s'applique à un concept biologique en trois étapes : l'élimination, l'équilibre et l'échappement au contrôle du système immunitaire. Les cellules tumorales sont tout d'abord reconnues et détruites par le système immunitaire. Par la suite, les cellules survivantes qui ont échappées au système immunitaire sont « sélectionnées » et présentent une immunogénicité réduite. Le système immunitaire perd sa capacité à détecter des cellules tumorales qui se multiplient jusqu'à ce que la tumeur devienne cliniquement détectable (124-127). En effet, la croissance de la tumeur nécessite le recours à une grande variété de mécanismes pour échapper au système immunitaire. La tumeur peut partiellement perdre sa capacité de présentation des antigènes tumoraux aux cellules immunitaires. Dans certains cas, les cellules tumorales perdent l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I, elles ne peuvent donc pas être reconnues par les lymphocytes T cytotoxiques (cytotoxic T lymphocytes [CTL]) (128, 129). La plupart des tumeurs et leur microenvironnement (matrice extracellulaire, leucocytes et cellules stromales, cellules endothéliales, macrophages, fibroblastes, etc.) ont la capacité d'inhiber la maturation des cellules dendritiques (dendritic cells [DCs]) et leur fonction de cellules présentatrices d'antigènes (antigen-presenting cells [APCs]) (130). Le VEGF qui est impliqué dans l'angiogenèse tumorale, empêche la maturation des cellules dendritiques et contribue au recrutement de tumour-associated macrophages (TAMs) qui possèdent également des fonctions immunosuppressives (131).

Il existe deux type de réponse immunitaire celle en rapport avec l'immunité innée et celle dite « adaptative » qui correspond à la réponse immunitaire spécifique.

1.3.2.5.1 Immunité innée

Les TAM représentent une des composantes tumorales inflammatoires principales du stroma. Les TAM sont en mesure d'influencer les autres composantes du tissu néoplasique. Les lymphocytes T CD4 + helper 1 (Th1) produisent de l'interféron gamma (IFNg), l'interleukine (IL) -2, du facteur de nécrose tumorale (TNF), ils activent les TAM-M1 et sont responsables de l'immunité à médiation cellulaire. Les TAM-M1 sont également impliqués dans la cytotoxicité anti tumorale, parce que les tumeurs produisent de l'ATP, signal qui déclenche la sécrétion de plusieurs chimiokines, dont IL-1 et IL-6, impliquées dans l'attraction des cellules présentatrices d'antigènes aux sites tumoraux. D'autre part, les lymphocyte T helper 2 (Th2) produisent diverses interleukines qui activent les TAM-M2 et induisent une réponse humorale par une forte production d'anticorps. Les TAM-M2 peuvent contribuer à la progression des tumeurs et aux mécanismes d'invasion par la sécrétion de cytokines immunosuppressives (IL-10 et de facteurs de croissance tumoraux (TGF ou tumour growth factor en anglais) et/ou la promotion de la néo angiogenèse (132, 133). Les antigènes associés aux tumeurs (tumour-associated antigen [TAA]) sont observés à la surface des cellules tumorales et des cellules normales. Ces antigènes permettent au système immunitaire de reconnaître des cellules tumorales par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, un autodéterminant majeur en immunologie (134). Deux types de lymphocytes sont impliqués dans cette reconnaissance : les natural killer (NK) et les lymphocytes T cytotoxiques. Les cellules NK sont des cellules cytotoxiques impliquées dans la réponse innée et peuvent détecter ces antigènes sur la surface de cellules tumorales. Leur activation dépend de la perte de la reconnaissance d'autoantigènes, tels que les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I. Les cellules NK sont pleinement impliquées dans l'élimination des cellules tumorales, puisque les cellules néoplasiques perdent souvent l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, permettant aux cellules NK de déclencher ainsi leur lyse (135).

1.3.2.5.2 Réponse immunitaire spécifique (adaptative)

Les lymphocytes T cytotoxiques sont impliqués dans la réponse immunitaire adaptative. Ces cellules nécessitent une activation par les cellules présentatrices d'antigènes, comme les cellules dendritiques, avant de devenir cellules effectrices. Les cellules dendritiques sont attirées sur le site tumoral par les chimiokines produites par les cellules immunitaires innées. Les cellules dendritiques initient ensuite la phagocytose des cellules tumorales et les antigènes associés aux tumeurs sont incorporés dans le complexe majeur d'histocompatibilité de classes I et II (136). Les cellules dendritiques peuvent ainsi migrer vers les ganglions lymphatiques. Ces cellules exposent les antigènes tumoraux présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I aux lymphocytes T CD8+ cytotoxiques. La présentation efficace des antigènes tumoraux par les cellules dendritiques est favorisée par l'exposition préapoptotique de la calréticuline, par la sécrétion apoptotique de l'ATP, par la libération d'IL-1b par les cellules dendritiques et la libération de protéines HMGB1 (high mobility group protein B1) reconnues par les récepteurs Toll-like (TLR) (137-139). Les lymphocytes T CD8+ proliférant et atteignant leur maturité, accèdent au

microenvironnement de la tumeur où ils effectuent leurs fonctions cytotoxiques. Les cellules T-régulatrices (Tregs) forment une sous-population particulière des lymphocytes T (CD4+, CD25+ et Foxp3+). Elles sont impliquées dans la régulation immunitaire et peuvent indirectement réprimer la réponse immunitaire (140-142).

1.3.2.5.3 HDACi et immunomodulation

Il existe un nombre croissant d'études montrant que les HDACi peuvent renforcer l'immunité anti tumorale soit en affectant directement les cellules tumorales pour les rendre plus reconnaissables par le système immunitaire soit en modulant l'activité des cellules immunitaires et/ou la production de cytokines.

Les HDACi peuvent augmenter l'immunogénicité des cellules tumorales en majorant l'expression des protéines du MHC de classe I et II ainsi que l'expression des molécules d'adhésion co-stimulatrices comme CD40, CD80, CD86 et la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM1) (143, 144). De plus, il a récemment été montré que les HDACi peuvent induire l'expression de molécules en relation avec le MHC de classe I situées à la surface des cellules tumorales les MICA et MICB («MHC class I polypeptide-related sequence » A et B) (145, 146). MICA et MICB peuvent se lier au récepteur immunitaire activateur NKG2D (protéine du groupe 2D des cellules « natural killer ») à la surface des cellules « natural killer » et des lymphocytes T CD8. Les cellules tumorales exprimant MICA et MICB deviennent des cibles pour via les mécanismes de cytotoxicité dépendants du NKG2D. Ainsi, Armeanu *et al* ont montré que les cellules de carcinome hépatocellulaire traitées par HDACi présentent une surexpression des MICA et MICB ce qui n'est pas le cas des hépatocytes normaux (145). De plus, les cellules de carcinome hépatocellulaire traitées par HDACi dans ces expériences, sont efficacement lysées par les cellules « natural killer » d'une manière NKG2D dépendante (145).

Les HDACi peuvent également augmenter la réponse immunitaire anti tumorale en affectant l'activité des cellules immunitaires soit directement soit indirectement en modulant la sécrétion de cytokines. Par exemple, le SAHA peut réduire la maladie aigüe du greffon contre l'hôte (en anglais acute graft-versus-host disease : GVHD) après greffe allogénique de moelle osseuse qui est un des éléments majeurs du traitement de certaines hémopathies malignes. Cette réduction de la GVHD se fait par inhibition de cytokines pro-inflammatoires comme le facteur α de nécrose tumorale (TNFα) l'interleukine-1 (IL-1) et l'interferon-γ (IFNγ) qui ont un rôle central dans la pathogenèse de la GVHD (147). Toutefois on ne sait pas encore à l'heure actuelle si le mécanisme sous-jacent est lié au fait que les HDACi provoquent directement une hyper acétylation des histones au sein des promoteurs de gènes ou des régions amplificatrices de l'ADN (en anglais « enhancer regions ») ou si les modifications d'expression de ces cytokines sont secondaires à d'autres effets des HDACi. En effet, l'activité de régulateurs de gènes qu'exercent les protéines transmettrices du signal et activatrices de transcription STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1), STAT3 et le facteur nucléaire κB (NF-κB en anglais nuclear factor-κB) qui sont souvent considérés comme les facteurs de transcriptions clé de la régulation immunitaire,

est directement régulée par acétylation (148-150). Ceci suggère que les modifications de profile d'activité des cytokines et/ou leurs effets sur la réponse des cellules immunitaires après traitement par HDACi pourraient résulter d'une altération de l'acétylation de ces facteurs.

Situés dans le microenvironnement tumoral, les Tregs peuvent inhiber les lymphocytes T et en particulier les NK et impacter à la fois la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire spécifique. De nombreux HDACi peuvent moduler la génération ou les fonctions des Treg. La TSA et le vorinostat stimulent la prolifération des Tregs de souris et renforce leur fonction suppressive *in vivo* (151). L'entinostat et le vorinostat induisent, *in vitro*, des Tregs à partir de lymphocytes T humain stimulés CD4+ CD25-. Les HDACi de classe I et II comme le givinostat (ITF2357) renforce la polarisation des lymphocytes T à l'égard des Tregs Foxp3 alors que le givinostat réprime la polarisation des lymphocytes T pro inflammatoires Th17 (152). L'expression du gène FOXP3 est cruciale pour l'induction des Tregs et leur fonction. La protéine Foxp3 elle-même est un substrat des HAT et des HDAC. L'acétylation de Foxp3 par un pan HDACi comme la TSA stabilise la protéine et conduit à une augmentation du nombre de Tregs et à un phénotype suppresseur (151, 153-155). Il a également été montré que l'acétylation de Foxp3 peut être régulée par la HAT p300 et l'HDAC de classe III SIRT1 ce qui suggère que les HDAC de classe III puissent aussi réguler la fonction de Tregs (155). Une étude antérieure réalisée avec des Knock out de HDAC a montré que l'HDAC 6 et l'HDAC 9 contrôlent les fonctions de suppresseur des Tregs (156, 157). Les résultats de cette équipe indiquent que seuls les pan HDACi sont capables d'augmenter les fonctions de suppresseur des Tregs et que les HDACi spécifiques de classe I n'ont pas d'effet sur les Tregs. Toutefois, d'autres équipes ont montré que l'ensemble des HDACi testés y compris des HDACi spécifiques de classe I comme l'entinostat stimule les fonctions de suppresseur des Tregs humains (158). *Shen et al.* ont évalué l'effet des HDACi sur les Tregs dans le cadre de traitements anticancéreux (159, 160). Ils ont observés des résultats différents de ceux préalablement décrits dans des modèles de maladies auto-immunes et inflammatoires. En effet dans des modèles murins de cancer de prostate et du rein, l'entinostat inhibe l'expression de Foxp3 et la fonction suppresseur des Tregs de manière dose-dépendante. Les mécanismes de régulation de l'expression de Foxp3 par l'entinostat pourraient impliquer l'acétylation de la protéine STAT3 (159).

Il a également été montré qu'un autre HDACi de classe I, le Mocetinostat (MGCD0103 qui inhibe aussi HDAC11) peut également réprimer l'expression de Foxp3 de manière dose dépendante, alors que les HDACi spécifiques de classe II comme le MC1575 ou le MC1588 n'affectent pas le niveau de Foxp3 des Tregs. Il est intéressant de constater qu'*in vitro* le panobinostat (LBH589), un pan HDACi, à faible concentration induit également une réduction modérée du niveau de Foxp3. *In vivo* en fonction de la dose de panobinostat utilisée chez des souri BALB/c effet du panobinostat sur les Tregs est retrouvé in vivo un effet d'inhibition de la fonction suppresseur des Tregs est observé ou non (161). Le panobinostat a une affinité et action variable sur différents HDAC. Par exemple, l'IC50 du panobinostat pour l'HDAC3 est de 2.1nM mais l'IC50 du panobinostat varie entre 5.7 et 531nM pour les HDAC6, HDAC7 et HDAC9. Le panobinostat est ainsi capable d'inhiber les HDAC de classe I à de faibles concentrations alors qu'à des concentrations plus fortes il cible les HDAC de classe II après avoir saturé les HDAC de

classe I. Les données de *Shen et al.* montrent un effet opposé sur la régulation de la fonction suppresseur des Tregs par l'inhibition des HDAC de classe I et II. L'inhibition des HDAC de classe I aurait un effet inhibiteur de la fonction suppresseur des Tregs alors que l'inhibition des HDAC de classe II aurait un effet de stimulation de la fonction suppresseur des Tregs. Il a également été montré que les HDAC3 peuvent médier le développement et les fonctions des Tregs et qu'une délétion conditionnelle d'HDAC3 altère la fonction des Tregs (162). Ces éléments indiquent que les HDACi ont des effets complexes sur les Tregs et il semble donc particulièrement important de bien sélectionner l'HDACi à utiliser et les doses auxquelles l'administrer (Tableau 3) (161).

Pour clarifier le rôle du système immunitaire dans les effets des HDACi en situation physiologique *in vivo* West *et al.* ont utilisé des modèles précliniques murins syngéniques d'hémopathie maligne et de tumeurs solides. Ils ont montré qu'un système immunitaire intact est nécessaire à l'obtention d'un effet anti tumoral robuste sous traitement par des HDACi comme le vorinostat ou le panobinostat dans des modèles d'adénocarcinome colique et d'hémopathies malignes agressives (leucémie/lymphome) (163). En effet cette équipe a montré que les souris immunodéficientes traitées par HDACi présentant des lymphomes succombent plus rapidement que les souris immunocompétentes sauvages (wild type) traitées de la même manière. Toutefois, il est intéressant de noter que le traitement conventionnel par des chimiothérapies comme l'étoposide reste efficace chez les deux types de souris de manière équivalente. L'interferon-γ (IFNγ) et la voie de signalisation passant par le récepteur à l'IFNγ sont des éléments clés de l'effet anti tumoral des HDACi. Le vorinostat et l'IFNγ agissent de concert pour stimuler l'immunogénicité des cellules tumorales (163). Cette équipe a également montré que la combinaison du vorinostat et de l'a-galactosylceramide (a-GalCer), un agent inducteur de l'IFNγ, est significativement plus efficace dans le traitement des lymphomes qu'un traitement par vorinostat seul. Les lymphocytes B sont impliqués dans la réponse immunitaire anti tumorale induite par les HDACi mais pas les lymphocytes T CD8+ ou les NK (163). Ces données suggèrent que les HDACi ont un effet immunostimulant lorsqu'ils sont utilisés comme traitement anti tumoral. Des combinaisons thérapeutiques d'HDACi et d'immunothérapies méritent donc d'être considérées pour de futurs développements en clinique.

Tableau 3 - Effet immunomodulateur des HDACi (161)

HDAC inhibitors	Tumor	Exogenous transgene	Effector lymphocytes	Tregs	APCs	Suppressive myeloid cells
Dacinistat (Pan)	Increases antigen expression					
Romidepsin (class I)	Increases antigen expression and costimulation molecules		Inhibits proliferation of activated T cells, affects viability of activated T cells			
TSA (Pan)	Enhances antigen processing, presentation, costimulation		Reduces IFN-γ expression by NK; induces activation of naïve T cells; impairs T-cell viability; increases Blimp-1 and plasma cell differentiation	Stimulates Treg expansion and enhances their suppressive function	Reduces cytokines such as IFN-γ, IL-12 and IL-6 in mouse models; inhibits TLR-stimulated gene and macrophage function	Induces expansion of MDSCs from bone marow
VPA (class I and IIa)	Enhances antigen processing and presentation, induces MICA/B, ligands for activated NK	Improves amplification of oncolytic HSV	Prevents NK cytotoxicity, reduces IFN-γ by NK via decreasing NK activation receptors; inhibits B-cell differentiation		Prevents DC differentiation from human monocytes and migration; reduces macrophage response	Induces dfferentiation of MDSCs into macrophages and DCs
Butyrate (HDAC1,2,7)	Enhances costimulation and adhesion molecules		Reduces IFN-γ expression by NK; induces activation of naïve T cells; impairs T-cell viability; increases Blimp-1 and plasma cell differentiation			
Entinostat (class I)	Increases MHC class II		Increases activation receptors on NK, increases NK killing	Inhibits Foxp3 expression and Treg suppressive function	Prevents DC differentiation from human monocytes and migration	
Vorinostat (Pan)	Induces MICA/B, ligands for activated NK		Prevents NK cytotoxicity via reducing NK activation receptor	Stimulates Treg expansion and enhances their suppressive function	Reduces cytokines such as IFN-γ, IL-12 and IL-6 in mouse models	Induces expansion of MDSCs from bone marow; reduces nitric oxide production in peritoneal macrophages and delays tumor formation
AR-42 (pan)		Activates gene expression of CMV promoter-driven DNA vaccine				
Panobinostat (pan)			Toxic to activated T cells; enhances survival of adoptive transferred CD8 cells	Low dose inhibits tregs fundtion; high dose enhances Tregs function	Affects DC surface marker and inhibits DC function	
Rocilinostat (HDAC6)			Prevents skin inflammation by imparing CD8 T-cell function			
Givinostat (class I and II)				Induces differentiation toward Tregs		
Tubacin and tubastatin (HDAC6)				Enhances Treg suppressive function		
Mocetinostat (class I and HDAC11)				Inhibits Foxp3 expression		

APC: Antigen-presenting cell; CMV: Cytomegalo virus; DC: Dendritic cell; HSV: Herpes simplex virus; MDSC: Myeloid-derived suppressor cell; NK: Natural killer; TLR: toll-like receptor.

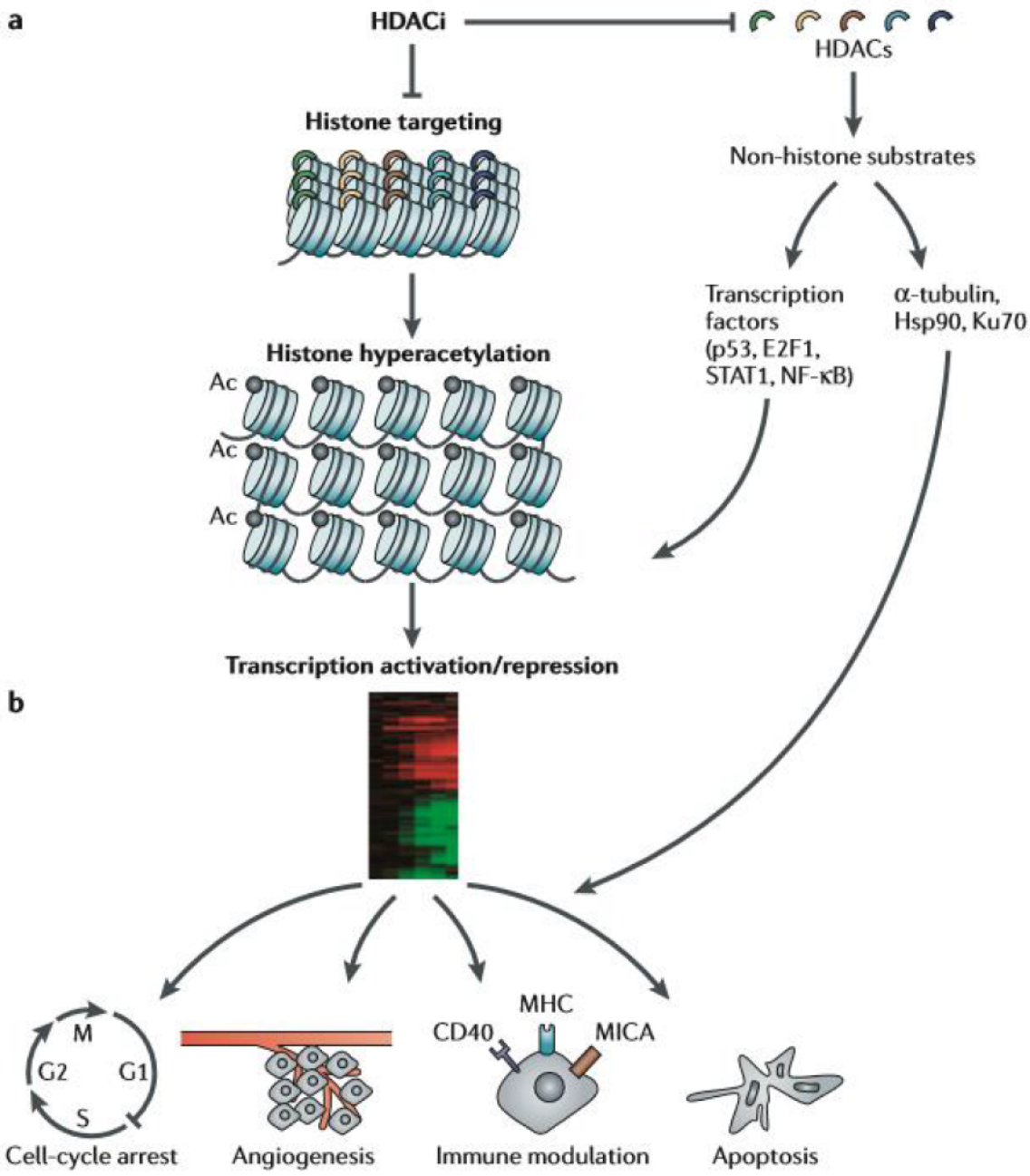


Figure 10 : Effets de l'inhibition des histones désacétylases sur les protéines non histone (45)

(a) Outre leur activité régulatrice de l'état d'acétylation des histones, les HDAC peuvent se lier, désacétyler et réguler l'activité de nombreuses protéines non histone comme des facteurs de transcription (tels que P53, E2F1, le facteur nucléaire NF-κB et des protéines aux fonctions biologiques variées comme l'α-tubuline, la protéine chaperonne Ku70 et la "heat-shock" protéine 90 (Hsp90). L'hyper acétylation de facteurs de transcription par les HDACi peut augmenter l'activité régulatrice de ces facteurs de transcription et contribuer aux modifications d'expression de gènes observées après hyper acétylation médiée par les HDACi. L'hyper acétylation de protéines comme les Ku70 et Hsp90 induite par les HDACi pourrait ne pas avoir

d'effet direct ni indirect sur l'expression des gènes mais être importante pour certaines fonctions biologiques comme l'induction de l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire.

(b) *Les HDACi peuvent impacter la croissance et la survie cellulaire à travers de nombreux effets biologiques. Les HDACi peuvent induire un arrêt du cycle cellulaire en G1/S par régulation positive de la cycline D Kinase N1A (CDKN1A) qui régule p21WAF1/CIP1 et/ou par régulation négative des cyclines qui contribuent également au contrôle du cycle cellulaire. Les HDACi peuvent réprimer l'angiogenèse par leur capacité à réduire l'expression de facteurs pro-angiogéniques comme le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF), le facteur 1α inductible par hypoxie (HIF1α) et les chimiokines au motif C-X-C du récepteur 4 (CXCR4). Les HDACi peuvent aussi avoir un effet immunomodulateur en augmentant les propriétés antigéniques de la cellule tumorale par régulation positive du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II (MHC), du CD40 et des molécules reliées au MHC de classe I (MICA) et en altérant l'expression de cytokines clés comme le facteur de nécrose tumoral α (TNFα), l'interleukine-1 et l'interféron- γ.*

1.3.3 Combinaison d'HDACi et d'autres drogues

Bien que les HDACi aient montré des effets prometteurs *in vitro* en monothérapie, le large spectre de réponse moléculaire et biologique qu'ils induisent, leur faible toxicité sur les cellules saines et certains résultats décevant en phase précoce chez l'homme poussent à penser que l'utilisation des HDACi en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques représente une voie plus prometteuse de développement clinique. Il a déjà été montré que les HDACi peuvent avoir un effet synergique avec de nombreux composés de structure et de mode d'action variés (59, 164, 165). Il existe un rationnel pour de nombreuses combinaisons avec les HDACi mais les HDACi ont également été testés en combinaison avec certains agents sans base mécanistique solide et cela a parfois permis de mettre en évidence des mécanismes moléculaires qui aident à expliquer certains effets synergiques.

1.3.3.1 HDACi et autres modulateurs de la transcription :

La leucémie aiguë promyélocytaire (acute promyelocytic leukaemia, APL) est un sous-type des leucémies aiguës non lymphoblastiques (ou leucémies aiguës myéloblastiques (LAM)) dénommé variant M3 dans la classification internationale FAB (France, Amérique, Grande-Bretagne). L'APL représente 5 à 15 % des LAM survenant chez l'enfant. Les symptômes ne sont pas spécifiques, étant similaires à ceux des autres sous-types de LAM (fièvre, malaise, pâleur, hémorragies). Cependant les patients présentent un risque hémorragique plus sévère, en raison d'une thrombopénie qui résulte d'une insuffisance médullaire et d'une consommation plaquettaire accrue. Cette consommation excessive est causée par la libération granulaire des promyélocytes

et les analyses biologiques mettent en évidence des signes de coagulation intravasculaire disséminée. Les promyélocytes sont caractérisés par une translocation réciproque et spécifique entre les chromosomes 15 et 17, t(15,17), responsable de la fusion du gène PML de la leucémie promyélocytaire avec le gène tronqué du récepteur alpha de l'acide rétinoïque (RAR-alpha). Ce remaniement chromosomique entraîne la synthèse d'un récepteur à l'acide rétinoïque anormal qui bloque la différenciation des promyélocytes. La leucémie aiguë promyélocytaire peut être traitée dans plus de 90% des cas par l'acide transrétinoïque (ATRA) qui induit la maturation des cellules malignes. Le traitement repose sur l'association de la chimiothérapie (principalement des anthracyclines) et l'ATRA. Dans l'APL le recrutement aberrant des HDACs via l'expression de PML–RARα est considéré comme un évènement initiateur de carcinogénèse. Il y a donc un rationnel logique pour tester les HDACi en association avec l'ATRA dans cette indication. L'efficacité de cette combinaison HDACi et ATRA a été démontré à la fois sur des modèles expérimentaux *in vitro*, *in vivo* et en clinique (166-168).

Les rétinoïdes ont également été utilisés dans le traitement des neuroblastomes et certains bénéfices cliniques ont été retrouvés mais il existe des résistances intrinsèques et acquises à ces traitements (169). Il a donc été proposé dans ces formes résistantes de tester la combinaison des rétinoïdes et d'HDACi avec des résultats précliniques encourageants (170).

Il peut également être intéressant de combiner les HDACi avec des agents déméthylants de l'ADN (en anglais DNA-demethylating agents) comme la 5-azacytidine dans le cadre de traitements antinéoplasiques. Les gènes suppresseurs de tumeur qui sont rendu transcriptionnellement silencieux par méthylation de l'ADN pourraient être réactivés de manière plus efficace par une déméthylation de l'ADN et une hyper acétylation des histones réalisées de manière séquentielle (171). Ce schéma thérapeutique a été testé en clinique dans le cadre de syndromes myélodysplasiques et de leucémies myéloïdes aigues (AML). Des réponses partielles et complètes ont été observées en concomitant d'une déméthylation globale de l'ADN, d'une hyper acétylation des histones et d'une activation de gènes préalablement silencieux comme CDKN1A and CDKN2B (qui codent pour p21WAF1/ CIP1 et p15INK4b, une protéine inhibitrice des kinases dépendantes des cyclines) (164, 172).

1.3.3.2 HDACi et chimiothérapies conventionnelles :

Etant donné la toxicité clinique minime des HDACi et la capacité des HDACi à abaisser le seuil apoptotique des cellules tumorales, la combinaison d'HDACi et de chimiothérapies conventionnelles a été testée. Avec une approche quelque peu empirique, des effets pro-apoptotiques additifs et synergiques de combinaisons d'HDACi et de diverses chimiothérapies ont été rapportés sur différentes lignées cellulaires tumorales humaines *in vitro* et *in vivo* (59, 164). Pour donner quelques exemples on peut noter que la combinaison du LAQ824 ou du SAHA avec la gemcitabine (un antimétabolite) et le docétaxel ou l'épothilone B (des agents antimicrotubules) a montré une potentialisation de l'effet cytotoxique sur des lignées cellulaires de cancer du sein (173,

174). Le LAQ824 a également montré un effet synergique avec la déxamethasone, un traitement classique des rechutes de myélomes (175). Cet effet synergique a été au moins en partie attribué à une stimulation de la voie de l'apoptose. Il a été montré que l'apoptose induite par la déxaméthasone implique un relargage d'activateurs des caspases dérivées des mitochondries comme SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases) et une activation de la caspase 9 mais pas de la caspase 8 (176). Le relargage des protéines mitochondriales comme SMAC dans le cytosol conduit à une neutralisation de l'effet inhibiteur de l'apoptose des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) sur la caspase 9 et permet à la déxaméthasone d'augmenter la cytotoxicité induite par le LAQ824 qui est médiée par la caspase 9. De plus, la caspase 8 est activée par le LAQ824, mais pas par la déxaméthasone, ce qui apporte un signal apoptotique supplémentaire à celui déjà induit par la déxaméthasone.

Un effet cytotoxique synergique a également été observé sur des cellules de cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) après traitement par un HDACi le CI-994 en combinaison avec la gemcitabine ou le docétaxel (177). Dans un essai thérapeutique de phase I incluant des patients présentant des tumeurs solides de stade avancé recevant le CI-994 et du paclitaxel il a été observé des réponses tumorales partielles et complètes et le schéma thérapeutique a été considéré acceptable (178). Un essai de Phase III comparant l'efficacité de la gemcitabine à celle de la combinaison de gemcitabine et de CI-994 a été initiée chez des patients présentant des CBNPC. Mais les résultats d'un essai de phase II de combinaison de gemcitabine et de CI-994 dans les cancers du pancréas avancés a montré l'absence de bénéfice en terme de survie globale, de taux de réponse ou de temps jusqu'à progression de la maladie tumorale. De plus, dans cet essai la combinaison de gemcitabine et CI-994 a apporté une dégradation de la qualité de vie et une augmentation de la toxicité hématologique et semble donc inférieure à la gemcitabine en monothérapie (179).

1.3.3.3 HDACi et ligands des récepteurs de mort :

La capacité des HDACi à induire l'expression d'un grand nombre de récepteurs de mort et de leurs ligands ainsi que la capacité des HDACi à abaisser le seuil apoptotique des cellules traitées par HDACi, constituent des bases moléculaires solides pour développer des études de combinaison d'HDACi et de stimuli des récepteurs de mort. En effet un puissant effet synergique sur l'apoptose des cellules tumorales a été observé après traitement par différents HDACi combinés à des activateurs de la voie de TRAIL ou de Fas (180-187). Les bases mécanistiques de cet effet synergique restent mal connues et cet effet pourrait être dépendant du type cellulaire comme pour beaucoup des effets des moléculaires et biologiques des HDACi. Cependant un certain nombre d'études ont démontré que le traitement par HDACi augmente l'expression de récepteurs de mort pro apoptotiques, stimule la formation de complexes de signalisation induisant la mort (death-inducing signalling complex, DISC) et/ou régule négativement les inhibiteurs de la voie de signalisation des récepteurs de mort comme les domaines de mort associés à Fas (FADD),

l'inhibiteur d'apoptose 2 (IAP2) ou d'autre inhibiteur d'apoptose comme XIAP (180, 182, 184-187). Ces données montrent que les HDACi favorisent l'activation de la voie des récepteurs de mort. En effet, l'effet synergique des HDACi et des ligands de récepteurs de mort peut être totalement bloqué par la surexpression de dominant négatif de FADD (184, 185). Des doses sub-létales d'HDACi peuvent restaurer la sensibilité de cellules TRAIL-résistante à l'apoptose médiée par TRAIL (188). Un autre modèle pour expliquer les effets combinés des HDACi et des ligands de récepteurs de mort est que le stimulus qu'ils produisent permet simultanément d'activer la voie intrinsèque et la voie extrinsèque de l'apoptose, ce qui aboutit à une majoration de la mort cellulaire. Cette hypothèse est renforcée par des études démontrant que l'inhibition de la voie des récepteurs de mort via la surexpression de dominant négatif de caspase 8 ou FADD, ou l'inhibition de la voie intrinsèque de l'apoptose par une surexpression de BCL2 ou de BCL-XL abolissent l'effet synergique pro apoptotique médié par les HDACi et TRAIL à court terme (24h) (183). Toutefois seules les cellules avec une voie de signalisation des récepteurs de mort déficiente (via la surexpression de dominant négatif de caspase 8) et non les cellules sur exprimant BCL2 ou BCL-XL, conserve leur capacité clonogènes après traitement par sodium butyrate (un HDACi) et TRAIL (183). L'ensemble de ces données montrent que les HDACi hyper sensibilisent les cellules à l'apoptose via la voie des récepteurs de mort ce qui constitue un rationnel intéressant pour développer ce type de combinaison thérapeutique en clinique.

1.3.3.4 HDACi et inhibiteurs de kinases :

Les HDACi en monothérapie peuvent diminuer l'expression des ARN messagers de BCR–ABL et provoquer l'ubiquitination et la dégradation de BCR–ABL en inhibant HDAC6. Les HDACi ont donc logiquement été testés en combinaison avec l'imatinib (Gleevec; Novartis), un inhibiteur de la kinase ABL capable de tuer les cellules de leucémie myéloïde chronique (LMC) BCR–ABL-positives avec une efficacité clinique reconnue (189). L'ensemble des HDACi testés en combinaison avec l'imatinib a un effet synergique cytotoxique sur les cellules de LMC exprimant BCR–ABL (190-195). Il est important de noter que la combinaison HDACi/imatinib est efficace contre les LMC réfractaires à l'imatinib et que la combinaison a un effet cytotoxique similaire sur les LMC BCR-ABL sauvages et les formes T315I mutées de LMC BCR-ABL (qui sont résistantes à l'imatinib seul) (190-192). L'effet synergique de cette combinaison sur les cellules BCR-ABL s'explique probablement par l'acétylation de Hsp90 du fait des HDACi et l'inhibition de l'activité kinase BCR-ABL du fait de l'imatinib. De plus, comme l'inhibition de la voie MEK/ERK augmente l'apoptose induite par les HDACi et que cette voie se trouve directement en aval de BCR-ABL, il est possible que la suppression de l'activité MEK/ERK par l'imatinib renforce également l'apoptose médiée par les HDACi.

1.3.3.5 HDACi et régulateurs de la dégradation par le protéasome:

Les HDACi ont un effet synergique avec des inhibiteurs de HSP90 comme la 17-allyl-aminodemethoxy geldanamycine (17-AAG) qui induit la dégradation de différentes « protéines clientes » de HSP90 (193, 196, 197). Tout comme la combinaison HDACi et imatinib, la combinaison HDACi et 17-AAG est efficace sur les LMC exprimant BCR-ABL sauvage ainsi que les formes de LMC mutées réfractaires à l'imatinib en induisant une activation de la dégradation par le protéasome de la protéine de fusion oncogénique (196). De plus, les HDACi et la 17-AAG induisent un effet pro apoptotique synergique dans les cellules de LAM exprimant de manière constitutive une forme oncogénique active de FLT3 qui est une protéine cliente de Hsp90 et induisent également la polyubiquitination et la dégradation de FLT3 (193). Les mécanismes précis expliquant cette synergie ne sont pas complètement définis mais la régulation de NF-κB pourrait être un élément important du niveau de réponse apoptotique induite par les HDACi. De plus, la 17-AAG peut réprimer l'activité de NF-κB en induisant la dégradation de la protéine kinase β IκB (IKKβ) qui est une « protéine cliente » de Hsp90 renforçant ainsi l'apoptose induite par les HDACi (198). Par ailleurs, comme l'hyper acétylation de Hsp90 diminue son affinité pour l'ATP et que l'ATP est essentielle pour la fonction des protéines chaperonnes, le traitement par HDACi pourrait abaisser le seuil d'inhibition de Hsp90 par la 17-AAG, ce qui pourrait conduire à l'augmentation de l'ubiquitination et de la dégradation des protéines clientes de Hsp90 que l'on observe lors du traitement des cellules par la combinaison d'HDACi et de 17-AAG.

Les HDACi ont également un effet synergique avec les inhibiteurs du protéasome comme le bortezomib (Velcade; Millennium) qui stabilise certaines protéines (199-203). Bien que les mécanismes sous-jacents n'aient pas été spécifiquement identifiés, la combinaison d'HDACi et du bortezomib induit une augmentation notable des dérivés réactifs de l'oxygène (en anglais, reactive oxygen species : ROS) au sein des cellules traitées et l'utilisation d'un traitement anti-radicaux libres (capable de séquestrer les radicaux libres) bloque l'apoptose induite par la combinaison d'HDACi et de bortezomib (200, 201). Les inhibiteurs du protéasome sont connus pour être de puissants inhibiteurs de l'activité de NF-κB et le bortezomib peut totalement bloquer l'activation de NF-κB induite par les HDACi (200, 201). Mais NF-κB active supprime l'accumulation des ROS et le bortezomib pourrait augmenter l'effet pro apoptotique des HDACi en inhibant l'activation de NF-κB et par conséquent en favorisant l'accumulation de ROS. Cet effet peut paraître paradoxal dans la mesure où NF-κB est une protéine de la superfamille des facteurs de transcription impliquée dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire. Cette dernière est associée aux facteurs anti-apoptotiques. En effet, son activation par la libération de sa protéine inhibitrice (IKB) déclenche la transcription de gènes anti-apoptotiques dans le noyau. Elle effectue donc un rétrocontrôle négatif de l'apoptose habituellement.

Il pourrait y avoir une explication mécanistique différente liée au rôle essentiel d'HDAC6 dans la formation de l'aggrésome (204). L'aggrésome est un organite du cytoplasme vers lequel sont adressées les protéines anormales où elles sont traitées pour pouvoir être éliminées. L'élimination de ces protéines anormales est un élément critique pour la survie cellulaire.

L'aggrésome séquestre des protéines anormales (qui si elles ne sont pas séquestrées induisent un stress cellulaire toxique pour la cellule) et facilite la dégradation de ces protéines par le protéasome (205). L'HDAC6 se lie aux protéines anormales polyubiquitinées et les adresse à l'aggrésome. Cette fonction est dépendante de l'activité enzymatique de l'HDAC6 (204). La combinaison de tubacin (un HDAC inhibiteur) et de bortezomib majore de manière importante le taux de protéines polubiquitinées, active la réponse au stress cellulaire médiée par JNK et la augmente la mort cellulaire ce qui tend à corroborer l'hypothèse selon laquelle l'inhibition des voies de l'aggrésome et du protéasome induisent l'apoptose due à l'accumulation de protéines anormales (199).

1.3.3.6 HDACi et anti angiogéniques :

Les agents anti angiogéniques interfèrent avec la formation des nouveaux vaisseaux tumoraux et sont actifs préférentiellement lorsque la masse tumorale reste limitée, essentiellement à la périphérie de la tumeur. Comme nous l'avons vu précédemment les néo vaisseaux tumoraux sont non structurés, avec des shunts artério-veineux, des thrombi et des anomalies de la couverture péricytaire, ce qui favorise l'hypoxie. Ils sont le résultat d'un déséquilibre dans la balance pro angiogéniques / anti angiogénique nécessaire à la formation normale des vaisseaux. L'inclinaison vers le pro angiogénique conduit à une formation anarchique de vaisseaux.

Le rationnel de la thérapie anti angiogénique repose sur l'exploitation d'un effet tumoral cytostatique rendu possible par l'induction d'une régression de la vascularisation anarchique, voire une normalisation vasculaire au sein de la tumeur. Les agents anti angiogéniques exercent leur activité en normalisant la vascularisation tumorale via un rétablissement de l'équilibre pro angiogéniques / anti angiogénique nécessaire à la bonne structuration des vaisseaux. Ainsi, ils permettent d'augmenter l'oxygénation tumorale, de stabiliser et de réorganiser le réseau des vaisseaux tumoraux durant une période transitoire appelée « fenêtre vasculaire » (206, 207). Lorsque le schéma d'administration est approprié, il devient possible d'augmenter l'oxygénation des cellules tumorales grâce aux agents anti angiogéniques (208). A ce jour, la principale cible des agents anti angiogéniques en cours de développement est la voie du VEGF, qui par ailleurs constitue, avec le FGF, l'un des facteurs angiogéniques sécrétés par la cellule tumorale en situation d'hypoxie sous l'effet de la stabilisation de HIF-1. Le VEGF possède une affinité étroite pour trois récepteur tyrosine kinase présents à la surface des cellules de l'endothélium vasculaire : VEGFR1, VEGFR 2, et VEGFR3. C'est un acteur clef de la survie, de la prolifération et des capacités de migration des cellules endothéliales via les voies PI3k/Akt, RAS/Raf/MEK/ERK et p38/MAPKAPK2-3 (MAPK activated protein kinase)/hsp27 (208, 209). En parallèle, le VEGF active la phospholipase C gamma (PLC-γ), qui active la protéine kinase de type C (PKC) (une protéine sérine thréonine kinase dépendant du calcium et des phospholipides), qui d'une part active la voie des MAP kinases et d'autre part augmente les concentrations intracellulaires de calcium. Cette augmentation de la concentration calcique entraine l'activation de la phospholipase A et de l'oxyde

nitrique synthase (NOS). L'augmentation de la production de NO (monoxyde d'azote) augmente la perméabilité vasculaire, et donc favorise l'augmentation de la pression interstitielle, facteur d'hypoxie et d'angiogenèse. La signalisation en aval du VEGF qui fait intervenir la voie des FAK (focal adhesion kinase) et de la paxilline favorise la migration cellulaire et le processus métastatique (210).

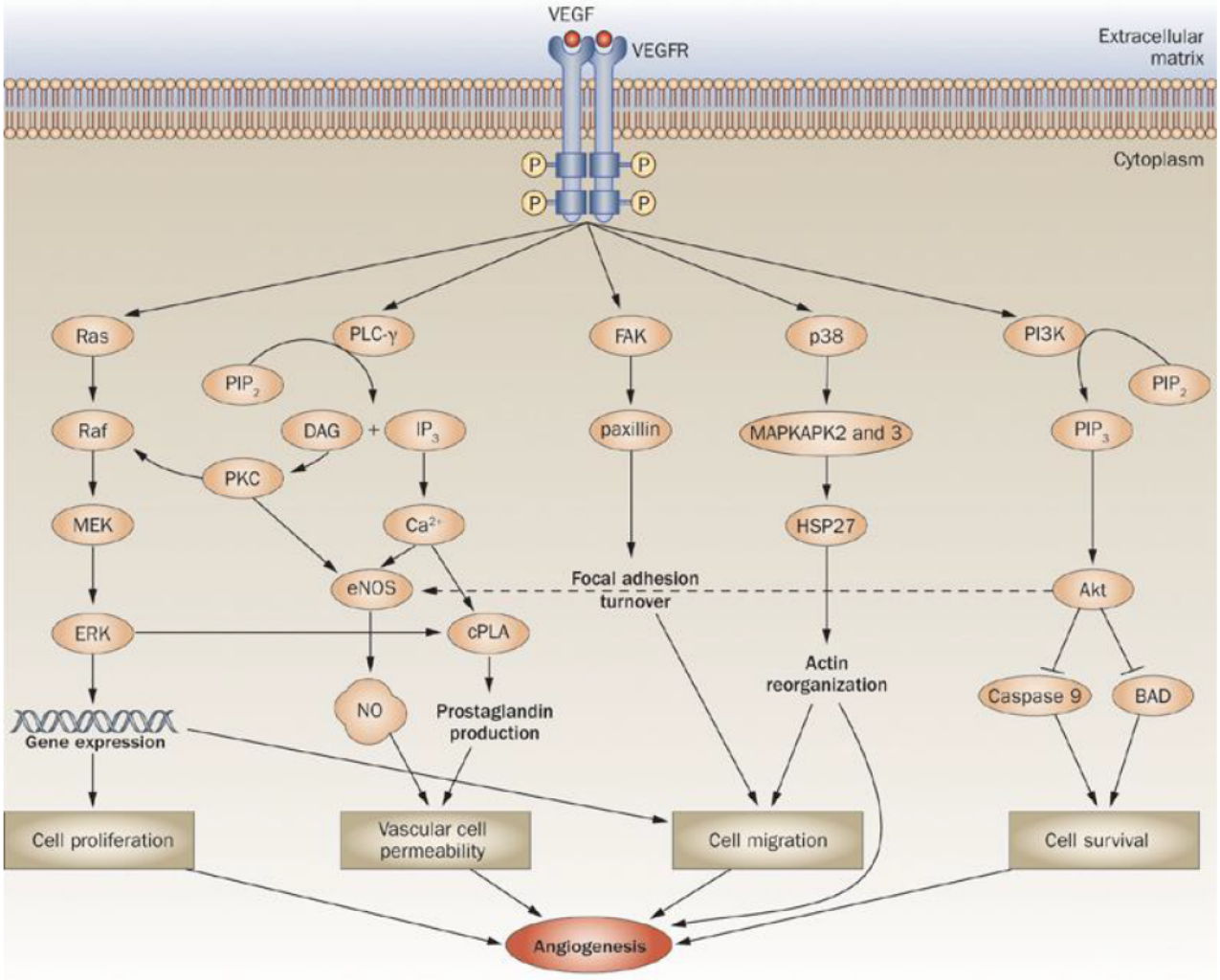


Figure 11 : Voies de signalisation du VEGF dans la cellule endothéliale (210)

1.4 PLACE DE LA RADIOTHERAPIE ET CONCEPT DE RADIOSENSIBILISATION:

Environ 50 % des patients pris en charge pour une tumeur solide reçoivent une radiothérapie dans l'histoire de leur maladie. Il y a 30 ans, Suit et Westgate avaient montré que le bénéfice en survie lié à la radiothérapie était principalement lié au contrôle local. L'amélioration du contrôle local avait également un effet indirect sur la probabilité de survenue de métastases, car celles-ci pouvaient être secondaires à l'évolution de la tumeur primitive ou à sa récidive (211). De même, le « Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group » (EBCTCG) a démontré en cancérologie mammaire avec plus de 15 ans de recul que la radiothérapie réduit le risque de

récidive locale, le risque de récidive locorégionale et améliore la survie spécifique et la survie globale. La méta analyse de ce groupe actualisée en 2011 confirme également qu'après traitement conservateur d'un cancer du sein la radiothérapie permet d'éviter 1 mort par cancer du sein pour 4 récidives locales évitées à 10 ans. Ce constat reste valable et le bénéfice en contrôle local lié à la radiothérapie continue d'être étroitement associé à un bénéfice en survie (212).

1.4.1 Mécanismes d'action des rayonnements ionisants :

Lors d'une irradiation, les rayonnements ionisants utilisés déposent de l'énergie dans la matière irradiée. Cette énergie se mesure en Gray (Gy) et 1 Gy équivaut à 1 joule/Kg de matière. L'irradiation provoque un ensemble de phénomènes que l'on peut diviser en cinq étapes majeures :

- La première est l'étape physique. Elle correspond aux tout premiers instants après l'irradiation (< 10^{-15} s) aboutissant à la création d'espèces excitées ou ionisées. C'est ce que l'on appelle l'effet direct.

- La deuxième est une étape physico-chimique. Elle survient entre 10^{-15} s et 10^{-12} s et aboutit à la thermalisation du milieu puis à la formation d'espèces radicalaires comme les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), OH. , H. et des électrons aqueux e- via la radiolyse de l'eau. C'est ce que l'on appelle l'effet indirect.

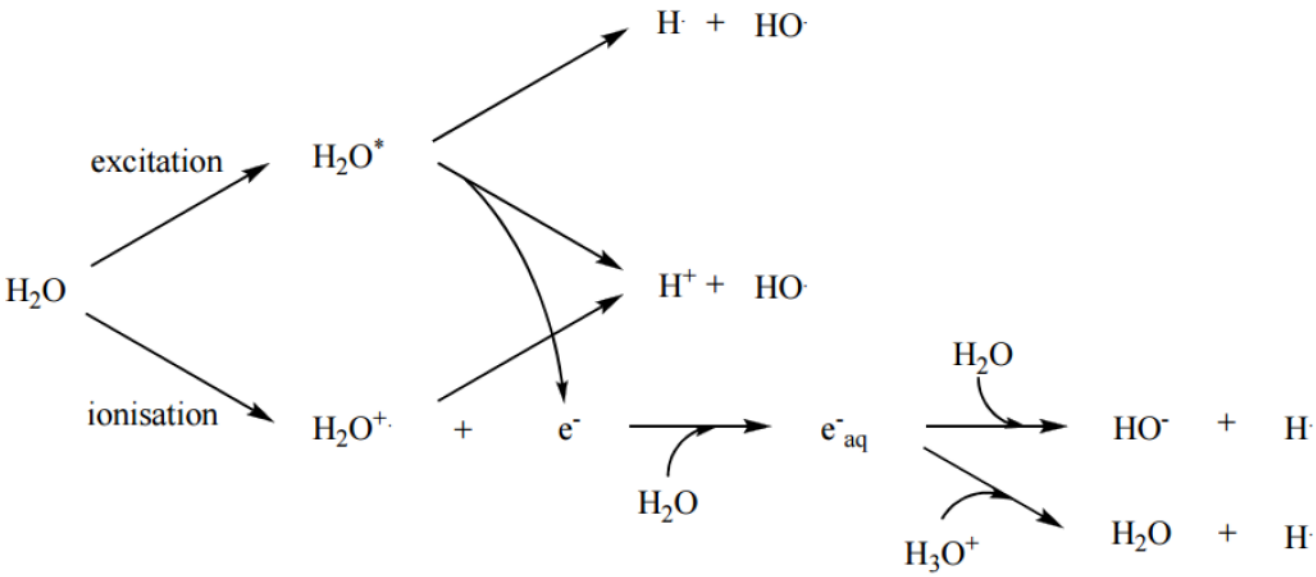


Figure 12 : Radiolyse de l'eau

- La troisième étape est une étape chimique. Elle survient entre 10^{-12} s et 10^{-6} s et correspond à la diffusion des radicaux libres.

- La quatrième étape est l'étape « biochimique ». Elle débute alors avec les réactions entre espèces radicalaires et biomolécules engendrant leur dégradation ou leur endommagement.

-La cinquième étape est l'étape « biologique ». Elle permet la prise en charge des dégradations et la réparation des biomolécules. Les systèmes de réparation, plus ou moins fidèles, peuvent durer plusieurs heures. Si la réparation n'a pas lieu ou ne se fait pas de manière fidèles des lésions moléculaires pouvant être graves apparaissent. Les cellules comportant ces anomalies peuvent soit être éliminées par différents mécanisme de mort cellulaire soit survivre avec ces anomalies ce qui peut conduire à l'apparition de différentes pathologies et en particulier à la cancérogénèse (213). De même dans le cas de l'irradiation de cellules cancéreuses celles-ci peuvent soit s'orienter vers différents mécanismes de mort soit survivre et comporter alors des mutations ou anomalies pouvant leur conférer des caractéristiques ou un phénotype différents de ceux du clone initial dont elles proviennent.

L'interaction des radicaux libres avec l'oxygène (O^2) à proximité conduit à la formation de radicaux peroxyles ROO. et de radicaux anions superoxydes O^2.- à partir de O^2 et d'électrons aqueux (e-aq) qui peuvent réagir avec les molécules d'eau pour former $HOO^{\cdot}$. $ROO^{\cdot}$ et $HOO^{\cdot}$ sont des radicaux libres hautement réactifs. La présence d'oxygène majore donc la formation des radicaux libres sous formes de ROS ce qui majore les dommages engendrés par l'irradiation. C'est ce que l'on appelle l'effet oxygène qui est donc un effet radio sensibilisant.

Les dommages causés par les radiations ionisantes par effet direct ou indirect touchent la plupart des biomolécules telles que l'ADN, les protéines, les sucres, les alcools ou les lipides.

1.4.1.1 Dommages des protéines

Les radicaux libres réagissent avec les acides aminés, les peptides et les protéines par abstraction d'hydrogène, transfert d'électron ou addition. Les dommages oxydatifs induits sur les protéines par les radicaux libres peuvent conduire à des modifications structurales (dimérisation par pontage intra- ou inter-protéines, agrégations, fragmentations, réarrangements, modification des acides aminés) et fonctionnelles (perte d'activité enzymatique, altération du processus de protéolyse). Le radical hydroxyle, groupement électrophile, oxyde préférentiellement les sites à forte densité électronique et ce radical va attaquer soit le squelette peptidique, soit les chaînes latérales. Compte tenu de la diversité des chaînes latérales des acides aminés, de nombreux radicaux peuvent donc être formés suite à l'attaque radicalaire.

1.4.1.2 Dommages des lipides

Les membranes cellulaires sont essentiellement composées d'acides gras polyinsaturés (AGPI). Ceux-ci sont des cibles de choix pour les ROS tels que le radical hydroxyle capable

d'arracher un proton sur un carbone en α de deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué ensuite oxydé en radical peroxyl (214). Ainsi, lors d'irradiations, les radicaux hydroxyles peuvent initier la peroxydation lipidique par abstraction d'un proton de la chaîne aliphatique de l'acide gras (LH) aboutissant à un radical alkyl (L.). Le radical résultant peut, s'il n'y a pas réarrangement entre deux radicaux lipidiques, réagir avec de l'oxygène pour donner le radical peroxyle $LO_2^{\cdot}$. Le radical peroxyle va réagir avec un acide gras adjacent pour donner un hydro peroxyde lipidique et un autre radical alkyl L. Les hydro peroxydes peuvent être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes et en alcanes qui sont toxiques pour la cellule.

1.4.1.3 Dommages de l'ADN

En cancérologie la cible principale reste toutefois l'ADN car c'est elle qui permet la transmission de l'information génétique d'une cellule à ses descendantes et qui garantit le maintien de l'intégrité génétique d'un individu. Des changements dans l'intégrité structurale, par altération des bases ou des sucres ainsi que par modification dans la séquence des nucléotides qui composent la double hélice de l'ADN, peuvent induire des erreurs dans le code génétique de la cellule et ainsi interférer avec la réplication ou la transcription du génome. L'ADN, de par son rôle dans l'organisme, est la cible privilégiée de l'irradiation en termes d'impact biologique cellulaire. En effet, les dommages subis par l'ADN ont été établis comme la source majeure des effets biologiques observés. Par exemple, en 1977, Warters *et al.* (215) montrent que la toxicité de l'I^{125} radioactif dépend de son site d'incorporation et engendre 300 fois plus de toxicité s'il est absorbé sur l'ADN que s'il est absorbé sur les membranes. Depuis, cet effet a été confirmé par de nombreuses études, et l'ADN, bien que n'étant pas la cible unique de l'irradiation, reste la molécule cible majeure.

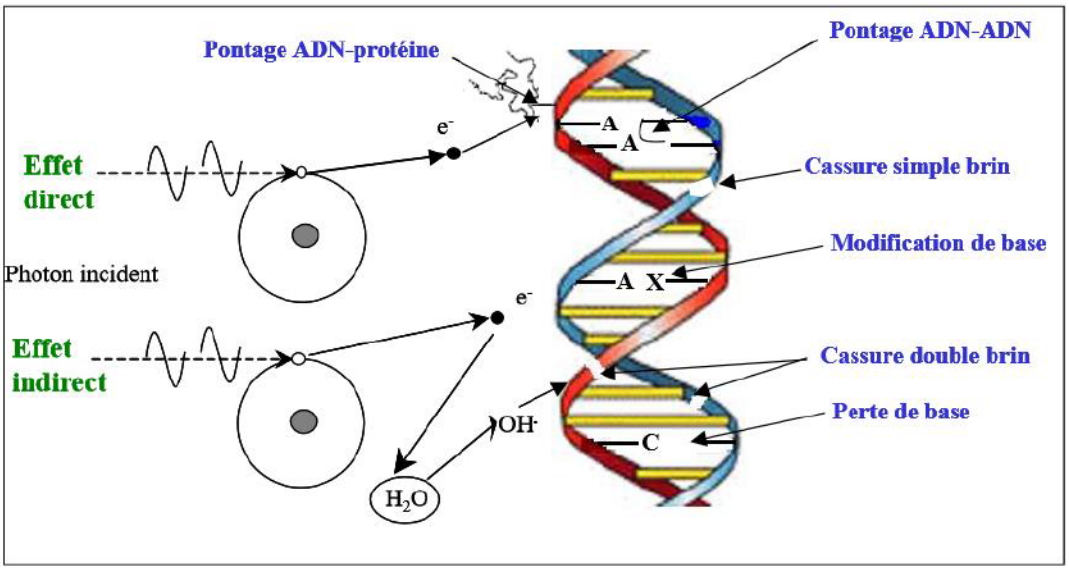


Figure 13 : Représentation schématique des lésions de l'ADN induites par les effets directs et indirects des rayonnements ionisants (adapté de C. Prouillac, schéma non publié)

:

Différents types de lésions de l'ADN peuvent être causées par les radiations ionisantes. Ces dommages peuvent être classés en deux grandes catégories : les cassures de l'ADN et les lésions ou modifications de bases.

1.4.1.3.1 Les cassures simple et double brin de l'ADN

Les cassures simple et double brin de l'ADN sont dues à une rupture de la chaîne sucre-phosphate liant les bases de l'ADN entre elles. Les cassures simples brin représentent une part importante des dégâts engendrés par l'irradiation (environ 1000 par Gy et par cellule pour une irradiation gamma). Les cassures double brin sont plus rares (40 par Gy et par cellule pour une irradiation gamma). Elles correspondent à deux cassures sur les brins opposés de l'ADN situées à moins de dix paires de base l'une de l'autre. Elles sont beaucoup plus dangereuses pour l'organisme et sont reconnues comme première cause de létalité cellulaire lors d'une irradiation (216, 217).

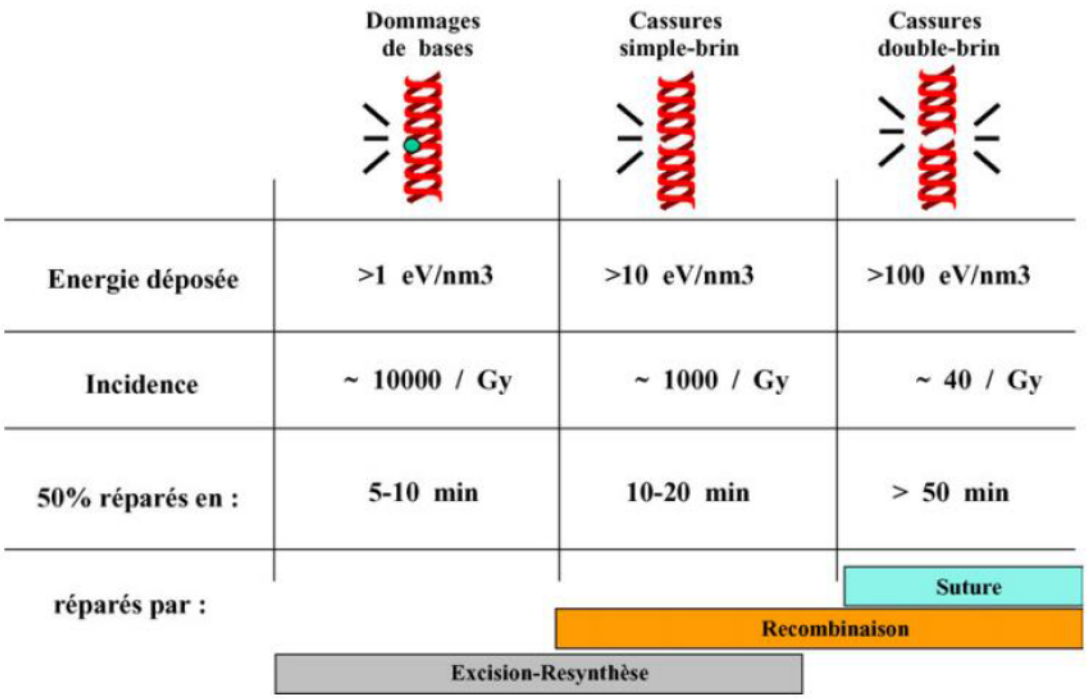


Figure 14 : Principaux dommages radio induits de l'ADN et leurs spécificités (217)

La densité d'énergie déposée conditionne le type biochimique des dommages de l'ADN, leur incidence par Gy ainsi que leur demi-vie moyenne de réparation. Les valeurs numériques correspondent ici aux rayons X émis par une irradiation de 200 kV. Plus la densité d'énergie déposée est élevée, plus le dommage créé est lent à réparer.

Ces cassures peuvent être issues soit d'une particule dégradant les deux brins, soit de deux dégradations de type cassure simple brin. Elle est dite homologue si elle se produit au niveau de la même paire de bases et hétérologue dans le cas contraire. Les ruptures hétérologues sont les plus fréquentes. Une cassure simple ou double brin peut conduire à une perte définitive de l'information génétique contenue dans la zone lésée. Ainsi, la dégradation de l'ADN par cassure simple ou double brin peut être considérée comme un des effets les plus lourds de conséquence de l'irradiation. Nous noterons aussi que ces cassures sont dues aux deux effets : à l'effet direct, s'apparentant à une ionisation directe de l'ADN, ainsi qu'à un effet indirect dû à la production de ROS dont les radicaux hydroxyles, généralement modélisés *in vitro* par réaction de Fenton, ou les électrons libres aqueux. La première explication de la cassure du squelette de l'ADN est l'abstraction du proton H4' par les radicaux hydroxyles aboutissant à la formation de phosphoglycolate et de propénal (218). Le second type d'oxydation possible dû aux radicaux hydroxyles est la formation de 5'-aldéhyde par abstraction du proton en H5'. Des pontages intra ou inter chaînes ou des pontages ADN/protéines environnantes peuvent aussi se former lors d'irradiations dans le cas où deux radicaux sont produits à la fois dans l'ADN et dans une protéine. En général, le pontage est observé entre les acides aminés « tyrosine » des protéines et les bases pyrimidiques de l'ADN.

1.4.1.3.2 Les dommages du cytosquelette de l'ADN

Les dommages du cytosquelette de l'ADN peuvent être dus à la modification ou à la destruction des bases, à des phénomènes de pontage et de formation de dimères ou à l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique. Ces dégâts sont prépondérants (environ 10 000 dommages de base par Gy et par cellule pour une irradiation gamma) et sont facilement réparables avec un temps de demi-réparation de l'ordre de 5 à 10 min (217). Les bases dégradées sont dans certains cas stables, mais de nombreuses modifications induisent leur instabilité et leur dégradation. De plus, la toxicité et l'effet mutagène de certaines bases modifiées sont réels. Nous pourrons noter que les bases pyrimidiques sont plus radiosensibles que les bases puriques. Les modifications des bases peuvent être dues soit à l'effet direct soit à l'effet indirect. Dans le cas de l'effet indirect, le premier effet des radicaux hydroxyles sur les nucléosides est l'oxydation des doubles liaisons des bases, généralement en position C5 et C6 des bases pyrimidiques (cytosine, thymine) et C4 et C8 des bases puriques (adénine, guanine).

1.4.2 Mécanismes de réparation des dommages

Les mécanismes de réparation de l'ADN sont complexes, et leur mise en jeu, finement régulée, dépend du type de lésion à réparer. Les cassures double brin (CDB), qui constituent les principales lésions létales après exposition aux rayonnements ionisants, sont réparées par le système de réparation par suture non homologue (en anglais, non homologous end-joining, NHEJ) et la recombinaison homologue (RH) (219). Les adduits alkyles formés au niveau de l'O6 guanine, sont réparés par un mécanisme de réversion directe faisant intervenir une enzyme de réparation appelée O6-methylguanine DNA methyltransférase (MGMT). Les mésappariements de base survenant lors d'erreurs des polymérases sont pris en charge par le système MMR pour « missmatch repair » en anglais. Les sites abasiques sont réparés par le système BER (Base excision Repair), les adduits formés par certains agents anticancéreux (alkylants, sels de platine) ou les dimères de thymidine formés après exposition aux rayonnements ultraviolets sont réparés par le système NER (nucleotide excision repair).

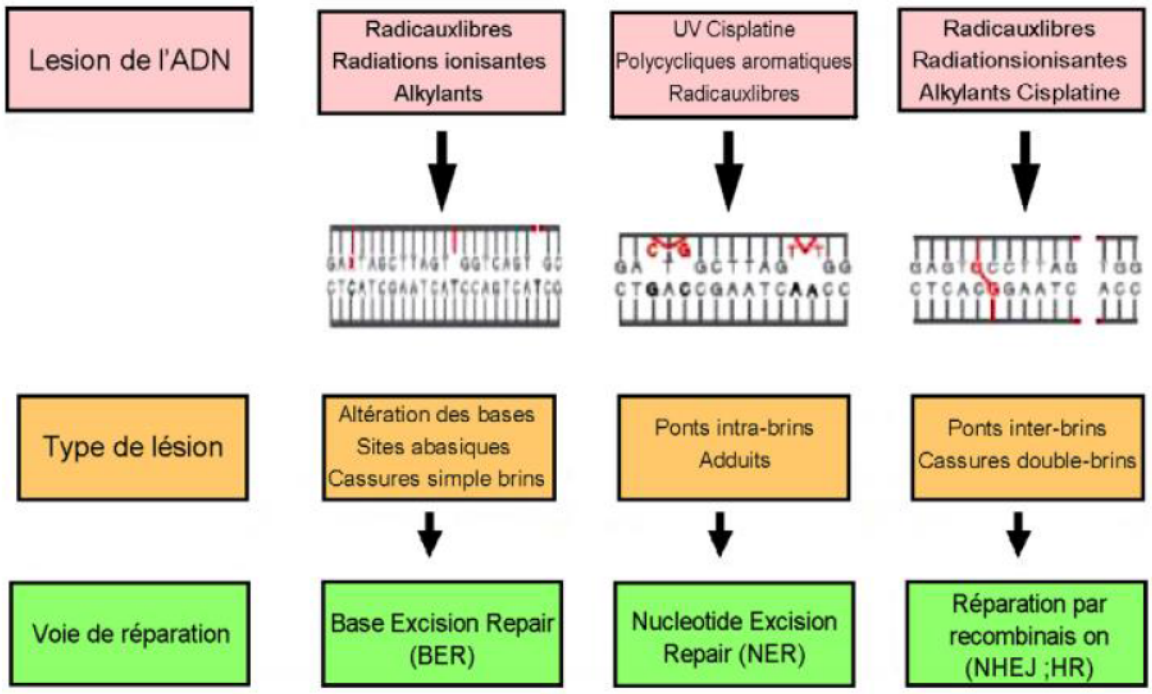


Figure 15 : Lésions de l'ADN et systèmes de réparation (220)

1.4.2.1 La recombinaison homologue

La recombinaison homologue est historiquement le premier mécanisme de réparation des dommages de l'ADN mis en évidence (221). Il a été initialement étudié chez les levures puis sur les cellules humaines proliférantes où ce mécanisme est actif en phase S et G2/M du cycle cellulaire quand une chromatide sœur est présente et sert de brin modèle. Ce système de réparation est initié après reconnaissance des CDB par le système MRN (formé de la nucléase Mre11, de l'ATPase RAD50 et de la protéine NBS1 qui interagit avec l'histone H2AX). Les protéines BRCA1 et PARP1 (poly(ADP) ribose polymérases) facilitent le recrutement du complexe MRN, qui s'associe à la protéine CtIP (CtBP-interacting protein) et l'exonucléase EXO1 (exonuclease 1) au niveau du site endommagé de l'ADN. Le complexe ainsi formé excise les extrémités de l'ADN (fonction nucléasique). La protéine de réplication RPA (replication protein A) empêche la dégradation des extrémités de l'ADN simple brin ainsi formées. En parallèle, MRN phosphoryle ATM qui active 53BP1 (p53-binding protein 1) et BRCA1. Les protéines BRCA1, RAD51 et BRCA2 et RAD54 s'associent pour façonner les extrémités de l'ADN, RAD51 déplace RPA de l'extrémité de l'ADN et forme un filament nucléoprotéique qui réalise la jonction de Holliday et le brin d'ADN est ensuite allongé par une ADN polymérase (fonction de repolymérisation) (222). Après les étapes de résection, invasion de brin et synthèse d'ADN, la réparation peut se faire par deux voies distinctes. La voie principale semble être la voie du « double-strand break repair » (DSBR) qui est parfois nommée modèle de la double jonction Holliday. Figure 16 ci-dessous cette voie est présentée comme la recombinaison homologue par D. Averbeck *et al*. Cette voie comporte en général un échange de brin ou « crossover ». La deuxième voie, qui semble

secondaire, est celle du « synthesis-dependent strand annealing » (SDSA) (223). Cette voie de réparation concerne des séquences en tandem ou répétées mais elle n'est pas toujours fidèle.

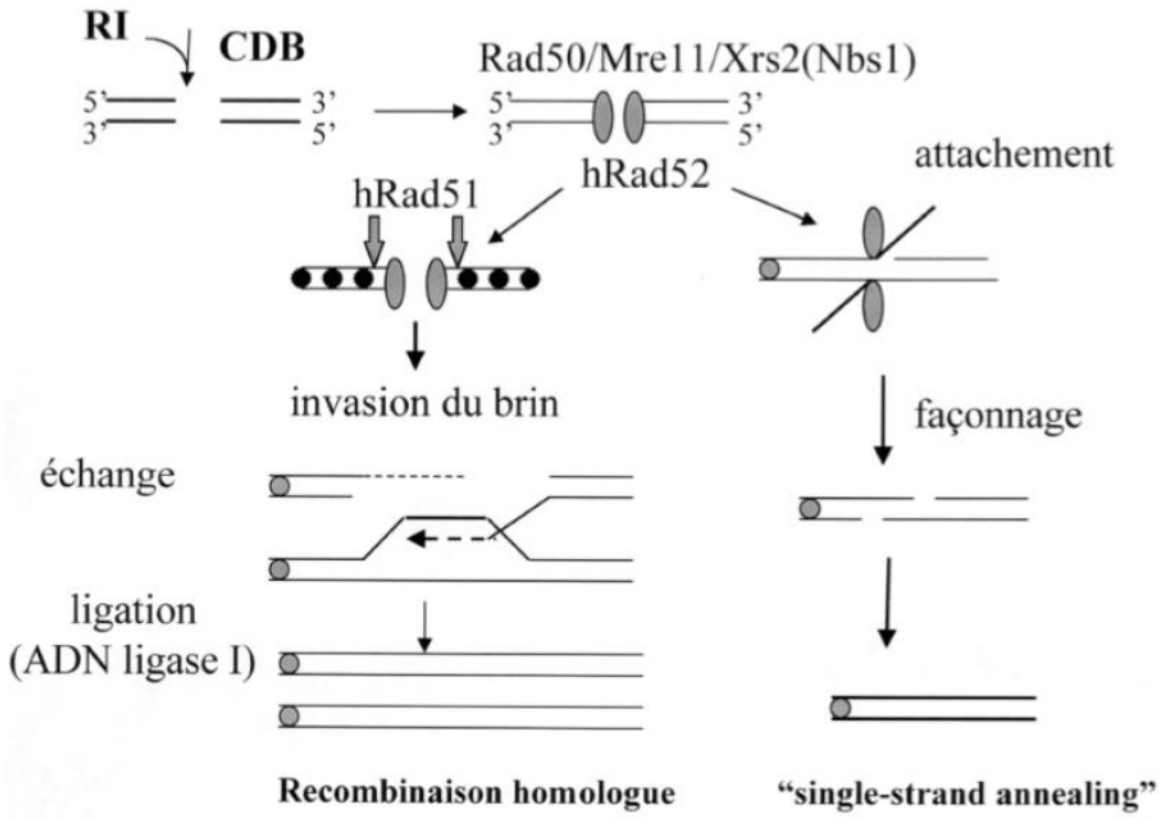


Figure 16 : Schématisation de la réparation par recombinaison homologue (213)

Schéma hypothétique de la réparation de cassures double brins (CDB) par recombinaison homologue avec la voie principale (à gauche) et la voie concernant le single strand annealing (à droite) avec quelques protéines clés. (RI : rayons ionisants).

Plusieurs agents cytotoxiques peuvent inhiber la recombinaison homologue. C'est en particulier le cas des analogues des nucléosides, comme certains agents de chimiothérapie conventionnels (ex : la gemcitabine), le TAS-106 (analogue nucléosidique et inhibiteur des ARN polymérase I, II et III) et le gimeracil (analogue de la dihydropyrimidine déshydrogénase) (224). Les autres molécules ayant montré un effet inhibiteur sur la recombinaison homologue incluent le ZD7762 (inhibiteur de Chk1/2, qui agit indirectement sur BRCA1), le MG132 (inhibiteur du protéasome), le PCI-24781 (inhibiteur de HDAC), le 17-AGG (inhibiteur de hsp90) (224).

Parmi les inhibiteurs spécifiques de la recombinaison homologue, on compte l'imatinib, inhibiteur de la tyrosine kinase Bcr-abl et qui exerce également une inhibition sur RAD51 (diminution de l'expression de RAD51 et inhibition de sa fixation à la chromatine). L'imatinib a été évalué en association à la radiothérapie et il augmente la mort clonogénique, les cellules tumorales étant plus sensibles que les fibroblastes normaux (225). Les inhibiteurs spécifiques de RAD51 (par

exemple, le B02 qui inhibe la fixation de RAD51 à l'ADN) augmentent également la sensibilité de la cellule tumorale aux lésions de l'ADN (226). Les autres agents en cours de développement pouvant majorer la radiosensibilité via leur action sur la recombinaison homologue incluent le Mirin (inhibiteur de Mre11) ou les inhibiteurs de CDK1, qui est comme nous l'avons vu un acteur des points de restriction en phase S (89, 227). L'altération de gènes impliqués dans la recombinaison homologue (comme la recombinase Rad51 ou les gènes de susceptibilité au cancer BRCA1 et BRCA2) confère également un phénotype de radiosensibilité (228).

Les protéines PARP1 et PARP2 sont activées en présence de lésions de l'ADN. Comme décrit plus haut, PARP1 peut se lier aux extrémités des CDB de l'ADN et moduler la recombinaison homologue. En outre, PARP1 possède de nombreux substrats impliqués dans la réparation des CDB, dont ATM, p53, les protéines Ku70 et Ku80, la DNAPK et Mre11 (229). L'inhibition de PARP1 potentialise le retard de croissance radio-induit dans plusieurs modèles tumoraux, en particulier de cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) (230). Plusieurs inhibiteurs de PARP1 sont en cours de développement clinique. Ces inhibiteurs sont particulièrement efficaces à l'encontre des tumeurs présentant des mutations inactivatrices de BRCA1 ou BRCA2, ces mutations étant très fréquentes dans certaine forme de cancer du sein (231). En effet, en l'absence de PARP1, le défaut de réparation des CSB va créer des arrêts des fourches de réplication au moment de la réplication de l'ADN, qui vont aboutir à la formation de CDB. Il a ainsi été montré que les cellules présentant une inactivation de PARP1 présentent une activation accrue du système de recombinaison homologue (232). L'utilisation d'inhibiteurs de PARP1 semble donc particulièrement intéressante sur le plan théorique lorsque la recombinaison homologue est défaillante, comme en cas de mutation inactivatrice de BRCA1 ou BRCA2. L'inhibition de PARP par l'AZD2281 (olaparib) dans des modèles de cancers nasopharyngés augmente les lésions radio-induites de l'ADN, les arrêts dans le cycle cellulaire et l'apoptose. L'effet est synergique avec l'irradiation et se traduit par un retard de croissance dans des xénogreffes tumorales (233). Dans des sarcomes d'Ewing, l'inhibition de PARP1 augmente l'apoptose radio-induite d'un facteur 2,9 à 4,0 et l'effet de l'association se traduit in vivo par un arrêt de la croissance de tumeurs implantées en sous-cutané (234).

Enfin, il a été montré que la perte de la fonction de PTEN (Phosphatase and tensin homolog - le régulateur négatif de la voie de signalisation PI3k/Akt), dans les cellules tumorales s'accompagne d'une réduction de l'activité du système de recombinaison homologue, probablement en raison de la réduction de l'expression de RAD51, encourageant d'autant plus le ciblage de PARP1 en association à la radiothérapie dans ces tumeurs (235).

1.4.2.2 La réparation par suture non homologue (NHEJ)

La réparation par religation non homologue des cassures double brin -en anglais non homologous end-joining (NHEJ)- est le système prépondérant de réparation des cassures double brin chez les mammifères, mais il peut induire des erreurs de réparation. Contrairement à la

recombinaison homologue, le NHEJ ne nécessite pas d'homologie avec un autre duplex de l'ADN et n'utilise pas, ou très peu, de paires de bases homologues entre les extrémités de l'ADN cassé. Les cassures double brin radio-induites sont d'abord reconnues par le complexe Rad50/Mre11/Xrs2(Nbs1) comme dans la recombinaison homologue. La protéine Nbs1 signale la présence du dommage dans l'ADN au système de contrôle du cycle cellulaire (checkpoint) et régule l'activité du complexe Mre11-Rad50. Puis, deux hétérodimères de deux protéines chaperonnes Ku (Ku70 et Ku80) se fixent aux extrémités des brins d'ADN cassés et se complexent aux sous-unités catalytiques de la protéine kinase ADN dépendante (DNA-PKcs) qui est alors capable d'induire la phosphorylation et donc l'activation de diverses protéines environnantes. Par exemple, la DNA-PK et ATM phosphorylent H2AX (Histone 2AX), dont la fonction est incertaine mais qui pourrait modifier la conformation de l'ADN (décondensation). La plupart des cassures double brin ne sont pas des coupures franches mais comportent des terminaisons simple brin modifiées qui doivent être coupées, le complexe de protéines hMre11/hRad50/Nbs1 ayant une activité endo et/ou exonucléasique intervient également avant la religation et la protéine Artemis remodèle les extrémités de l'ADN. L'autophosphorylation de la DNA-PK entraine sa dissociation du site de cassure. Enfin, les brèches sont probablement comblées par une ADN polymérase, et, après alignement des brins, ceux-ci sont reliés par l'ADN ligase IV en présence de la protéine XRCC4 (X-ray cross complementing 4). Ce mécanisme de réparation a l'avantage d'une grande rapidité d'action et il ne dépend pas de l'existence d'une molécule sœur d'ADN qui n'existe qu'après réplication.

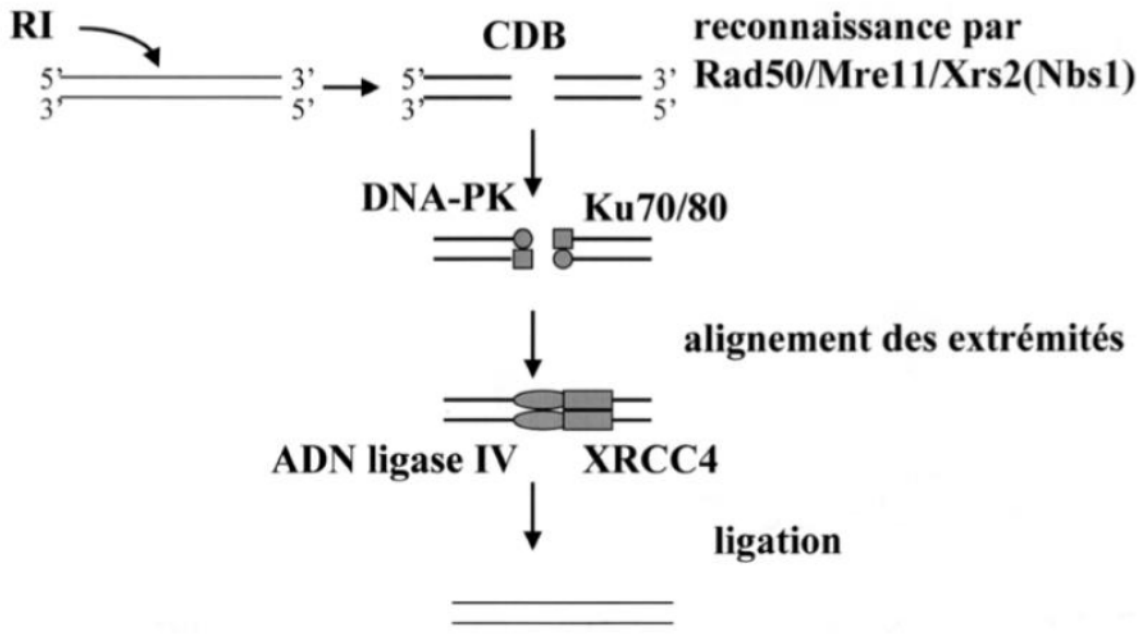


Figure 17 : Schématisation de la réparation par suture non homologue (NHEJ) (213)

Schéma hypothétique de la réparation de cassures double brin (CD) par le système non homologue (non homologous end-joining ou NHEJ) avec quelques protéines clés. (RI : rayons ionisants).

L'irradiation ionisante induit l'expression de la protéine Ku70 par la voie de régulation ATM/p53 (236). Toute altération du système enzymatique du NHEJ, en particulier des gènes impliqués dans la formation du complexe hétérodimérique de la DNA-PK (sous-unités Ku70/Ku80), va augmenter considérablement la radiosensibilité cellulaire (237). Les principaux inhibiteurs du NHEJ ciblent la DNA-PK. Ces agents sont nombreux (U7026, NU7441, IC86621, IC87361, OK-135, SU11752, CC-115) et ont montré un effet radio sensibilisant en évaluation préclinique via une inhibition de la réparation des CDB, en particulier dans des modèles tumoraux radio résistants (89). Leur transposition chez l'homme semble d'autant plus intéressante que la toxicité systémique attendue d'une inhibition du NHEJ est faible et que l'effet anti tumoral en association à la radiothérapie est élevé.

1.4.2.3 La réversion du dommage in situ

C'est la réparation la plus facile, la plus efficace et la plus correcte (Figure 18) qui ne concerne que deux à trois types de lésions et un seul type, bien particulier, de radiolésions dans l'ADN. L'activité de l'alkyl transférase O6-méthylguanine DNA-méthyl transférase (MGMT) permet d'enlever directement le groupement méthyl induit en position O6 de la guanine par un agent alkylant (238). En acceptant le groupement méthyl l'enzyme s'empoisonne elle-même. La surexpression de cette activité dans les cellules tumorales peut conduire à un échec thérapeutique en chimiothérapie utilisant des agents alkylants.

Le temozolomide est un agent alkylant qui traverse la barrière hémato-encéphalique. Il s'agit d'une pro drogue de l'agent alkylant actif 5-(-methyltriazen-1-yl)-imidazole-4-carboximide (MTIC). Les données précliniques montrent que le temozolomide engendre des dommages de l'ADN par alkylation de ses bases (239). Il a été démontré que les tumeurs présentant une méthylation inactivatrice de la MGMT, sont préférentiellement radio sensibilisées par le temozolomide (240). La seule indication du temozolomide comme radio sensibilisant est celle de la radio chimiothérapie des glioblastomes. Plusieurs études sont en cours dans d'autres indications.

Il reste à mentionner chez l'homme un système capable d'éliminer efficacement en une seule étape une classe spécifique de cassures simple brin radio-induites grâce à la polynucléotide ligase (ADN ligase I) (241). En effet, elle est capable de relier des brins d'ADN cassés portant à leurs extrémités des groupements 3'-OH (Figure 16). C'est ainsi qu'un grand nombre de coupures franches de ce type (3'-OH) radio-induites dans l'ADN peut être réparé très rapidement et avec une haute fidélité.

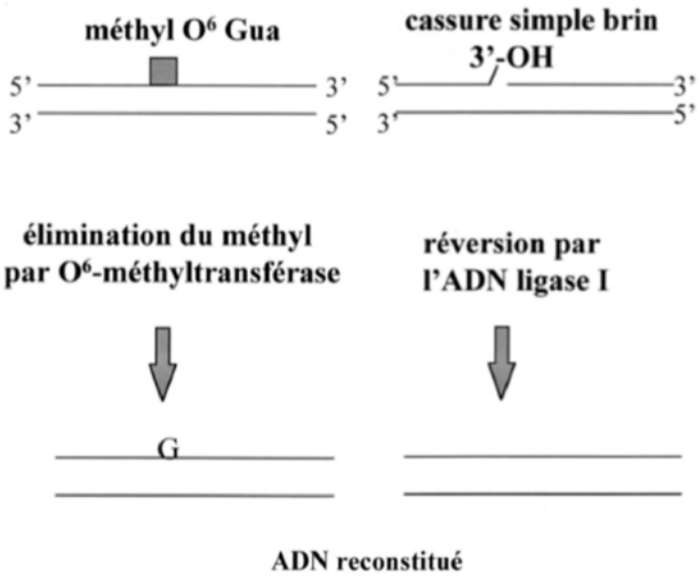


Figure 18 : Schéma hypothétique du système de réparation par réversion du dommage in situ (213)

Les exemples sont la réversion de la méthyl O6 guanine par l'O6-méthyltransférase et la réversion d'une cassure simple brin avec une extrémité 3'-OH par l'ADN ligase I.

1.4.2.4 La réparation des mésappariements de bases

Au cours de la réplication normale de l'ADN, une fidélité extrêmement élevée de copie du matériel génétique (avec un taux d'erreur de 10^{-9} à 10^{-10}) est assurée par un système enzymatique de corrections assistant les ADN polymérases dans leur travail. Plusieurs enzymes de réparation des mésappariements sont impliquées et agissent en quatre étapes pour éliminer les mésappariements (Figure 19) (242):

– Reconnaissance de la base mal appariée et assemblage du complexe réparateur (réparosome).

– Identification du brin parental qui porte l'information génétique à conserver, et élimination de la base mal appariée et d'une petite partie de la séquence qui l'englobe.

– Synthèse réparatrice par l'action d'une ADN polymérase.

– Action d'une ADN ligase, reconstituant l'intégrité normale de la structure de l'ADN (243, 244).

La reconnaissance du mésappariement (dû au décalage d'une ADN polymérase de synthèse gênée par une base modifiée par un agent génotoxique tel que l'irradiation ionisante) et des insertions ou boucles dues à des décalages de synthèse d'ADN sur la matrice (souvent observées dans le cas de la réplication de séquences répétées et de microsatellites), est effectuée

principalement par le complexe protéinique hMutSα qui consiste en un hétérodimère d'homologues MSH de MutS, c'est-à-dire hMSH2 et hMSH6. Les cellules ne possédant pas la protéine hMSH6 sont incapables d'effacer les erreurs de réplication (mésappariements) et montrent un phénotype mutateur (245). Un changement conformationnel convertit l'hétérodimère hMutSα en une pince qui isole le site du mésappariement et se déplace sur l'ADN. Il s'en suit un assemblage du complexe de réparation (réparosome) qui nécessite l'intervention de protéines homologues aux protéines bactériennes MutL identiques à hMLH, de polypeptides de la ségrégation post méiotique (PMS), de l'ADN polymérase δ, de facteurs de réplication comme PCNA, RPA et RFC ainsi que des 5'→3' exo-endonucléases EXO1 et FEN1 et des 3'→5' exo nucléases et hélicases (246). D'autres hétérodimères comme hMLH1/ hPMS1 et hMLH1/hMLH3 semblent impliqués dans cette voie de réparation. L'importance du mécanisme de réparation des mésappariements de bases est illustrée par le fait qu'une déficience dans ce système de réparation est fortement associée à une prédisposition génétique aux cancers du côlon (HNPCC ou heredetary non polyposis colorectal cancer et syndrome de Lynch), de l'endomètre et des ovaires. Une perte de fonction de ces gènes conduit à l'absence de réparation des mésappariements de bases et des anomalies d'insertion–délétion. Il en résulte un phénotype mutateur qui favorise l'apparition de cancers.

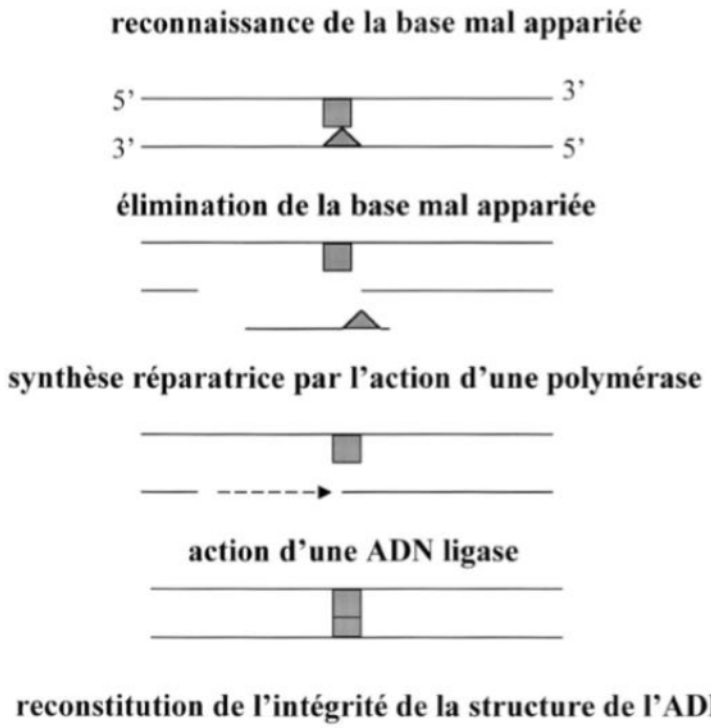


Figure 19 : Schéma hypothétique des étapes de la réparation des mésappariements de bases (213)

1.4.2.5 Le système de réparation par excision de bases (BER)

L'excision de bases est un processus multienzymatique de réparation qui prend en charge les modifications de bases comme la méthylation, l'oxydation, la réduction ou la fragmentation de bases par les radiations ionisantes et le métabolisme normal oxydatif de la cellule (247, 248). Généralement, les bases modifiées de l'ADN sont excisées à l'aide d'ADN glycosylases spécialisées, comme hNth et hOgg1, qui produisent des sites apuriniques ou apyrimidiniques (AP) (249) (Figure 20). Ces sites AP sont des substrats pour les AP endonucléases. Par exemple, deux endonucléases (AP) incisent le brin d'ADN en 3' (AP lyase, hAP1) et 5' (AP hydrolase) du site apurinique (site abasique). Une phosphodiestérase enlève les parties sucre–phosphate restantes (étape de façonnage). Les ADN polymérases β ou δ associées aux facteurs de réplication PCNA et FEN remplissent la brèche avec, respectivement, un à deux ou cinq à six nucléotides en utilisant le brin complémentaire non endommagé comme matrice. Puis, l'ADN ligase I ou le complexe ADN ligase III/ XRCC1 effectue la jonction des brins d'ADN (Figure 20).

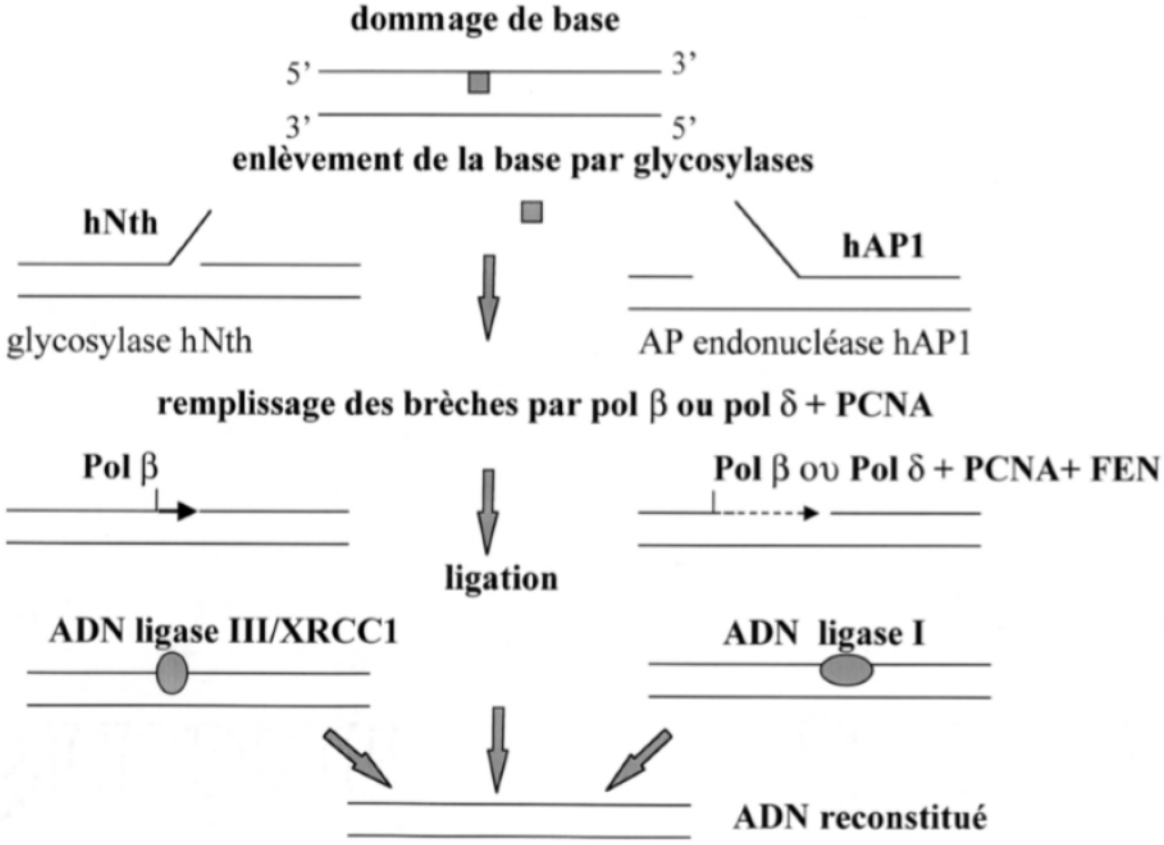


Figure 20 : Réparation par excision de bases (213)

Schéma hypothétique de la réparation par excision de bases montrant les voies impliquant l'enlèvement de un ou deux nucléotides (à gauche) (short patch repair) donnant de petites brèches, ou de plusieurs nucléotides (à droite) (long patch repair) donnant de plus grandes brèches simple brin dans l'ADN.

Certains dommages oxydatifs, comme la thymine glycol, lésion majeure non codante et cytotoxique induite par les radiations ionisantes, peuvent être excisés par l'ADN glycosylase hNth1 humaine. L'enzyme XPG du système d'excision de nucléotides peut remplir le rôle de cofacteur pour cette protéine (249). L'activité enzymatique de l'hydroxyméthyl uracile ADN glycosylase qui élimine l'hydroxyméthyl uracile induit par les radiations ionisantes et les agents oxydants, est réduite dans le syndrome de Werner (syndrome de vieillissement précoce) (250). L'ADN polymérase β est elle-même inductible par les dommages de l'ADN (251, 252). Des mutations dans le gène pol β sont promotrices de tumorigénèse (exemple : cancer de la prostate) (253). Un défaut dans l'activité de l'ADN ligase I est associé aux leucémies aiguës des cellules T et à l'anémie de Fanconi (241).

Dans les cellules humaines normales, les cassures simple brin radio-induites sont généralement très rapidement réparées (en moins d'une heure). Les ADN ligases III et IV, associées aux protéines XRCC1 et XRCC4, sont impliquées dans la réparation des cassures simple brin. La structure du domaine interactif entre ligase III et XRCC1 est particulièrement intéressante, car elle implique un motif génétique de type BRCT présent dans le C–terminal du gène suppresseur du cancer du sein BRCA-1 et également dans 40 autres protéines impliquées dans la réparation, la recombinaison et le contrôle du cycle cellulaire (254). La PARP détecte les cassures radio-induites franches et celles apparaissant après incision des bases modifiées (255). La protéine XRCC1 détecte des cassures indépendamment de la PARP. Actuellement, on pense que la PARP joue un rôle d'initiation et de régulation de la réparation par sa liaison rapide mais intermittente aux cassures simple brin. La protéine XRCC1 pourrait jouer un rôle de régulation négative de l'activité PARP en se liant préférentiellement à la forme oligo (ADP-ribosylée) de la PARP lorsque celle-ci est fixée aux cassures simples brin. Le fait que XRCC1 interagit également avec Pol β et l'ADN ligase III suggère qu'elle pourrait agir comme coordinateur de l'excision de bases et de la réparation des cassures simple brin (256). D'autres polymérases comme Pol δ/ε peuvent participer à la réparation en impliquant plusieurs nucléotides et l'aide des facteurs protéiques PCNA, RFC et FEN1. Apparemment, les dommages de bases et les cassures simple brin, induits par les radiations ionisantes et le peroxyde d'hydrogène, sont réparés à l'aide des polymérases δ/ε. Les sites AP oxydés ou réduits utilisent la voie de la polymérase β PCNA dépendante ou les polymérases δ/ε. Dépendant du dommage initial et de la glycosylase mise en jeu, différentes voies enzymatiques d'excision de bases sont donc empruntées (256).

1.4.2.6 La réparation par excision de nucléotides (NER)

Le processus de réparation de l'ADN par excision de nucléotides est essentiel, car il est le plus efficace pour éliminer les lésions encombrantes causant des distorsions structurales de l'ADN. Ces lésions sont induites par les rayons ultraviolets, les rayons ionisants, les mutagènes, les carcinogènes chimiques et certaines substances thérapeutiques (257). Ce processus s'applique à de nombreux adduits tels que les dimères de pyrimidines, les thymines glycols et certaines autres

modifications de bases, les adduits psoralène–thymine, cisplatine–guanine, mitomycine–guanine et les pontages inter brins. Une découverte majeure a été la mise en évidence d'un couplage entre la transcription et le processus de réparation par excision de nucléotides (258, 259). En effet, les gènes activement exprimés sont réparés de préférence avant les régions du génome non exprimées. Ce couplage entre transcription et réparation est fondé sur le fait que le facteur de transcription TFIIH de l'ARN polymérase II possède une double fonction, l'une dans la transcription générale et l'autre dans la réparation par excision–resynthèse (260). On peut donc distinguer deux voies de réparation, la réparation globale indépendante de la transcription et la réparation couplée à la transcription (Figure 21). Conceptuellement, ce système de réparation est divisé en quatre étapes (Figure 21):

– la reconnaissance et la démarcation du dommage

– l'incision du dommage

– l'excision du dommage

– la synthèse d'ADN réparatrice (resynthèse)

– la ligation (261).

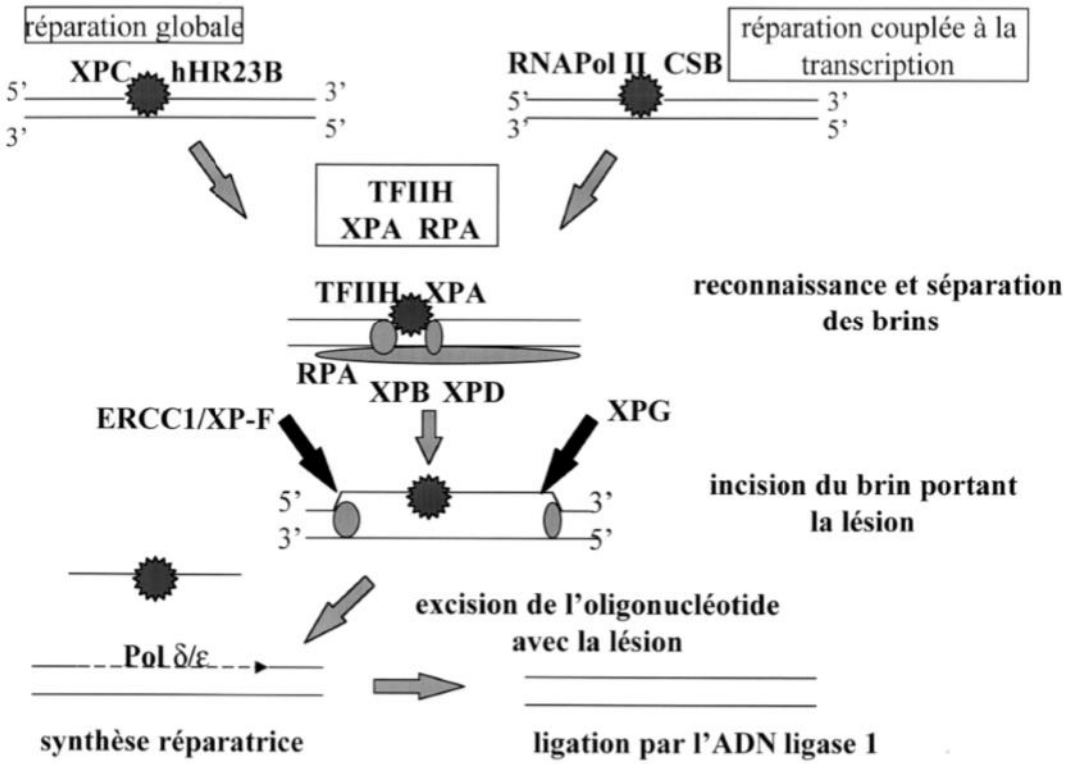


Figure 21 : réparation par excision de nucléotides (213)

Les voies de la réparation globale et de la réparation couplée à la transcription avec quelques protéines clés.

La reconnaissance du dommage est effectuée par le complexe protéique XPC/HHR23B qui recrute ensuite l'appareil protéique de réparation globale du génome (262, 263). Ceci est suivi d'une ouverture locale de l'ADN et d'une démarcation de la lésion par la protéine XPA en interaction avec la protéine RPA, protéine de la réplication se liant à la région simple brin de l'ADN. La protéine XPA interagit également avec le complexe TFIIH et l'endonucléase ERCC1/XPF. Le complexe protéique TFIIH, comportant neuf sous-unités, sert à écarter les brins d'ADN au niveau de la lésion. Ce complexe contient deux sous-unités XPB et XPD qui ont des fonctions hélicases, respectivement 3'→5'et 5'→3'. Puis, une double incision est effectuée de chaque côté du dommage par l'endonucléase XPG coupant le simple brin du côté 3'et par le complexe ERCC1/XPF coupant du côté 5'. Cela conduit à l'excision d'un oligonucléotide de 24 à 32 nucléotides contenant la lésion. Ensuite, après excision du dommage, suit l'étape de remplissage de la brèche par une synthèse d'ADN réparatrice qui implique les ADN polymérases δ et ε et l'action des facteurs de réplication RPA, RFC et PCNA. La mesure de la réplication réparatrice est souvent utilisée comme indicateur de la réparation de lésions dans l'ADN. Enfin, la réparation du dommage est complétée par l'action de l'ADN ligase I qui effectue la jonction au niveau de la coupure restante (213). Plusieurs protéines du processus d'excision de nucléotides sont également impliquées dans la réparation des dommages de bases induits par les radiations ionisantes.

1.4.3 Mécanismes de mort cellulaire après irradiation

La progression tumorale est le résultat d'un déséquilibre entre la prolifération des cellules tumorales et le processus de mort cellulaire. Toute activation de voies de signalisation influant sur la mort cellulaire radio-induite sera susceptible de modifier la radiosensibilité tumorale. Les différents types de mort cellulaire (mort mitotique, apoptose, sénescence, autophagie, nécrose) ont fait l'objet de revues exhaustives (264). La mort mitotique et l'apoptose sont les deux principaux mécanismes de mort de la cellule tumorale exposée aux rayonnements ionisants. D'autres mécanismes comme l'entose ou le cannibalisme cellulaire ainsi que la mort immunogénique ont été plus récemment décrits et constituent un important champs d'investigation à l'heure actuelle (265). La classification des mécanismes de mort cellulaire a longtemps reposée sur les caractéristiques morphologiques des cellules mourantes aujourd'hui les descrptions des différents types de mort cellulaire intègrent divers marqueurs moléculaires caractérisants les mécanismes de mort qui globalement s'intègrent soit dans des phénomènes de mort cellulaire régulée avec par exemple la mort cellulaire programmée ou dans des phénomènes de mort cellulaire accidentelle (266).

1.4.3.1 Mort mitotique ou catastrophe mitotique

La mort mitotique résulte de l'entrée prématurée ou inappropriée d'une cellule en mitose, sous l'action d'un stress cellulaire. Il s'agit classiquement de la principale forme de mort cellulaire lors de l'exposition aux rayonnements ionisants de tumeurs solides. Outre l'exposition aux rayonnements ionisants, les lésions cellulaires pouvant activer la mort mitotique sont nombreuses: altération de la dynamique des microtubules (ex : taxanes, vinca-alcaloïdes, colchicine), entrée aberrante en mitose avant réplication complète de l'ADN, mitose asymétrique, anomalies de duplication des centrosomes et de ségrégation des chromosomes, anomalies de la cytocinèse, anomalies dans le checkpoint G2. D'un point de vue morphologique, la mort mitotique se caractérise par l'apparition de cellules géantes multi nucléés avec présence de micronoyaux (264). A la différence de l'apoptose, les membranes nucléaires ne sont pas altérées et les chromosomes contenus dans les micronoyaux ne sont pas particulièrement condensés. Il est difficile de caractériser la catastrophe mitotique au plan moléculaire, mais il existe des voies de signalisation communes avec l'apoptose, en particulier par l'implication des caspases et du cytochrome C (81). Certains auteurs ont même suggéré que la catastrophe mitotique n'était pas un mécanisme spécifique de mort de la cellule, mais plutôt une étape précédant la mort cellulaire par nécrose ou apoptose (267).

La cellule cancéreuse, qui présente des anomalies de la signalisation des points de restriction du cycle cellulaire, est particulièrement sensible aux agents susceptibles de l'entraîner dans une mitose anormale. Après exposition aux rayonnements ionisants, les cellules tumorales subissent une mort en interphase, c'est-à-dire juste avant leur entrée en mitose. Ces cellules mourantes présentent des caractéristiques proches des cellules apoptotique. Les cellules survivantes s'arrêtent en G1/S ou en G2. Puis, la cellule meurt ou reprend son cycle, en fonction de ses capacités de réparation de l'ADN. La modulation pharmacologique des acteurs du contrôle du cycle cellulaire (ex : inhibiteurs de Chk1 ou Chk2) permet de radio sensibiliser les cellules tumorales en modulant leur capacité à s'arrêter dans le cycle et en « obligeant » les cellules à entrer en mitose alors que les lésions de l'ADN ne sont pas réparées (268).

Plusieurs drogues, anciennes ou plus récentes, modulent la mort mitotique. Ainsi, les agents qui stabilisent les microtubules (ex : taxanes) ou qui inhibent leur polymérisation (ex : épothilone) interfèrent avec le processus mitotique sans efficacité significative à l'encontre des cellules tumorales quiescentes. Ils peuvent entraîner une catastrophe mitotique (Figure 22).

En réponse à un stress cellulaire, comme l'irradiation, ATM phosphoryle p53, directement ou via la phosphorylation de Chk2. En aval de p53, l'activation de p21waf1 inhibe CDK2. Puisque CDK2 est nécessaire à la transition G1/S via l'inhibition de RB1, l'inhibition de CDK2 entraîne l'arrêt de la cellule en G1/S. L'activation de la voie ATM/Chk2 a également pour effet d'activer l'apoptosome (81). Les mutations de p53 ou de RB1, fréquentes dans les tumeurs humaines, empêchent les cellules tumorales de s'arrêter en G1/S en cas d'exposition aux rayonnements

ionisants, et les cellules tumorales dépendent donc des arrêts en G2/M pour la réparation des lésions radio-induites de l'ADN, sans quoi elles sont entrainées dans une mort programmée. Le point de contrôle G2/M est principalement activé par ATR, qui phosphoryle Chk1, lequel phosphoryle (inhibe) cdc25C. Puisque cdc25C a normalement pour fonction d'activer CDK1, l'activation de Chk1 empêche le passage du point de restriction G2/M. Le ciblage des points de restriction G2/M via les inhibiteurs de Chk2 oblige les cellules à rentrer en mitose, ce qui favorise la catastrophe mitotique lorsque les lésions de l'ADN ne sont pas réparées (268, 269).

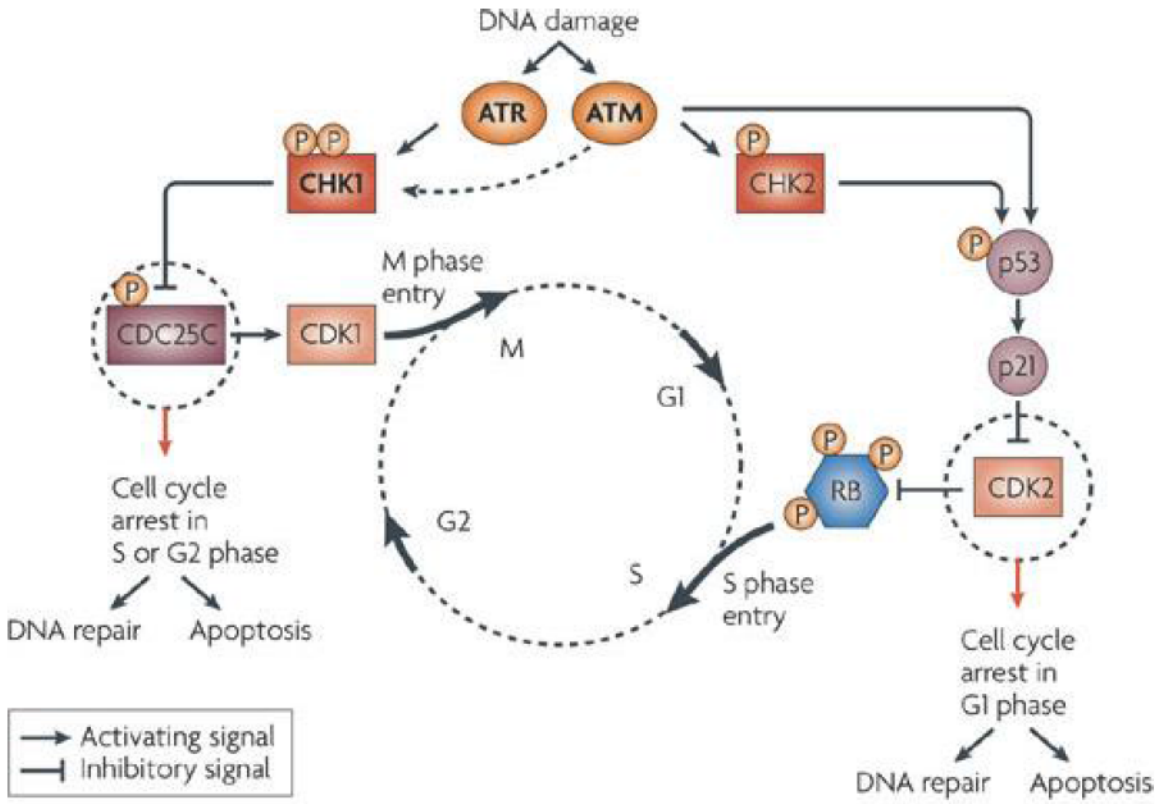


Figure 22 : Mort mitotique après irradiation (268)

La sérine thréonine kinase ataxia telangiectasia mutée (ATM) d'une part et la protéine reliée à ataxia telangiectasia et Rad-3 (ATR) d'autre part sont des détecteurs des dommages de l'ADN qui peuvent induire un arrêt du cycle cellulaire pour permettre soit la réparation de l'ADN soit la mort cellulaire. Alors qu'ATM est principalement activée par les CDB généralement causées par les radiations ionisantes et les drogues radiomimétiques, ATR est également activée par d'autres dommages en particulier les dommages causés par les rayons ultraviolets.

ATM et ATR sont activés en quelques minutes et peuvent phosphoryler et activer p53 directement ou par l'intermédiaire de la checkpoint kinase 2 (CHK2). Parmi les gènes induit par p53 on note p21 (également appelé CDKN1A ou CIP1) qui est un inhibiteur de la cycline dépendante des kinases 2 (CDK2). CDK2 empêche les cellules endommagées d'entrer en phase de synthèse d'ADN (phase S du cycle cellulaire). Les cellules endommagées qui sont déjà

passées de la phase G1 à S peuvent être bloquées par un autre effecteur d'ATM-ATR, CHK1. CHK1 phosphoryle la phosphatase CDC25C qui est alors séquestrée dans le cytoplasme. CDC25C ayant pour rôle de libérer CDK1 de ses phosphatases inhibitrices, son inactivation entraîne un blocage du cycle cellulaire empêchant les cellules de passer en mitose (phase M du cycle cellulaire).

L'activation anormale du complexe cycline B/CDK1 (complexe MPF) va également pousser la cellule à entrer en cycle et en mitose, ce qui conduit à la catastrophe mitotique si des lésions de l'ADN ne sont pas réparées (81). L'activation anormale de CDK1 s'observe dans certains exemples de catastrophe mitotique chimio-induite, comme par exemple lors d'un traitement par 5-FU (270). Plusieurs voies de signalisation peuvent moduler l'activité du complexe cycline B/CDK1. Il a également été montré que la perte de la fonction de p53 potentialisait la catastrophe mitotique induite par l'irradiation dans des modèles de fibroblastes murins. L'effet pourrait s'expliquer par l'activité régulatrice post transcriptionnelle de p53 vis-à-vis de la cycline B1 (271).

La survivine, de la famille des protéines inhibitrices d'apoptose (IAP), inhibe l'activation des caspases en activant le transfert intra-mitochondrial de Bax. Son rôle exact dans la catastrophe mitotique reste à définir, mais la survivine semble être à l'interface du contrôle du cycle cellulaire et de la mort programmée (apoptose ou mort mitotique) (81). La radiosensibilisation conférée par l'inhibition de la survivine impliquerait des mécanismes partiellement dépendants de la voie des caspases. Le traitement par inhibiteur de la survivine s'associe à un taux d'apoptose accru, à des arrêts dans le cycle cellulaire et à une inhibition de la réparation des CDB. Les mécanismes sous-jacents pourraient faire intervenir une activation du transport intranucléaire d'acteurs de réparation des CDB, tels que le phospho-histone H2AX ou la DNA-PK (272). Hehlgans *et al.* ont montré que l'inhibition de la survivine et a fortiori une double inhibition de la survivine et des XIAP augmente la radiosensibilité de lignées de cancers colorectaux *in vitro*. La double inhibition arrête les cellules en G2/M, augmente la proportion de cellules en subG1 et augmente l'activité des caspases 3 et 7 (273).

Enfin, certaines données suggèrent que le ciblage des protéines 14-3-3σ, inhibitrices de la transition G2/M, surexprimées dans plusieurs cancers, pourrait augmenter la sensibilité à la radiothérapie. L'inhibition de 14-3-3σ empêche les arrêts en G2 et entraîne une catastrophe mitotique. Cet effet semble lié à l'entrée prématurée du complexe cycline B/CDK1 dans le noyau (274). L'inhibition de 14-3-3σ par des anti-sens diminue la localisation cytoplasmique et la phosphorylation de cdc25C, ce qui conduit à prolonger l'activité de cdc25C et à permettre un franchissement des points de restriction G2/M, entrainant la cellule dans une mitose abortive (275).

1.4.3.2 Apoptose

Comme nous l'avons vu, l'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que le fonctionnement immunitaire,

le maintien de l'homéostasie tissulaire, ou encore le développement embryonnaire. D'un point de vue morphologique, la mort apoptotique associe réduction du volume cellulaire, une dégradation de l'ADN qui précède la perte d'intégrité membranaire nucléaire et cytoplasmique, une condensation de la chromatine nucléaire, une désagrégation du noyau avec apparition de corps apoptotiques provoqués par la fragmentation de l'ADN et une irrégularité membranaire avec formation de bulles ou « blebs » (276). L'apoptose radio-induite est un processus essentiellement précoce qui apparaît dans les heures qui suivent l'irradiation (81).

On a longtemps cru que l'apoptose mitochondriale était la seule voie de l'apoptose mise en jeu après exposition aux rayonnements ionisants. En réalité, les deux voies de l'apoptose sont impliquées dans la réponse à l'irradiation.

L'activation de p53 par l'irradiation entraîne la transcription de gènes codant pour les récepteurs de mort FAS, DR4 et DR5 (death receptor). L'activation de ces récepteurs de la famille du TNF par la fixation du ligand TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) génère une apoptose dépendante de l'activation en aval de la caspase 8 (64). Il semble exister une corrélation partielle entre le statut p53 et la radiosensibilité tissulaire. Ainsi, des souris déficientes pour p53 sont davantage résistantes à l'apoptose radio-induite (277). D'autres acteurs de l'apoptose peuvent être ciblés. L'AT101, un inhibiteur de Bcl2, augmente l'apoptose, même à faibles concentrations, et augmente la radiosensibilité de tumeurs bronchiques de types A549 et HCC2429 (278). L'inhibition de l'anti apoptotique hsp-27 pourrait être efficace, car son niveau d'expression est corrélé à une résistance à l'apoptose et à une protection relative vis-à-vis des ROS. L'inhibition de hsp-27 augmente la mort clonogénique et le taux d'apoptose, y compris dans des lignées radiorésistances telles que les lignées PC3 ou U87MG (279). La survivine et les protéines XIAP, de la famille des IAP, peuvent interagir directement d'une part avec les caspases 3 et 7, et 9 par un domaine CARD (Caspase activation and recruitment domains) et d'autre part avec l'ubiquitine. L'inhibition de la survivine ou de XIAP augmente la radiosensibilité, cette augmentation étant associée à une accumulation des cellules en G2/M, une augmentation de la fraction subG1, et une déphosphorylation de FAK (Focal adhesion kinase) et Akt (273). Une cible potentielle serait également la protéine mitochondriale DIABLO/SMAC (Second mitochondria-derived activator of caspases) qui inhibe les protéines IAP. Ainsi, l'apoptose radio-induite dans les cellules tumorales pourrait être augmentée par l'inhibition des interactions entre la survivine (de la famille des IAPs) et SMAC (280).

L'APO010 est un ligand recombinant de FAS. Evalué en association à la radiothérapie dans des lignes cellulaires résistantes à l'apoptose, il augmente la réponse apoptotique à l'irradiation et radio sensibilise des lignées mésothéliales. *In vivo*, l'APO010 en monothérapie entraîne un retard de croissance tumoral, mais n'augmente pas significativement l'efficacité à la radiothérapie, peut-être en raison d'une dose inappropriée (281). Le ciblage par un TRAIL humain recombinant ou par des inhibiteurs de DR4 ou DR5 a montré un effet radio sensibilisant dans des lignées de cancers du col utérin HeLa et cet effet est corrélé à une activation de l'apoptose (282). Il a été montré *in vivo* dans des modèles de xénogreffes de cancers du poumon à petites cellules

que la triple association de l'anticorps monoclonal TRA-8 (agoniste du récepteur de mort DR5), de cisplatine, et d'une irradiation, augmente la survie des animaux traités en comparaison à l'association cisplatine/radiothérapie (283).

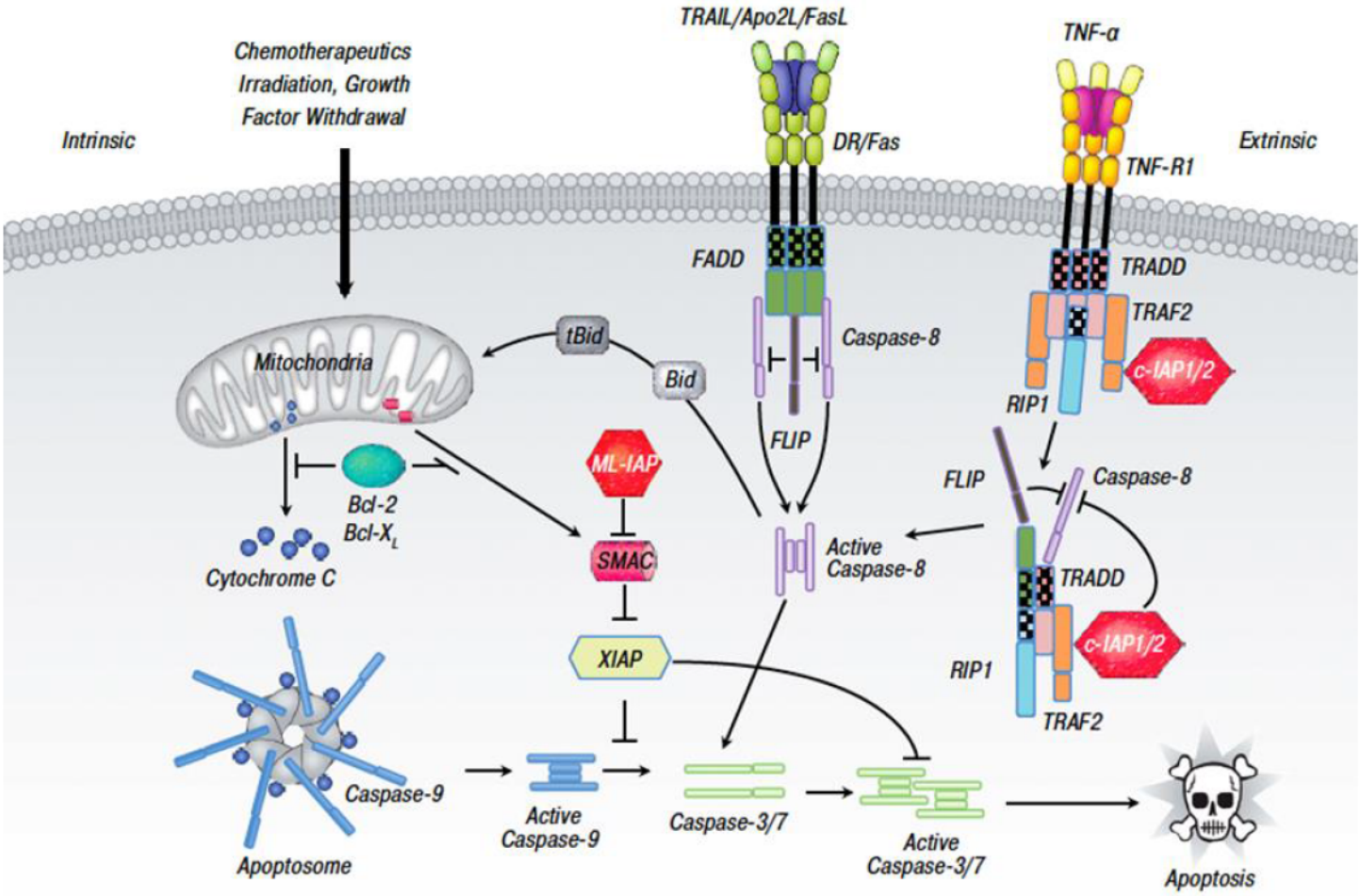


Figure 23 : Voies de signalisation de l'apoptose (284)

1.4.3.3 La sénescence

La sénescence est un mécanisme de mort cellulaire qui après irradiation est principalement initié par l'activation de la voie de signalisation ATM. L'activation d'ATM induit la stabilisation de p53 par phosphorylation, ce qui conduit à la surexpression de p21Waf1, à l'origine de l'inactivation d'un certain nombre de gènes par méthylation comme les gènes codant pour les cyclines (220). Vorons ce mécanisme plus en détails. La mort cellulaire par sénescence repose sur l'arrêt des cellules proliférantes en phase G1 du cycle cellulaire. Ce type de mort cellulaire peut survenir après tout type de stress qui rend la cellule à risque de transformation maligne ce qui est le cas de l'irradiation du fait des dommages induits sur l'ADN. Les cellules sénescentes adoptent

une morphologie applatie et agrandie et expriment des marqueurs moléculaires de sénescence comme la β-galactosidase, les foci d'hétérochromatine ou l'accumulation de granules de lipofuscine (285-288). Les deux effecteurs principaux de la senescence sont la voie de p53 et celle de pRB (protéine du rétinoblastome). En temps normal, la protéine p53, suppresseur de tumeur, est adressée au protéasome où elle est dégradée via MDM2. En condition de stress cellulaire (dommage de l'ADN, stress oxydatif, raccoursissement des télomères…) l'activité de MDM2 est réprimée et la protéine p53 qui reste fonctionnelle est capable d'activer p21 qui est un inhiteur des kinases dépendantes des cyclines en capacité d'arrêter le cycle cellulaire. La seconde voie pouvant aboutir à la senescence est celle de pRB. Après un stress celluleire pRB est activée par p16. Elle se lie alors aux membres de la famille de facteurs de transcription E2F connus pour réguler la progression dans le cycle cellulaire (289, 290). Ces deux voies comuniquent fortement pour assurer le contrôle de la sénescence et peuvent être redondantes avec d'autres mécanismes de mort cellulaire (291, 292). Bien que la sénescence soit un mécanisme adaptatif en réponse au stress cellulaire qui contribue à l'allongement de l'espérance de vie d'un organisme, ce phénomène peut églement avoir un impact négatif sur la survie. Avec l'âge, les cellules sénescentes s'accumulent dans les tissus prolifératifs. Ces cellules relarguent des différentes protéases de dégradation, différents facteurs de croissance et différentes cytokines inflammatoires qui peuvent compromettre la fonction des cellules avoisinantes non sénescentes. Après une accumulation massive de cellules sénescentes, la capacité proliférative des tissus en renouvellement diminue du fait de la diminution des cellules souches progénitrices associée. Globalement, ces effets peuvent créer un environnement permissif qui autorise la transformation de cellules prénéoplasiques en cellules tumorales. De ce fait, la senescence, qui en rincipe favorise la longévité d'un organisme en favorisant l'arrêt dans le cycle de cellules endommagées par un stress, peut également favoriser la survenue de cancer du sujet âgé(288).

1.4.3.4 L'autophagie

L'autophagie qui vient du grec « phagein » qui signifie manger, est un processus par lequel la cellule digère ses propres composants via les lysosomes. Ce mécanisme caractérisé par l'involution des corps de Golgi, des polyribosomes, du réticulum endoplasmique et des mitochondries. Elle met en œuvre les cathepsines et requiert l'activation des lysosomes qui permettent à la cellule de se digérer elle-même (220). Il s'agit d'un processus ubiquitaire qui constitue le principal mécanisme de renouvellement cellulaire. En effet, c'est grâce à l'autophagie que les organites endommagés, les agents pathogènes intra cellulaires et les portions superflues de cytoplasme, tout comme les protéines abérantes, viellies ou aggrégées sont éliminés. Les protéines de demie de vie courte sont plus volontiers éliminées via le protéasome alors que les protéines de demie vie longue sont éliminées par autophagie (288). A ce jour, au moins trois types d'autophagie ont été décrits qui diffèrent par leur mode d'adressage au lysosomes (293). Les descriptions les plus détaillées concernent la macro-autophagie dans laquelle des portions du cytosol et des organites entiers sont engloutis par des structures avec double membrane appellé

autophagosomes ou vacuoles autophagiques précoces. Après fusion avec le lysosome, les autophagosomes formes des structures à membrane simple appellées autolysosomes ou vacuoles autophagiques tardives. Le contenu de ces autolysosomes est dégradé et les éléments de dégradations sont réadressés dans le cytosol pour élimination par réaction métabolique. La régulation de la formation des autophagosomes est complèxe. Le principal facteur de régulation des macro-autophagosomes est la kinase mTOR. En principe mTOR permet la production d'un taux basal d'autophagosomes mais son inhibition cible la macroautophagie. L'inhibition de mTOR entraîne l'activation de complèxes multiprotéiques formé par PI3K, les protéines vacuolaires Vps34,Vps15, la Beclin 1, UVRAG (gène associé à la résistance aux rayonnements UV), l'endophiline B1 (Bif-1), Ambra 1 et probablement d'autres protéines. Ce complèxe est également régulé négativement par Bcl-2/X_L Vps34 induit la production de PI3 qui déclanche un signal moléculaire de recrutement des effecteurs de la machinerie autophagique qui permet l'elongation et la fermeture des vésicules (294). En amont de mTOR, la macro-autophagie peut être inhibée par la voie de l'insuline/IGF-1(295).

Moins décrit que la macro-autophagie on retrouve un autre mécanisme d'autophagie qui est la micro-autophagie où la phagocytose est réalisée directement par la membrane du lysosome. Il s'agit également d'un mécanisme d'élimination d'organites et de protéines de demie vie longue mais, contrairement à la macro-autophagie ce mécanisme n'est pas un mécanisme de réponse à la déprivation en nutriments. L'une des formes particulières de micro-autophagie est la dégradation hautement sélective des peroxysomes appellée la micropexophagie qui est décrite chez la levure comme un mécanisme majeur d'adaptation au stress oxydatif (296).

Un troisième type d'autophagie décrit est celui médié par les protéines chaperones. Cette voie, bien que répondant à la déprivation en nutriments, ne présente pas de phagocytose massive mais plutôt une reconnaissance sélective des substrats. Dans l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes, des protéines cytosoliques comportant un pentapeptide spécifique sont reconnues par un complèxe de protéines chaperonnes (incluant la heat shock protéine hsc73) et adressées à la membrane lysosomale à laquelle elles se lient via la protéine associée à la membrane lysosomale (LAMP) 2a. La protéine adressée est alors détachée et internalisée dans la lumière lysosomale pour y être dégradée (293).

1.4.3.5 La nécrose

La nécrose est habituellement considérée comme une forme de mort cellulaire incontrôlée due à une perte de nutriments ou à des évènements majeurs dans l'environnement cellulaire. La nécrose est peu fréquente après irradiation mais peu se voir en particulier aux très fortes doses. Elle résulte de la dégradation des structures lysosomales qui libèrent leurs enzymes qui entraînent la destruction de la cellule avec perte d'intégrité des membranes et déversement du contenu cellulaire dans l'espace extracellulaire (297).

1.4.3.6 L'entose ou cannibalisme cellulaire

Ce mécanisme correspond à l'intégration d'une cellule dans une autre cellule (phénomène dit de « cell in cell ») et peut conduire à une mort cellulaire. Il semble que ce phénomène soit fréquent dans les cellules cancéreuses et en particulier dans certains type agressifs de cancer (comme les cancers du sein triple négatifs) mais les mécanismes régulateurs et l'impact pronostique de ce phénomène doivent encore être élucidés (265).

1.4.3.7 La mort immunogénique

L'irradiation tout comme certaines chimiothérapies (anthracyclines, oxaliplatine) peuvent induire une mort cellulaire par apoptose immunogénique qui contrairement à l'apoptose classique déclenche une réponse immunitaire anti tumorale via l'activation de cellules dendritiques qui elles-mêmes activent une réponse spécifique des lymphocytes T. La mort immunogénique est caractérisée par la sécrétion molécules particulières associées aux dommages que l'on appelle les DAMP (damage-associated molecular patterns) qui sont exposées à la surface de la cellule (298). La calréticuline est une DAMP qui se trouve habituellement dans le réticulum endoplasmique. Lorsque le phénomène d'apoptose immunogénique est enclenché, la calréticuline est relocalisée sur la membrane des cellules mourantes et agit comme un signal dit « eat me signal » qui active les phagocytes. D'autres DAMP comme HSP70 et HSP90 sont exposées à la surface cellulaire sur la membrane plasmique lors de la mort immunogénique. HSP70 et HSP90 ont alors un effet immun stimulateur via leur interaction avec les récepteurs comme CD91 et CD40 situés sur les cellules présentatrices d'antigènes. Ces protéines peuvent également faciliter la présentation d'antigènes provenant de cellules tumorales via le MHC de classe I ce qui peut activer la réponse des lymphocytes T CD8+. D'autres DAMP sont caractéristiques de la mort immunogénique comme HMGB1 et ATP. HMGB1 est considéré comme un marqueur tardif d'apoptose, son relargage extracellulaire semble nécessaire pour une présentation optimale des antigènes aux cellules dendritiques. Lors de la mort immunogénique l'ATP semble avoir une fonction de signal dit « find me signal » pour les monocytes ce qui induit leur attraction sur le site d'apoptose (299).

1.4.4 Concept de radiosensibilisation

Comme expliqué précédemment, certaines cellules sont plus ou moins radiosensibles. On utilise parfois les termes de cellules radio sensibles ou radio résistantes, c'est-à-dire que selon le type de cellules, et en fonction de la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve la cellule au moment de l'irradiation, le rayonnement n'aura pas la même influence sur la survie de la cellule. En 1906, Bergonié et Tribondeau ont ainsi montré que la radiosensibilité d'une cellule varie

proportionnellement à sa capacité de division et de façon inversement proportionnelle à son degré de différenciation. Ainsi, deux types de cellules se dessinent :

- les cellules peu différenciées à prolifération rapide présentant une faible capacité de réparation sont très radiosensibles.

- les cellules à forte capacité de réparation sont moins radiosensibles et par conséquent parfois dites radio résistantes par abus de langage.

De plus, il faut noter que pour les cellules hypoxiques, le nombre de cassures simples brins de l'ADN est 3 à 4 fois plus faible que pour les cellules de mammifères oxygénées (300). Ces cellules hypoxiques sont aussi 2 à 3 fois plus résistantes vis-à-vis de l'irradiation que les mêmes cellules oxygénées. L'étalement dans le temps d'une dose influe aussi sur la survie cellulaire en raison de la réparation partielle des lésions qui peut survenir. Ainsi, Elkind et Sutton (301) ont montré qu'une irradiation en deux fractions, séparées par un intervalle de temps, induit un taux de létalité inférieur à celui obtenu avec une irradiation à la même dose totale délivrée en une seule fois. Certaines molécules peuvent aussi conférer des propriétés radio sensibilisatrices, radio protectrices ou restauratrices aux cellules.

Principalement deux stratégies ont été développées au cours des dernières décennies afin de contourner la radiorésistance tumorale et d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie.

La première stratégie repose sur l'escalade de dose, dont l'objectif est l'amélioration du contrôle locorégional. La faisabilité de l'escalade de dose était limitée par le seuil de tolérance des tissus sains environnants. Pour contourner cette limite, les modalités d'irradiation ont considérablement évolué au cours des dernières années. Les nouvelles techniques de radiothérapie (radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité, Tomothérapie Hélicoïdale, techniques de radiothérapie stéréotaxique, radiothérapie guidée par l'image, protonthérapie) permettent d'optimiser la précision et la distribution de la dose en réduisant l'irradiation délétère des tissus sains de voisinage afin de diminuer la toxicité déterministe de la radiothérapie. Ces « nouvelles » technologies permettent d'implémenter l'escalade de dose avec une toxicité acceptable pour les patients (302). Cette stratégie a montré son bénéfice dans certaines indications. Dans une méta-analyse de 2812 patients pris en charge pour un adénocarcinome prostatique et inclus dans des essais randomisés, l'escalade de dose au-delà de 70 Gy améliore la survie sans progression biochimique, quel que soit le groupe de risque des patients. Cependant, la toxicité est supérieure et il n'est pas démontré de bénéfice en survie globale à 5 ou 10 ans (303). Ces données n'excluent pas la possibilité que l'amélioration du contrôle de la maladie puisse s'accompagner d'un bénéfice en survie avec un suivi plus prolongé. Cependant, même avec un suivi prolongé, le bénéfice en contrôle local pourrait être contrebalancé par une évolution métastatique ou la toxicité du traitement. Chez les patients pris en charge pour un carcinome de l'œsophage, l'essai 94-05 du RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) a comparé une radio chimiothérapie standard à la dose de 50,4 Gy au même protocole à la dose de 64 Gy. Il n'a pas été montré de différence en contrôle locorégional ou en survie à deux ans (31 %

versus 40 %) entre les deux groupes (304). Les résultats de l'essai 0617 du RTOG dans le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) sont également décevants. Dans cet essai randomisé de phase III, une radio chimiothérapie concomitante délivrant 74 Gy en 2 Gy/fraction ne fait pas mieux qu'une radio chimiothérapie concomitante délivrant 60 Gy. L'escalade de dose ici serait même être délétère car plus toxique (305). Il semble que l'intérêt de la stratégie de l'escalade de dose soit partiellement contrebalancé par le haut risque métastatique chez les patients présentant une tumeur radio résistante, certaines voies de signalisation étant communes entre les mécanismes de radiorésistance et les mécanismes métastatiques, comme celles impliquées dans la réponse à l'hypoxie (306). Toutefois, il faut noter que les avancées technologiques ont permis une amélioration du pronostic des patients (307, 308).

La seconde stratégie d'optimisation de la radiothérapie se base sur une meilleure connaissance de la biologie tumorale, qui a permis d'identifier de nouvelles cibles moléculaires dont la modulation induit une radiosensibilisation tumorale. Ainsi, de très nombreux agents pharmacologiques ont été développés pour tenter d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie. Les associations d'une radiothérapie et d'un agent pharmacologique radio sensibilisant se sont progressivement imposées comme options thérapeutiques voire comme standards dans de certaines situations cliniques.

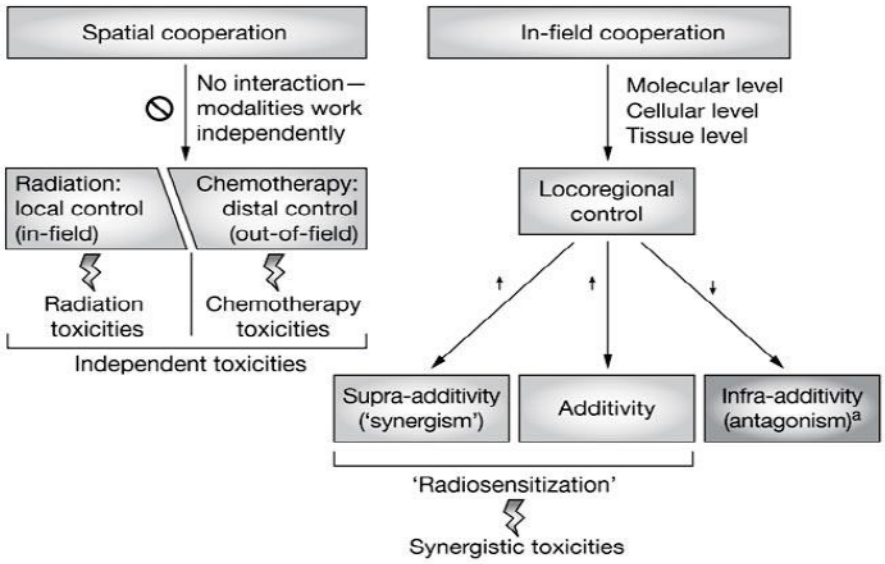


Figure 24 : Coopération spatiale et moléculaire conduisant à une radiosensibilisation (106)

Le concept d'interaction entre une drogue et la radiothérapie a été introduit fin des années 1970 (309). Le rationnel sous-jacent à la potentialisation de l'efficacité clinique des rayonnements ionisants par des agents pharmacologiques est fondé sur le principe d'une coopération d'action spatiale et moléculaire.

Le terme de "radiosensibilisation" décrit la situation de coopération moléculaire dans laquelle l'association d'un agent systémique et d'une radiothérapie produirait un effet égal ou

supérieur à la somme des effets de chacune de ces modalités thérapeutiques utilisées séquentiellement, définissant ainsi respectivement un effet additif ou un effet supra-additif (310).

Potentiellement complémentaire de la notion de radio sensibilisation, la coopération spatiale décrit le scénario selon lequel l'agent systémique agirait contre les micro-métastases, tandis que la radiothérapie assurerait le contrôle locorégional, sans interaction biologique directe entre les deux agents. En réalité, cette notion peut également s'étendre aux cas où l'irradiation et les traitements systémiques agissent sur deux compartiments cellulaires distincts. Cependant, pour être pleinement exploitable, l'effet de coopération spatiale nécessite que les agents ne présentent pas de toxicité synergique pour que chacune des deux modalités thérapeutiques puisse être utilisée à dose efficace sans augmenter les effets indésirables de manière inacceptable (311). De nombreux essais cliniques ont montré que la radio chimiothérapie améliorait la survie, en comparaison à une radiothérapie seule (312). Ceci pourrait s'expliquer par une activité systémique de la chimiothérapie à l'encontre des métastases, même si elle est délivrée à doses radio sensibilisantes mais également par l'amélioration du contrôle local (et donc la diminution des métastases secondaires aux rechutes locales).

Stricto sensu, un vrai radio sensibilisant ne devrait pas posséder de cytotoxicité intrinsèque. Les exemples s'en rapprochant le plus sont les radio-sensibilisants développés pour cibler l'hypoxie, facteur de radio résistance tumorale. Cependant, les agents radio sensibilisants les plus fréquemment utilisés (sels de platine, 5 fluoro-uracile [5-FU], et taxanes) ont leur cytotoxicité propre, qui peut potentiellement générer des dommages sur les tissus sains et/ou amplifier les lésions radio-induites. L'effet différentiel en faveur de l'association thérapeutique ne sera atteint que si son effet anti tumoral est supérieur à sa toxicité sur les tissus non tumoraux (312). Les associations infra-additives peuvent être envisagées si elles diminuent la cytotoxicité de la radiothérapie sur les tissus sains, permettant d'envisager une escalade de la dose de radiothérapie. Elles ne se conçoivent que si leur sélectivité à l'égard des tissus sains est démontrée. Ces stratégies sont encore très peu développées mais des drogues « radio protectrices des tissus sains » sont à l'étude.

Au-delà de la coopération spatiale, plusieurs mécanismes contribuent à la radiosensibilisation par coopération de type « in-field » (Figure 24). Au niveau tissulaire, l'irradiation peut augmenter la perméabilité vasculaire et améliorer l'accessibilité et la concentration des agents pharmacologiques au niveau de la tumeur (313). Au niveau cellulaire, les traitements systémiques peuvent augmenter la sensibilité tumorale aux rayonnements ionisants par exemple en inhibant les mécanismes de réparation de l'ADN, en augmentant la formation de radicaux libres et de cassures doubles brins (CDB) de l'ADN, en arrêtant les cellules dans une phase radiosensible, ou en inhibant de voies de signalisation (312-314).

Il est aujourd'hui clairement établi, avec un niveau de preuve IA, pour plusieurs type de cancers, que la radio chimiothérapie concomitante améliore l'efficacité de la radiothérapie sur le contrôle local tumoral, et parfois la survie (315, 316). Cependant, les stratégies actuelles de radio chimiothérapie demeurent insuffisantes en particulier dans les cancers de stade localement

avancé. Pour exemples, la médiane de survie d'un gliome malin atteint à peine 18 mois, la survie à deux ans d'un carcinome épidermoïde de l'oropharynx de stade III est de l'ordre de 55 % et la survie à cinq ans d'un CBNPC de stade IIIA ne dépasse pas 30 % (317). Avec la connaissance accrue de la biologie tumorale, le nombre de cibles potentielles pour radio sensibiliser la tumeur n'a cessé d'augmenter et autant de stratégies sont en cours d'évaluation préclinique. Certaines ciblent directement la cellule et ses mécanismes connus de radiorésistance (réparation des lésions de l'ADN, voies de régulation du cycle et de la mort cellulaire), mais d'autres ciblent le microenvironnement tumoral, c'est-à-dire la vascularisation de la tumeur et/ou son stroma non vasculaire (fibroblastes, environnement immunitaire), dont le rôle dans la réponse aux rayonnements ne cesse d'être redéfini.

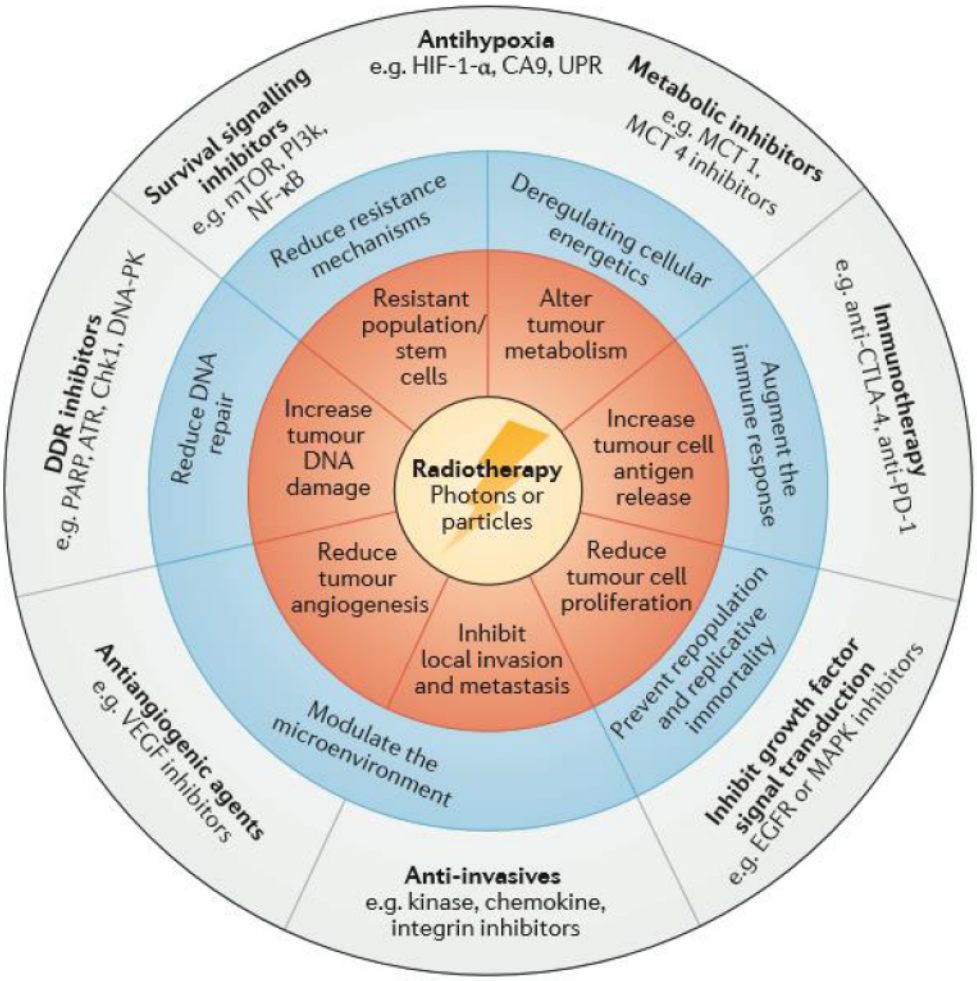


Figure 25 : Stratégies de combinaison à la radiothérapie développées pour augmenter l'efficacité anti tumorale de la radiothérapie (315)

ATR, ataxia telangiectasia and Rad3-related protein; CA9, carbonic anhydrase 9; Chk1, checkpoint kinase 1; CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4; DDR, DNA damage response; DNA-PK, DNA-dependent protein kinase; HIF-1-α, hypoxia-inducible factor 1-alpha; MCT 1, monocarboxylate transporter 1; MCT 4, monocarboxylate transporter 4; mTOR, mechanistic target of rapamycin ; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; PD-1, programmed cell

death protein 1; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; NF-κB, nuclear factor-kappa-B; UPR, unfolded protein response.

Toutefois, en dehors des associations chimiothérapie classiques et de radiothérapie il existe peu de combinaison démontrant une synergie entre un nouveau traitement systémique et la radiothérapie (318, 319). L'implémentation des nouvelles techniques de radiothérapie ouvre d'intéressantes opportunités de combinaisons encore peu étudiées à ce jour. Ces évaluations pourraient tirer bénéfice de l'utilisation de prescriptions à dose isotoxique provenant de l'expérience acquise en radiothérapie fractionnée conventionnelle (320).

1.4.5 Modulation de la radiosensibilité

1.4.5.1 Hypoxie tumorale et modulation de la radiosensibilité

L'hypoxie tumorale, caractéristique habituelle des tumeurs, est classiquement définie par une pression partielle tissulaire en oxygène inférieure à 10 mm Hg (321). Cette hypoxie tumorale est un facteur majeur de radiorésistance. Ainsi, de nombreuses données précliniques montrent qu'une cellule oxygénée est plus sensible à l'irradiation qu'une cellule placée en conditions hypoxiques. Le facteur d'augmentation de la sensibilité est de l'ordre de 3 pour des cellules irradiées en culture sous oxygène en comparaison à des cellules irradiées sous nitrogène à moins de 5 ppm d'oxygène (322). Il existe une corrélation forte entre la probabilité de contrôle local et le degré d'hypoxie tumorale. Une pression en oxygène inférieure à 2,5 mm Hg dans les tumeurs est un important facteur pronostic péjoratif en cas de carcinome de la sphère ORL, associé à un risque accru de récidives locales après radiothérapie (323). Pour les patientes irradiées pour un cancer du col utérin, la probabilité de rechutes locales est également augmentée lorsqu'il existe une anémie inférieure à 10 g/dl (324).

De nombreux mécanismes expliquent le rôle péjoratif de l'hypoxie dans la réponse à l'irradiation. D'une part, l'oxygénation permet d'entretenir la cascade radicalaire créée par les rayonnements ionisants. Comme nous l'avons vu, les lésions radio-induites de l'ADN peuvent être le résultat d'une interaction directe avec un photon du rayonnement ionisant ou avec un électron secondaire à l'absorption d'un photon. Cette interaction entraîne un processus primaire d'excitation ou d'ionisation en 10^{-19} à 10^{-15} secondes de la molécule d'ADN. Cependant, les lésions radio-induites sont principalement le résultat d'une action indirecte du rayonnement ionisant, la molécule d'ADN interagissant avec les radicaux libres générés par la radiolyse de l'eau elle-même secondaire à l'interaction d'un électron secondaire avec une molécule d'eau. Ces réactions radicalaires sont entretenues par la présence d'oxygène sous la forme de radicaux super oxyde (O2°-) ou hydro peroxyde (OOH°). En conditions hypoxiques le manque d'O^2 ne permet pas l'entretient de ces réactions, il y a donc moins de radicaux libres et par conséquents moins de dommages causés par ceux-ci. D'autre part, l'hypoxie tumorale conduit les cellules cancéreuses à modifier leur métabolisme en faveur d'un métabolisme glucidique qui active la synthèse de facteurs

de croissance et de facteurs impliqués dans la radiorésistance, comme les protecteurs thiols (chélateurs des radicaux libres) et des enzymes de réparation de l'ADN (325). Enfin, plusieurs proto-oncogène impliqués dans la radiorésistance, l'acquisition d'un phénotype métastatique ou la néo angiogenèse tumorale sont activés par l'hypoxie. C'est le cas des gènes codant pour le VEGF, l'érythropoïétine, la tyrosine hydroxylase, l'endothéline-1, l'interleukine (IL) 1alpha, ou la cyclooxygénase 1 (COX-1). L'activation de ces gènes par l'hypoxie contribue à exercer une pression de sélection sur les tumeurs en faveur de l'expansion d'un pool de cellules plus agressives (326, 327).

Le facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor) est un acteur central de la régulation de l'hypoxie. Sa surexpression est fréquente dans les tumeurs et associée à un pronostic péjoratif, à une angiogenèse et un pouvoir métastatique accru (328-330). En situation de normoxie, HIF-1 est dégradé par le protéasome sous le contrôle du gène VHL (Von Hippel Lindau) (331). En situation d'hypoxie, la sous-unité HIF-1α est stabilisée et se lie à HIF-1β pour former le complexe HIF-1 dans le noyau. HIF-1 active alors l'expression de gènes de promotion de l'angiogenèse, dont le gène du VEGF. HIF-1 semble également être un acteur de la survie des cellules souches cancéreuses (332). Ces cellules se caractérisent par une relative surexpression des gènes Gclm et Gss qui codent respectivement pour la sous-unité régulatrice de la glutamate-cystéine ligase et pour la glutathion-synthase. Le glutathion est un réducteur intracellulaire aux propriétés antioxydantes et protecteur vis-à-vis des radicaux libres de l'oxygène, contribuant donc à la radiorésistance des cellules souches au sein d'une tumeur (333).

De nombreuses stratégies ont été développées pour tenter d'améliorer l'oxygénation tumorale (334). Celles-ci comprennent l'oxygénation hyperbare, la correction de l'anémie par de fortes doses d'érythropoïétine (EPO), l'irradiation accélérée en présence de carbogène (mélange d'oxygène à 95% et de dioxyde de carbone à 5% qui permet d'augmenter l'oxygénation tissulaire) et de nicotinamide (dérivé vasoactif de la vitamine B qui empêche les variations de perfusion tumorale qui favorisent l'hypoxie aiguë intra tumorale), ou l'utilisation de molécules radio sensibilisantes en conditions hypoxiques, telles que la tirapazamine.

Les injections d'EPO activent la production érythrocytaire via l'action de cette cytokine sur les progéniteurs érythroblastiques et permettent de corriger efficacement l'anémie et les symptômes qui lui sont liés. Cependant, cette stratégie n'améliore pas la survie des patients traités pout un cancer de la sphère ORL. Au contraire, Henke *et al.* ont montré que la survie sans progression était inférieure en cas de traitement par EPO. Une explication serait la présence de récepteurs tumoraux à l'EPO (335). Dans une méta analyse de la Cochrane, l'oxygénation hyperbare permet de diminuer le risque de récidive, mais au prix d'une toxicité majorée (336).

La tirapazamine est un agent radio sensibilisant sélectif des tissus tumoraux. En situation d'hypoxie, elle subit plusieurs réductions successives qui aboutissent à la formation d'un radical tirapazamine qui libère une molécule d'eau pour former un radical hydroxyle ou un radical BTZ (oxiding benzotriazinyl). Les radicaux alors formés par tirapazamine exercent leur toxicité à l'encontre de la topo isomérase II, ce qui favorise la création de cassures double brin (80). En

présence d'oxygène, par exemple dans les tissus non tumoraux, la forme ionisée de la tirapazamine subit une réduction qui l'inactive et empêche sa cytotoxicité (337). Les résultats des essais cliniques évaluant la tirapazamine en association à la radiothérapie sont mitigés avec notamment l'essai de phase III du TROG 02.02 qui ne retrouve pas de bénéfice à l'adjonction de la tirapazamine a un traitement standard associant cisplatine et radiothérapie pour des cancer ORL localement avancés (338). Toutefois il faut reconnaitre que cette absence d'efficacité de la tirapazamine pourrait aussi être liée à la forte hétérogénéité et à la qualité discutable de la radiothérapie dans cet essai (339). Il existe de multiples études réalisées sur les 40 dernières années montrant qu'il est possible de partiellement reverser l'hypoxie tumorale dans les tumeurs solides. Une revue systématique de la littérature a identifié 10.108 patients participant à 86 essais randomisés conçus pour montrer l'intérêt de moduler l'oxygénation tumorale à des fins radio-sensibilisantes. Globalement, la modification de l'hypoxie tumorale améliorerait significativement l'efficacité de la radiothérapie, avec un odd ratio (OR) de 0,77 (IC95% : 0,71 – 0,86) pour le contrôle locorégional et un OR de 0,87 pour la survie globale (IC95% : 0,80 – 0,95). Cet effet sur la survie semble directement lié à un bénéfice en contrôle locorégional car l'effet sur les métastases n'est pas significatif.

En pratique clinique, l'utilisation des radio sensibilisants de l'hypoxie est en cours de développement (334). De nouvelles pro drogues plus sélectives que la tirapazamine, car activées en condition hypoxique plus drastique, comme l'evofosfamide (TH-302) sont en phase précoce d'évaluation clinique en association à la radiothérapie du fait de données précliniques prometteuses (334, 340, 341).

1.4.5.2 HDACi et modulation de la radiosensibilité

A ce jour la plus part des données de la littérature associant HDACi et irradiation montrent une potentialisation *in vitro* de l'effet de l'irradiation (342-347). Un nombre plus limité d'études rapportent des données *in vivo* par exemple dans des modèles de tumeurs de prostate ou de tumeurs cérébrales et montrent également un effet radio sensibilisant des HDACi comme le MS-275 ou le VPA (344, 345). La protéine sérine/thréonine kinase ATM (Ataxia telangiectasia mutated) est activée en réponse aux dommages de l'ADN de type CDB (222, 348). ATM activée phosphoryle et active des substrats clés en aval comme 53BP1 (p53-binding protein 1), p53, breast cancer gene 1 (BRCA1), CSK-homologous kinase 2 (CHK2) et γ-H2AX qui permettent la réponse biologique aux dommages de l'ADN en particulier via l'induction des checkpoints (ou points de restriction) du cycle cellulaire ou l'apoptose (348). Il a également été montré que le remodelage de la chromatine en l'absence de CDB de l'ADN peut activer ATM et des agents comme les HDACi peuvent mimer les effets du stress génotoxique en induisant l'activation des voies de réponse aux dommages de l'ADN (349). L'HDAC1 interagit avec ATM (350) et les traitements par HDACi induisent rapidement une phosphorylation de ATM et p53 mais n'induisent pas de modification de la phosphorylation de γ-H2AX ni de modulation de la formation des foci

H2AX (349). De plus, il a été montré qu'ATM est requise pour l'induction transcriptionnelle de CDKN1A et de la topo III α sous l'effet des HDACi bien que les bases moléculaires de cet effet d'ATM ne soient pas connues. Les HDACi semblent pouvoir freiner certaines voies de réparation de l'ADN en entraînant une diminution de l'expression de protéines de réparation de l'ADN comme KU70, KU86 et la protéine kinase de l'ADN (DNA PKcs) (351). Les cellules Knockout pour les protéines de réparation de l'ADN Ku70, Ku80 et l'ADN ligase IV sont hypersensibles à l'apoptose induite par les HDACi (352, 353). De nombreuses questions persistent concernant les mécanismes moléculaires de l'activation d'ATM par les HDACi et l'importance de leur effet mimétique des lésions de l'ADN pour l'activité anti tumorale des HDACi. Toutefois il est possible que la capacité des HDACi à induire une activation de la réponse aux dommages de l'ADN tout en supprimant la capacité des cellules à réparer ces dommages puisse avoir un rôle important non seulement en induisant une majoration de l'apoptose mais aussi en potentialisant l'effet d'autre agents thérapeutiques et en particulier de la radiothérapie.

Par ailleurs, les radioépithélites peuvent être un facteur limitant de la dose de radiothérapie délivrée chez les patients présentant un cancer. Le développement de drogues protégeant sélectivement les tissus sains des dommages radio-induits (comme pour la peau la radioépithélite ou plus tardivement la fibrose) tout en maintenant ou même en renforçant l'effet anti tumoral de la radiothérapie constitue une véritable quête du graal pour les oncologues radiothérapeutes (354). Si les HDACi semblent pouvoir renforcer la capacité de l'irradiation à tuer les cellules tumorales, il est tout aussi intéressant de noter la capacité des HDACi à supprimer de manière concomitante les toxicités cutanées radio induites qu'ont montré certaines équipes (354). L'utilisation en traitement topique de différents HDACi supprime l'expression radio induite de cytokines inflammatoires comme le TNFα et le facteur de croissance tumoral-β (TGFβ) et les toxicités cutanées associées à leur augmentation post radique habituelle (354). Mais n'est pas encore démontré que la suppression du TNFα et/ou du TGFβ soit le mécanisme nécessaire et suffisant à la suppression des toxicités cutanées observée lors du traitement par certains HDACi. Il est donc particulièrement important d'explorer d'avantage non seulement les mécanismes de radiosensibilisation des cellules tumorales par les HDACi mais également leur possible effet radio protecteur des tissus sains et les mécanismes sous-jacents dans l'optique du développement de nouvelles combinaisons d'HDACi avec la radiothérapie chez l'homme.

1.4.5.3 Effet radio sensibilisant du cisplatine

Au cours des 30 dernières années, les sels de platine, se sont imposés comme principaux agents de chimiothérapie pour le traitement des tumeurs solides. Le cisplatine (diaminedichloroplatinum II) puis le carboplatine (1-cyclobutanedicarboxylato-platinum(II)) ont été les premiers de ce groupe d'agents dérivés du platine (355).

Le cisplatine exerce une cytotoxicité propre via sa fixation aux résidus guanines, qui génère des adduits et des ponts intra brins ou inter brins de l'ADN interférant avec sa réplication et

sa réparation (356). La réponse cellulaire à l'exposition au cisplatine comprend l'activation des voies de transduction et de réparation, des arrêts de la réplication, l'inhibition de la transcription (357). Les adduits produits par le cisplatine sont principalement réparés via le système d'excision de nucléotides (NER : Nucleotide excision repair), mais d'autres systèmes de réparation peuvent être mis en jeu. Des études réalisées sur cellules en culture ont montré que l'inactivation de la voie de recombinaison non homologue (NHEJ : non homologous end-joining) ne modifiaient pas la réponse au cisplatine. Au contraire, les mutations de la recombinaison homologue augmentent significativement la sensibilité à cet agent (358). Le système MMR (Missmatch repair) semble intervenir dans la signalisation des lésions de l'ADN causées par le cisplatine et dans l'initiation des mécanismes d'apoptose lors de l'exposition à la drogue (359). Il n'a pas été démontré de relation entre la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve la cellule tumorale et sa sensibilité au cisplatine. La dose à laquelle le cisplatine est administré a un impact sur la réponse cellulaire. A fortes doses, le cisplatine entraîne une augmentation de l'apoptose. A doses plus faibles, on observe essentiellement des arrêts dans le cycle en G2 et une mort mitotique. Ainsi, dans des tumeurs de liposarcomes 9L p53-mutées, l'injection intrapéritonéale de cisplatine à la dose de 1m/kg génère une catastrophe mitotique dans les tumeurs, mais assez peu d'apoptose (360).

Il existe un fort rationnel biologique à associer le cisplatine à la radiothérapie. La fixation du cisplatine sur les bases puriques (adénine, guanine) de l'ADN ou de l'ARN à proximité des cassures simple brin (CSB) induites par l'exposition aux rayonnements ionisants contribue à expliquer la synergie du cisplatine avec la radiothérapie, en les transformant en équivalent de CDB et donc rendant leur réparation plus difficile (361). Le facteur d'augmentation de la dose a été estimé à 1,2 - 1,4 dans les lignées de CBNPC comme H460 (356, 362). Certains auteurs ont suggéré que l'effet radio sensibilisant du cisplatine serait maintenu en situation d'hypoxie (363). Les résultats d'association *in vivo* montrent que le cisplatine augmente l'effet anti tumoral de la radiothérapie. Cependant, l'efficacité de l'association dépend du modèle utilisé mais également de la séquence d'administration. La séquence d'administration la plus efficace est celle où le cisplatine est administré de façon concomitante à la radiothérapie, l'association étant alors le plus souvent supra additive (364). Une étude ancienne portant sur des modèles de tumeurs mammaires irradiées a montré qu'une administration de cisplatine réalisée 30 minutes avant irradiation augmentait la sensibilité à l'irradiation d'un facteur 1,8, alors que l'augmentation n'était que de 1,3 lorsque le cisplatine était administré 30 minutes ou quatre heures après irradiation (365).

Développé à la suite du cisplatine, le carboplatine possède un spectre d'activité relativement proche. La différence entre les deux agents repose essentiellement sur un profil de tolérance en faveur du carboplatine. Les adduits de platine générés par le carboplatine sont très similaires à ceux du cisplatine, mais la concentration d'agent nécessaire pour obtenir le même niveau d'adduits est environ quatre fois supérieure pour le carboplatine (366). Comme le cisplatine, le carboplatine augmente la sensibilité à l'irradiation (association supra additive), probablement en compliquant la réparation des CSB radio-induites, induisant une augmentation de la mort

apoptotique (367). Certaines données précliniques obtenues sur cellules en culture suggèrent que l'irradiation augmenterait les concentrations intracellulaires de carboplatine, en particulier en situation hypoxique (368).

L'oxaliplatine (trans-L-diaminocyclohexane oxalate platinum II) a été plus récemment introduit dans l'arsenal thérapeutique. Il est principalement utilisé pour les tumeurs gastro-intestinales et urothéliales. Il s'agit d'un diaminocyclohexane qui entraine également la formation d'adduits sur l'ADN et empêche ainsi la réplication et la transcription de l'ADN. Comme pour les autres sels de platine, les pontages inter-brins sont les lésions les plus toxiques générées par l'oxaliplatine (369). En raison de distorsions conformationnelles au niveau de l'adduit, il semble que les systèmes de réparation mis en jeu pour réparer les lésions induites par le cisplatine et par l'oxaliplatine ne soient pas strictement identiques, l'oxaliplatine étant plus cytotoxique que le cisplatine (370). En effet, la protéine dite de multi drogue résistance (MMR) ne prendrait pas en charge les adduits d'oxaliplatine, contrairement aux adduits de cisplatine. Ceci pourrait expliquer pourquoi certaines tumeurs résistantes au carboplatine ou au cisplatine puissent répondre à l'oxaliplatine (371). Les données moléculaires quant à la radiosensibilisation par l'oxaliplatine sont plus limitées. L'oxaliplatine semble synergique avec l'irradiation (372).

Bien que les causes biologiques soient incertaines, il semble que l'effet radio sensibilisant de l'oxaliplatine soit dépendant du statut p53 des lignées tumorales. Ainsi, dans des cellules au statut p53 sauvage, l'association de l'oxaliplatine et de la radiothérapie est synergique, la meilleure séquence étant lorsque la drogue est administrée 2 heures avant l'irradiation, l'effet étant au minimum additif. Dans des lignées au statut p53 muté, les effets sont plutôt infra additifs (373).

1.5 CANCER BRONCHIQUE NON A PETITES CELLULES

Le cancer bronchique est le plus meurtrier au monde (374). Avec plus de 30 000 cas par an en France, selon le rapport de l'Institut national de veille sanitaire (INVS) en 2010, il est au quatrième rang des cancers les plus fréquents. Tous stades confondus, le taux de survie à cinq ans est d'environ 14 % (375). Les carcinomes bronchiques « non à petites cellules » regroupent principalement les adénocarcinomes, les carcinomes épidermoïdes et les carcinomes à grandes cellules. Ils représentent près de 85 % des cancers bronchiques et sont dans 60 à 75 % des cas diagnostiqués alors qu'ils sont inopérables, localement évolués ou métastatiques, et de pronostic défavorable. Dans la classification TNM de 2009, les cancers de stade III (localement évolués), dont le traitement de référence demeure la radio chimiothérapie concomitante, restent un groupe hétérogène comprenant des tumeurs classées de T1 à T4 et de N0 à N3 (376). Le profil épidémiologique de ces cancers est également hétérogène avec une augmentation de l'incidence chez la femme et les non-fumeurs. La radio chimiothérapie concomitante représente le standard pour les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) localement évolués et pour les cancers bronchiques à petites cellules localisés. Les doublets à base de platine les plus souvent

utilisés en association à la radiothérapie sont les doublets cisplatine/vinorelbine, cisplatine/étoposide, et carboplatine/paclitaxel. Des méta-analyses ont montré la supériorité d'une radio chimiothérapie versus une radiothérapie exclusive, avec un bénéfice en survie de 15 % à 5 ans pour les CBNPC inopérables (377). La radio chimiothérapie concomitante améliore également la survie sans progression, quel que soit le site (HR : 0.69, IC95% : 0,58 – 0,91) (378). Avec un suivi médian de 6 ans, une méta analyse du groupe collaboratif d'étude du CBNPC a confirmé le bénéfice de la radio chimiothérapie concomitante sur la radio chimiothérapie séquentielle en termes de taux de réponse et de survie. Ce bénéfice était clairement attribuable à l'amélioration du contrôle local, puisque le taux de récidives métastatiques n'était pas affecté. La radio chimiothérapie concomitante améliorait la survie globale avec un bénéfice de 4,5 % à 5 ans (379). La comparaison de la radio chimiothérapie séquentielle et de la radio chimiothérapie concomitante montre que le bénéfice en survie de la radio chimiothérapie ne se limite pas à une coopération spatiale et que l'amélioration du contrôle locorégional contribue à améliorer la survie globale. En dépit de taux de réponse initiaux non négligeables, le taux de contrôle local reste décevant et les dissémination métastatiques précoces fréquentes. Une meilleure compréhension de la biologie et de la physiologie des tumeurs pulmonaires a permis d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques conduisant au développement de nouveaux agents dont les plus évolués sont les « anti-epidermal growth factor receptor » (anti-EGFR) et les anti angiogéniques. De nombreuses autres voies et stratégies pouvant optimiser la radiothérapie sont actuellement à l'étude et l'association aux HDACi en est une particulièrement prometteuse. En effet, nombreuses tumeurs, en particulier bronchique, présentent une surexpression des HDAC (380). Les HDACi entraînent une acétylation des histones des cellules saines et tumorales de la même manière. Mais la différence d'expression des HDAC entre les tissus sains et les tissus tumoraux pourrait être responsable d'un effet différentiel des HDACi tout à fait propice à la majoration de l'effet thérapeutique des rayonnements ionisants sur le tissu tumoral.

2 – OBJECTIFS

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux possibles bénéfices et aux effets synergiques et/ou additifs de la combinaison d'HDAC inhibiteurs à la radiothérapie seule ou en combinaison à d'autres drogues et en particulier au cisplatine pour les tumeurs solides ainsi que les mécanismes qui sous-tendent ces effets et contribuent à la réponse anti-tumorale *in vitro*, *in vivo* et chez l'homme. Nous avons également évalué l'effet la tolérance et la toxicité des HDACi sur les tissus sains. Ce travail de thèse s'inscrit donc dans une stratégie globale d'évaluation de recherche translationnelle de combinaison drogue et de radiothérapie dans le but d'optimiser les chances de succès clinique de la combinaison et d'amélioration des résultats thérapeutiques actuels.

1/ Nous avons d'abord évalué la combinaison d'un pan HDACi, l'abexinostat à l'irradiation ***in vitro*** dans deux modèles de CBNPC humain avec pour objectif principal la recherche d'un éventuel effet radio sensibilisant. Afin de comprendre les mécanismes sous-jacents nous avons exploré d'une part la modulation de l'apoptose radio-induite et d'autre part la modulation de la réparation des dommages radio induits de l'ADN sous l'effet de l'abexinostat.

2/ Puis, nous avons évalué l'effet de cette combinaison ***in vivo*** dans des xénogreffes sous-cutanées de CBNPC humain en termes d'efficacité anti-tumorale d'une part et de toxicité d'autre part. Du fait d'une tolérance acceptable nous avons ensuite évalué différentes triples combinaison associant l'abexinostat et la radiothérapie à une troisième drogue (cisplatine ou cetuximab ou PARP inhibiteur). Seuls les résultats les plus démonstratifs en combinaison avec le cisplatine retenus pour publication sont présentés ici. Les schémas d'administration progressivement mis au point ne sont pas détaillés et seuls sont présentés les schémas de traitement finalement retenus.

3/ Enfin, nous avons évalué **chez l'homme**, dans le cadre d'un essai de phase I d'escalade de dose la combinaison de l'abexinostat avec une radiothérapie palliative hypo fractionnée chez des patients présentant des tumeurs solides avancées. L'objectif principal de cette étude de combinaison abexinostat/radiothérapie réalisée pour la première fois chez l'homme a été de d'évaluer le profil de tolérance et de toxicité de cette combinaison en déterminant la dose maximale tolérée (MTD), la dose limitante toxique (DLT) ainsi que la dose recommandable pour de futures essais.

Les matériels et méthodes sont décrits en annexe 1.

3 – PRESENTATION DES TRAVAUX

3.1 EVALUATION DE LA MODULATION DE LA RADIOSENSIBILITE TUMORALE PAR L'ABEXINOSTAT IN VITRO ET IN VIVO

3.1.1 Rationnel

Comme nous l'avons vu en introduction l'épigénétique est un champ de recherche prometteur dans lequel de plus en plus de données précliniques et cliniques suggèrent un fort potentiel pour le traitement des cancers. Il est aujourd'hui bien établi que les modifications épigénétiques sont essentielles à l'apparition et à la progression tumorale (45, 381, 382). Parmi ces modifications épigénétiques la régulation de l'acétylation des histones et de certaines protéines non histones a un rôle clé dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans le développement tumoral (383, 384). Ces modifications étant dynamiques et réversibles elles constituent d'excellentes cibles thérapeutiques (385). De nombreuses petites molécules inhibant l'activité des HDAc ont été développées ces dernières années. Ces HDACi regroupés en 4 classes ont montrés une activité anti tumorale intéressante seuls ou en combinaison avec diverses chimiothérapies *in vitro* et *in vivo* (386, 387). Etant donné leur caractère multi cibles les mécanismes biologiques expliquant leur effet anti tumoral sont difficiles à identifier, probablement multiples et quoiqu'il en soit encore mal connus.

Bantscheff *et al* ont montré que les HDACi ciblant plusieurs HDAC pourraient être plus efficaces que les HDACi spécifiques d'un type d'HDAC (388). L'évaluation d'un nouveau pan HDACi, l'abexinostat que nous proposons dans ce travail de thèse s'inscrit dans cette stratégie.

Plusieurs travaux *in vitro* et *in vivo* suggèrent que l'effet anti tumoral des HDACi peut être dû à l'induction d'un arrêt du cycle cellulaire, de mécanismes de mort cellulaire comme l'apoptose et l'autophagie et d'une altération des capacités de réparation de l'ADN (381, 382, 389, 390). En effet, il a été montré que les HDACi peuvent inhiber la réparation de l'ADN par recombinaison homologue via la répression d'expression de RAD51 un gène clé de cette voie de réparation (391). La recombinaison homologue étant l'une des deux voies majeures de réparation des cassures double brin induites par les rayonnements ionisants, il existe un fort rationnel en faveur du ciblage pharmacologique des HDAC par les HDACi en association aux rayonnements ionisants pour majorer l'effet anti tumoral de chacun de ces deux traitements (382).

Les cancers bronchiques non à petites cellules constituent un modèle d'étude d'intérêt car ils représentent un problème majeur de santé publique (85 % des cancers bronchiques) et qu'il s'agit d'une pathologie dont le pronostic reste très sombre et pour laquelle il existe un besoin majeur d'amélioration de l'efficacité thérapeutique. Le traitement standard des carcinomes bronchiques non à petites cellules localement avancé repose sur l'association concomitante de la

radiothérapie et de la chimiothérapie à base de platine (379). Par conséquent, développer de nouvelles combinaisons permettant de renforcer l'efficacité de la radiothérapie dans ce type de pathologie prend tout son sens.

3.1.2 Résultats (données partiellement soumises à Oncotarget, en révision mineure sous la référence n° #018532)

Nous avons choisi d'évaluer l'abexinostat (également nommé PCI-24781-HCI ou S78454-1) et son association à la radiothérapie dans deux lignées humaines de CBNPC non mutées pour EGFR, K-Ras mutées et P53 sauvages: les cellules H460 et A549, pour lesquelles certaines données récentes suggéraient que les HDACi pouvaient avoir un effet anti tumoral.

3.1.2.1 L'Abexinostat radio sensibilise les cellules de CBNPC *in vitro* en normoxie et en hypoxie

Administré en monothérapie, l'abexinostat inhibe la prolifération des deux lignées cellulaires de CBNPC testées, H460 et A549 de manière dose dépendante. L'IC50 de la prolifération c'est-à-dire la concentration pour laquelle l'abexinostat réduit de 50 % le nombre de cellules viables après 48 heures de traitement est de 1.75 µmol/L et 2µmol/L respectivement pour A549 et H460 (Figure 26 A et B). Ceci suggère que les cellules A459 sont plus sensibles à l'abexinostat en monothérapie que les cellules H460.

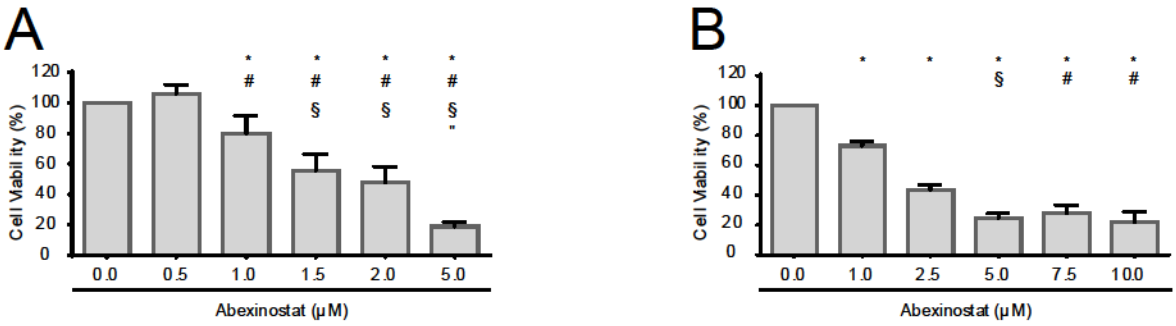


Figure 26 : L'abexinostat inhibe la prolifération des cellules tumorales en normoxie (O^2=21%)

*Prolifération (test WST-1): Les cellules A549 (A) et H460 (B) sont ensemencées et exposées à l'abexinostat 24 heures plus tard, puis colorées par Bleu de Trypan et comptées après 48h d'exposition à l'abexinostat. Le milieu de culture sans drogue a été utilisé comme contrôle. Les résultats représentent les moyennes +/- déviation standard de 3 expérimentations indépendantes. Les barres d'erreur représentent les déviations standards. * représente p ≤ 0.05.*

L'administration de l'abexinostat en combinaison avec l'irradiation inhibe également la survie clonogénique de manière dose-dépendante dans les deux lignées testées, les cellules A549

étant plus résistantes à l'irradiation et à la combinaison (irradiation et abexinostat) que les cellules H460. L'exposition à l'abexinostat 24 h avant irradiation, réduit significativement la fraction de cellules survivantes à 6 Gy (que l'on appelle la SF6) pour les deux lignées étudiées en normoxie (O^2 = 21%).

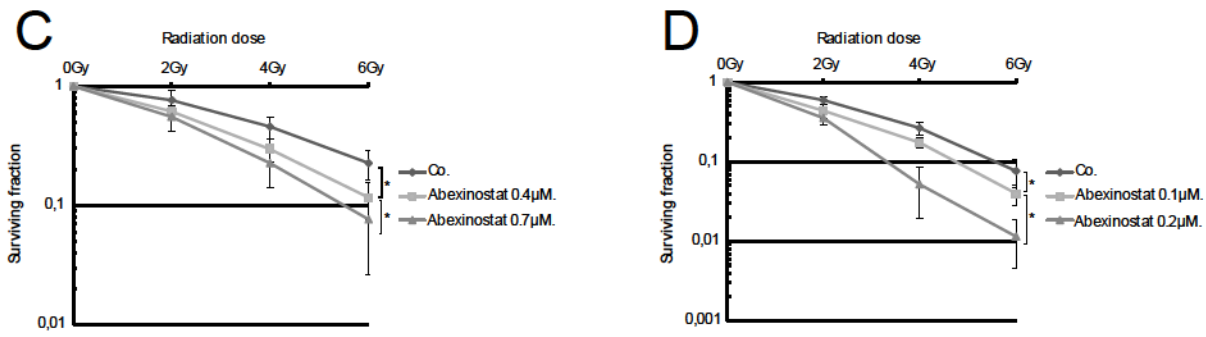


Figure 27 : L'abexinostat combiné à l'irradiation inhibe la survie clonogénique des cellules tumorales en normoxie (O^2 = 21%)

*Clonogénicité : Les cellules A549 (C) et H460 (D) sont traitées par 4h après ensemencement, le milieu de culture est changé 24h après irradiation et les cellules sont incubées durant 10 à 14 jours. Puis, les clones sont arrêtés et comptés (normalisation par rapport aux cellules non traitées). Le milieu de culture sans drogue a été utilisé comme contrôle. Les résultats représentent les moyennes +/- déviation standard de 3 expérimentations indépendantes. Les barres d'erreur représentent les déviations standards. * représente p ≤ 0.05.*

Afin de déterminer si l'effet observé pouvait être un effet de classe nous avons montré que l'administration de LBH 589 ou panobinostat (un autre pan HDAC inhibiteur) en combinaison avec l'irradiation inhibe également la survie clonogénique de manière dose-dépendante dans les deux lignées testées ce qui est cohérent avec les données de la littérature qui semblent en faveur de cette hypothèse (392).

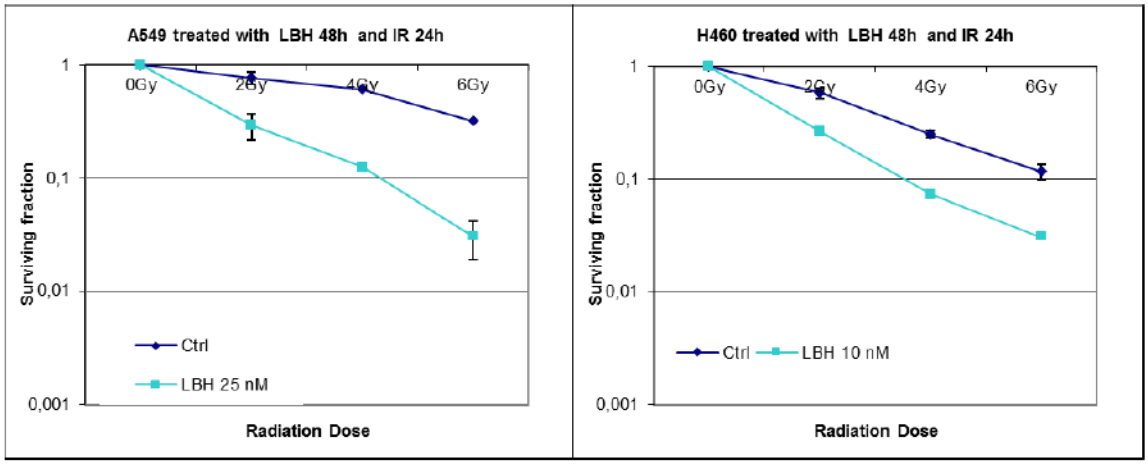


Figure 28 : Le panobinostat (LBH 589) combiné à l'irradiation inhibe la survie clonogénique des cellules tumorales en normoxie (O^2 = 21%)

*Clonogénicité : Les cellules A549 et H460 sont traitées par LBH 589 4 h après ensemencement, le milieu de culture est changé 24 h après irradiation et les cellules sont incubées durant 10 à 14 jours. Puis, les clones sont arrêtés et comptés (normalisation par rapport aux cellules non traitées). Le milieu de culture sans drogue a été utilisé comme contrôle. Les résultats représentent les moyennes +/- déviation standard de 3 expérimentations indépendantes. Les barres d'erreur représentent les déviations standards. * représente p ≤ 0.05.*

Comme les tumeurs humaines de CBNPC sont le plus souvent au moins en partie hypoxiques et que les cellules hypoxiques sont moins radiosensibles, nous avons voulu testé l'effet de la combinaison de l'abexinostat à la radiothérapie sur la survie clonogénique en condition hypoxique (O^2 = 0.1% 24 h avant le traitement comme décrit en annexe 1 dans les matériels et méthodes). Là aussi nous avons montré une inhibition de la survie clonogénique de manière dose-dépendante dans les deux lignées testées.

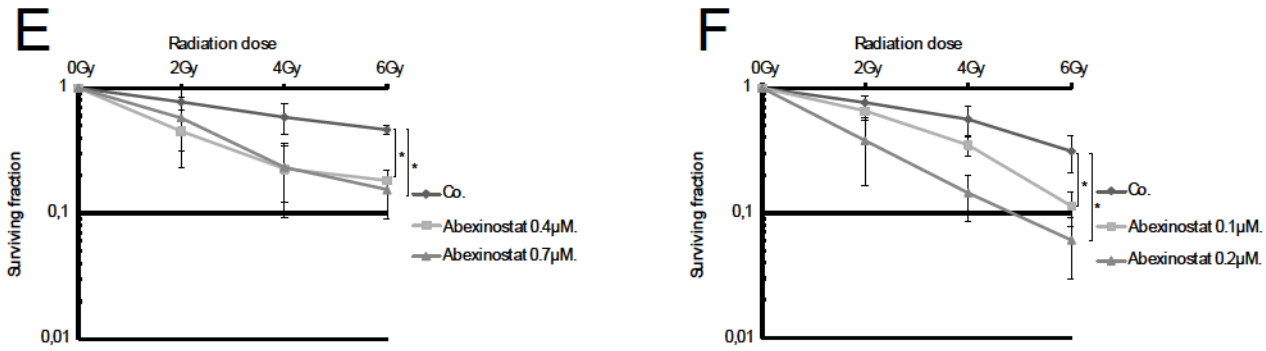


Figure 29 : L'abexinostat combiné à l'irradiation inhibe la survie clonogénique des cellules tumorales en hypoxie (O^2 = 0.1%)

Clonogénicité : Les cellules A549 (E) et H460 (F) sont placées 24h en conditions hypoxiques (O^2 = 0.1%) 4 h après ensemencement, traitées par abexinostat, le milieu de culture est changé 24 h après irradiation et les cellules sont incubées durant 10 à 14 jours. Puis, les

*clones sont arrêtés et comptés (normalisation par rapport aux cellules non traitées). Le milieu de culture sans drogue a été utilisé comme contrôle. Les résultats représentent les moyennes +/- déviation standard de 3 expérimentations indépendantes. Les barres d'erreur représentent les déviations standards. * p ≤ 0.05.*

Bien que les cellules soient moins radiosensibles en conditions hypoxiques, l'effet de la combinaison avec l'abexinostat reste significatif et dose dépendent. Le calcul des rapports α/β (correspondant à la dose en Gy pour laquelle la mortalité cellulaire est autant due à la composante linéaire qu'à la composante quadratique de l'équation linéaire quadratique qui caractérise les courbes de survie clonogénique) et des ratios de sensibilisation (sensitization enhancement ratios : SER) à 10 % de survie cellulaire (SER10 : Ratio de la dose d'irradiation permettant d'obtenir 10 % de survie cellulaire sans traitement par abexinostat et de la dose d'irradiation permettant d'obtenir 10 % de survie cellulaire avec abexinostat) confirme une radiosensibilisation par l'abexinostat en normoxie et en hypoxie.

Tableau 4 - Estimation des paramètres α et β en conditions normoxique et hypoxique pour A549 et H460

	H460 normoxia				H460 hypoxia (0.1% O_2)			
Conditions	α (Gy^{-1})	β (Gy^{-2})	Mean D_{37} (Gy)	Mean D_{10} (Gy)	α (Gy^{-1})	β (Gy^{-1})	Mean D_{37} (Gy)	Mean D_{10} (Gy)
Control	0.198 ± 0.035 (n=4)	0.043 ± 0.02 (n=5)	3.258 ± 0.14 (n=5)	5.755 ± 0.61 (n=5)	0.1695 ± 0.06 (n=3)	-	5.601 ± 1.48 (n=3)	9.596 ± 2.39 (n=3)
Abexinostat 0.1 µM	0.368 ± 0.176 (n=2)	0.022 ± 0.028 (n=2)	2.391 ± 0.538 (n=2)	4.812 ± 0.326 (n=2)	0.267 ± 0.03 (n=2)	-	3.748 ± 0.44 (n=2)	6.685 ± 0.28 (n=2)
Abexinostat 0.2 µM	0.363 ± 0.133 (n=3)	0.168 ± 0.052 (n=3)	1.832 ± 0.1 (n=3)	3.41 ± 0.42 (n=4)	0.545 ± 0.18 (n=3)	-	1.954 ± 1.06 (n=3)	4.398 ± 0.566 (n=3)

	A549 normoxia				A549 hypoxia (0.1% O_2)			
Conditions	α (Gy^{-1})	β (Gy^{-2})	Mean D_{37} (Gy)	Mean D_{10} (Gy)	α (Gy^{-1})	β (Gy^{-1})	Mean D_{37} (Gy)	Mean D_{10} (Gy)
Control	0.0754 ± 0.03 (n=4)	0.027 ± 0.01 (n=5)	5.107 ± 0.32 (n=4)	8.463 ± 0.81 (n=5)	0.101 ± 0.04 (n=2)	-	7.193 ± 0.58 (n=2)	22.36 ± 7.8 (n=2)
Abexinostat 0.4 µM	0.213 ± 0.05 (n=3)	0.042 ± 0.02 (n=3)	3.475 ± 0.37 (n=4)	6.354 ± 1.002 (n=4)	0.2604 ± 0.00 (n=1)	-	3.866 ± 0.00 (n=1)	8.842 ± 0.00 (n=1)
Abexinostat 0.7 µM	0.237 ± 0.09 (n=4)	0.018 ± 0.08 (n=3)	2.695 ± 0.23 (n=3)	5.542 ± 1.11 (n=4)	0.2562 ± 0.03 (n=2)	-	3.872 ± 0.39 (n=2)	9.07 ± 1.19 (n=2)

Estimation des D37 et D10 (doses permettant d'obtenir respectivement 37 % et 10 % de survie cellulaire clonogénique). Les résultats représentent les moyennes +/- déviation standard de 2 à 5 expérimentations indépendantes comme indiqué dans le tableau.

Pour les cellules A549 traitées par abexinostat 0.7 µM 24 h avant irradiation la moyenne des SER10 est de 1.6 [1.33-1.8] en normoxie et 2.5 [2.04-2.81] en hypoxie. Pour les cellules H460 traitées par abexinostat 0.2µM dans les mêmes conditions, la moyenne des SER10 est de 1.6 [1.44- 1.92] en normoxie et 1.8 [1.70-2.98] en hypoxie. Les D37 et D10 (doses pour lesquelles on observe une survie clonogénique de 37% et 10% respectivement) correspondantes sont indiquées dans le tableau ci-dessus. Pour les deux lignées étudiées la D10 est significativement diminuée par l'adjonction d'abexinostat en normoxie comme en hypoxie. Les courbes théoriques de survie clonogénique par extrapolation du modèle linéaire quadratique à partir des données mesurées en hypoxie et en normoxie sont représentées ci-dessous.

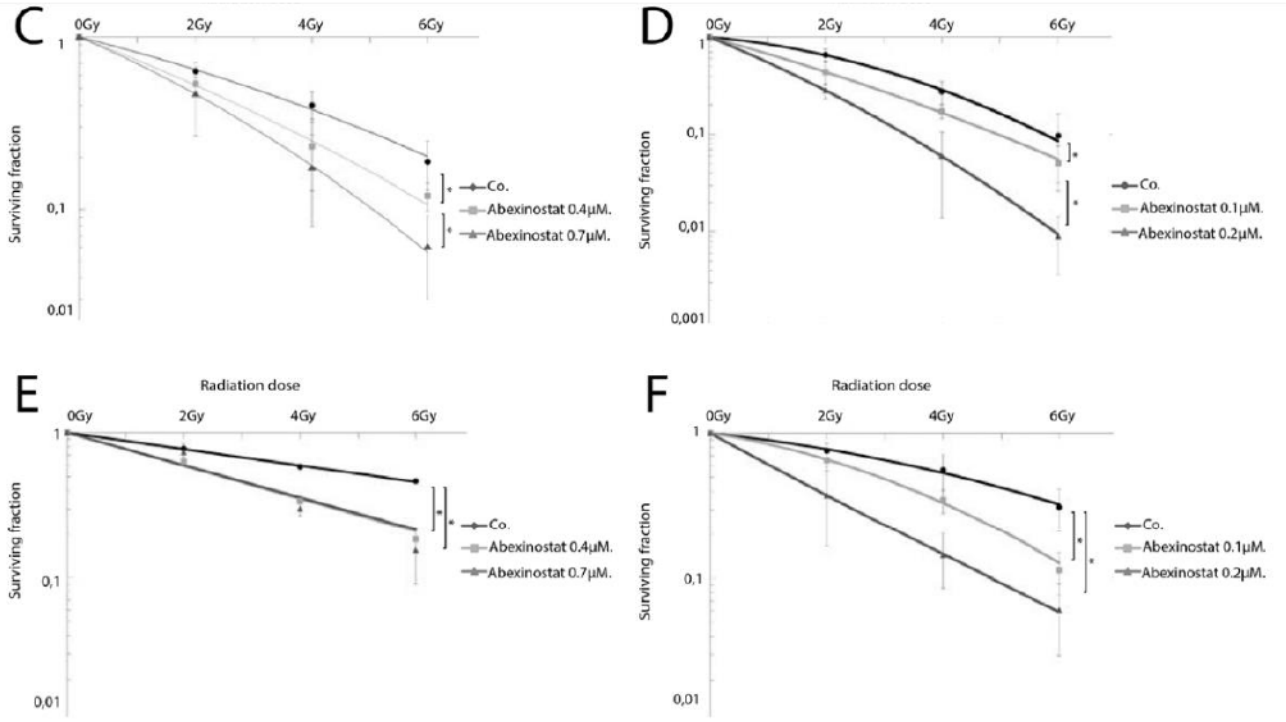


Figure 30 : modélisation linéaire quadratique des courbes de survie clonogénique en normoxie et hypoxie pour A549 et H460

Modèle linéaire quadratique théorique calculé par extrapolation des données expérimentales pour les cellules A459 (C, E) et H460 (D, F) en normoxie (O^2 = 21%) (C, D) et en hypoxie (O^2 = 0.1%) (E, F).

Après étude des isobolgrammes correspondants, un effet additif est retrouvé en normoxie et un effet supra additif est retrouvé en hypoxie pour A549 et H460.

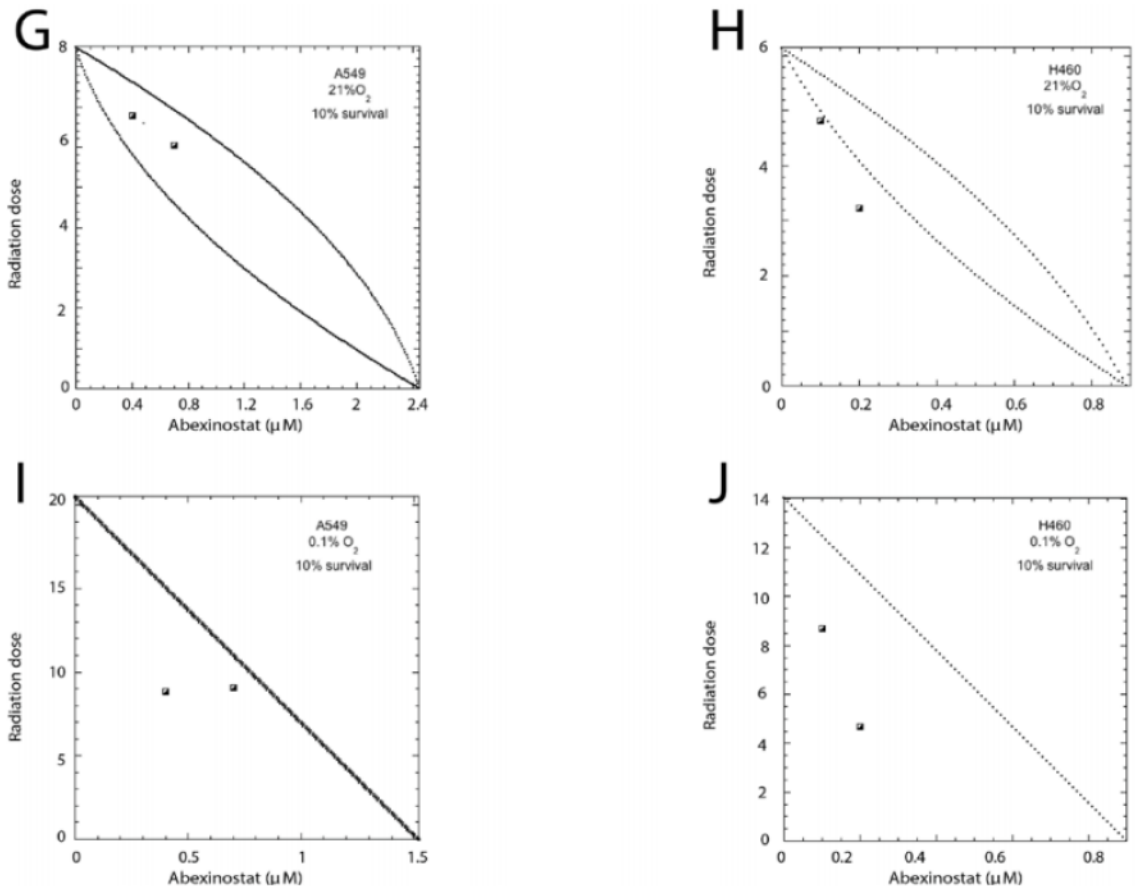


Figure 31 : Effet supra-additif de la combinaison irradiation et abexinostat sur les cellules de CBNPC *in vitro* en conditions hypoxiques

Isobologrammes pour une fraction survivante de 10% pour les cellules A549 (G, I) et H460 (H, J) en normoxie (O^2 = 21%) (G, H) et en hypoxie (O^2 = 0.1%) (I, J).

En explorant la séquence optimale de traitement en normoxie, nous avons montré que l'administration d'abexinostat en concomitant de l'irradiation sans prétraitement par abexinostat ne modifie pas significativement la fraction survivante en comparaison avec l'irradiation seule. L'abexinostat donné en concomitant n'a donc pas d'effet radio sensibilisant. L'effet radio sensibilisant de l'abexinostat dépend donc de la séquence thérapeutique.

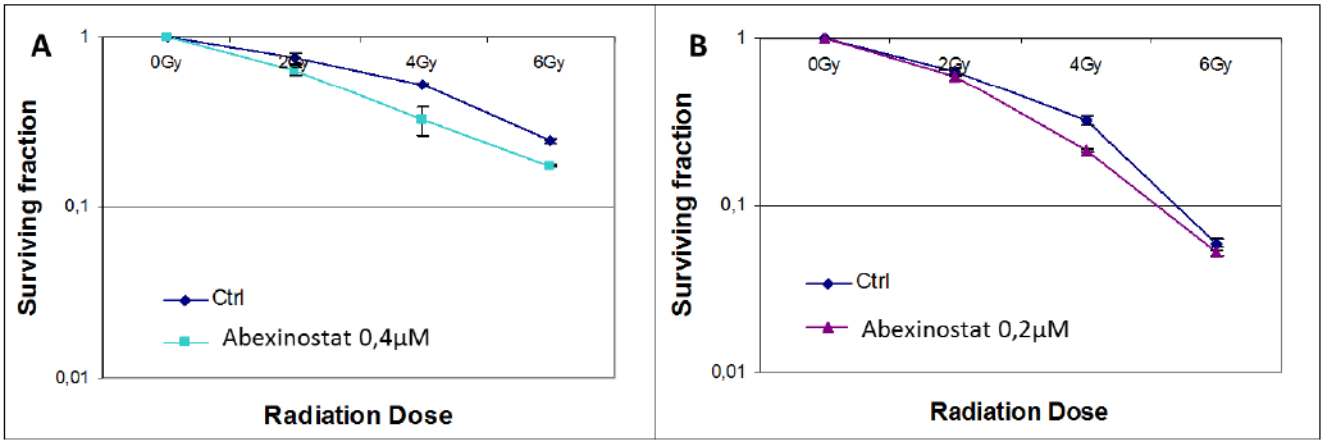


Figure 32 : L'effet radio sensibilisant de l'abexinostat combiné à l'irradiation dépend de la séquence thérapeutique : Absence d'effet radio sensibilisant de la combinaison concomitante sur les cellules tumorales en normoxie (O^2 = 21%)

Clonogénicité : Les cellules A549 (A) et H460 (B) sont traitées par 4h après ensemencement par irradiation et abexinostat aux doses indiquées, le milieu de culture est changé 24h après irradiation et les cellules sont incubées durant 10 à 14 jours. Puis, les clones sont arrêtés et comptés (normalisation par rapport aux cellules non traitées). Le milieu de culture sans drogue a été utilisé comme contrôle. Les résultats représentent les moyennes +/- déviation standard de 3 expérimentations indépendantes. Les barres d'erreur représentent les déviations standards. Il n'est pas retrouvé de différence statistiquement significative entre les différentes courbes.

L'augmentation du niveau d'expression de l'histone H3 acétylé est utilisée dans la littérature comme marqueur fonctionnel reflétant l'activité inhibitrice des HDAC (393). Pour confirmer l'activité HDAC inhibitrice de l'abexinostat aux doses utilisées et dans nos conditions expérimentales, nous avons mesuré l'expression de l'histone H3 acétylé sur les cellules A549 et H460 en normoxie (O^2 21%). Les cellules ont été traitées aux doses croissantes d'abexinostat indiquées sur la figure 33 pendant 24 h puis irradiées à 4 Gy. Les niveaux d'expression de l'histone H3 acétylé ont été mesurés par western blot (comme indiqué en annexe 1 dans les matériels et méthodes), 1 h et 24 h après irradiation. Nous avons ainsi observé une augmentation de l'acétylation de l'histone H3 sous l'effet de l'abexinostat de manière concentration dépendante et temps dépendante dans les deux lignées cellulaires étudiées. Une augmentation significative de l'acétylation de l'histone H3 a été observée dès 1 h après l'heure d'irradiation et cette augmentation persiste après 24 h.

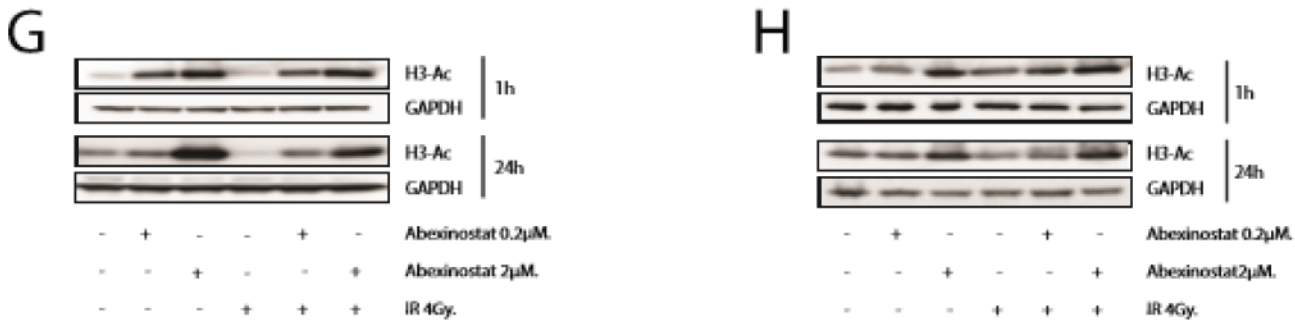


Figure 33 : Activité HDAC inhibitrice de l'abexinostat en normoxie: augmentation du niveau de l'histone H3 acétylé

Evaluation de l'acétylation des histones H3 par western blot 1h et 24h après irradiation sur cellules A549 (G) et H460 (H). GADPDH est utilisé comme contrôle de dépôt. IR = irradiation. Les Western blots présentés dans cette figure sont représentatifs des 3 expérimentations indépendantes effectuées (n = 3).

Afin de confirmer nos conditions expérimentales nous avons évalué par Western blot l'expression de HIF1-alpha, protéine dont l'expression est induite en conditions hypoxiques. Nous avons montré une augmentation du niveau d'expression d'HIF1-alpha dans nos conditions expérimentales d'hypoxie (O^2 = 0.1%) dans les deux lignées étudiées dès 4 h d'hypoxie et de manière persistante après 24 h d'hypoxie.

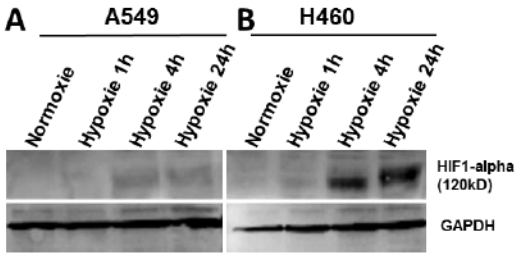


Figure 34 : L'augmentation d'expression d'HIF1-alpha confirme la validité de nos conditions expérimentales hypoxiques

Evaluation de l'expression d'HIF1-alpha par western blot 1h, 4h et 24h après incubation en hypoxie (O^2= 0.1%) sur cellules A549 (A) et H460 (B). GADPDH est utilisé comme contrôle de dépôt. Les Western blots présentés dans cette figure sont représentatifs des 3 expérimentations indépendantes effectuées (n = 3).

Pour confirmer l'activité HDAC inhibitrice de l'abexinostat en conditions hypoxiques, nous avons également évalué le niveau d'expression des histones H3 acétylés sur nos deux lignées en conditions hypoxiques (O^2 = 0.1%) par western blot (comme indiqué en annexe 1 dans les matériels et méthodes), à 1 h, 4 h, 6 h et 24 h d'exposition à l'abexinostat 0.2 µM. Nous avons ainsi observé une augmentation de l'acétylation de l'histone H3 sous l'effet de l'abexinostat dans

les deux lignées cellulaires étudiées. Une augmentation significative de l'acétylation de l'histone H3 a été observée dès 1 h après l'exposition à l'abexinostat et cette augmentation persiste à 24 h d'exposition.

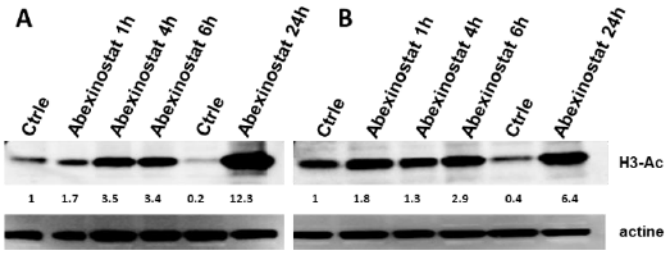


Figure 35 : Activité HDAC inhibitrice de l'abexinostat en hypoxie: augmentation du niveau de l'histone H3 acétylé

Evaluation de l'acétylation des histones H3 par western blot à 1 h, 4 h, 6 h et 24 h d'exposition à l'abexinostat sur cellules A549 (A) et H460 (B). L'actine est utilisée comme contrôle de dépôt. Les Western blots présentés dans cette figure sont représentatifs des 3 expérimentations indépendantes effectuées (n = 3).

3.1.2.2 L'Abexinostat induit l'apoptose des cellules de CBNPC *in vitro* en normoxie et majore l'apoptose radio-induite

Après traitement de cellules H460 par abexinostat seul ou en combinaison avec l'irradiation à 4 Gy nous avons montré une augmentation de la fraction cellulaire en sub-G1 (correspondant aux cellules mortes possiblement apoptotiques) dépendante de la concentration d'abexinostat et du temps. En effet, après 24h de traitement par abexinostat aux concentrations indiquées dans la Figure 36, les cellules H460 ont été irradiées à la dose de 4 Gy en normoxie et une analyse de la distribution des cellules dans le cycle cellulaire a été réalisée par cytométrie de flux (FACS) 1 h, 24 h et 48 h après l'heure d'irradiation. Nous avons observé une augmentation de la population cellulaire en phase sub-G1 après exposition à l'abexinostat dès 0.2 µM et dès 24 h après l'heure de l'irradiation (Figure 36 B). Cette augmentation est plus marquée pour une concentration plus forte d'abexinostat (2µM) et un temps plus long (48 h) (Figure 36 A et B). De même, une déplétion de la population de cellules H460 en phase S a été retrouvée après exposition à l'abexinostat 2 µM (Figure 36 B). En combinant l'abexinostat 0.2 µM et l'irradiation 4 Gy (délivrée après 24 h d'exposition à la drogue) on observe une majoration significative de l'effet lié à la drogue seule ou à l'irradiation seule (Figure 36 B). En revanche, nous n'avons pas observé d'augmentation de la population en subG1 lorsque l'abexinostat était donné de manière concomitante à l'irradiation et non pas pendant 24 h avant l'irradiation.

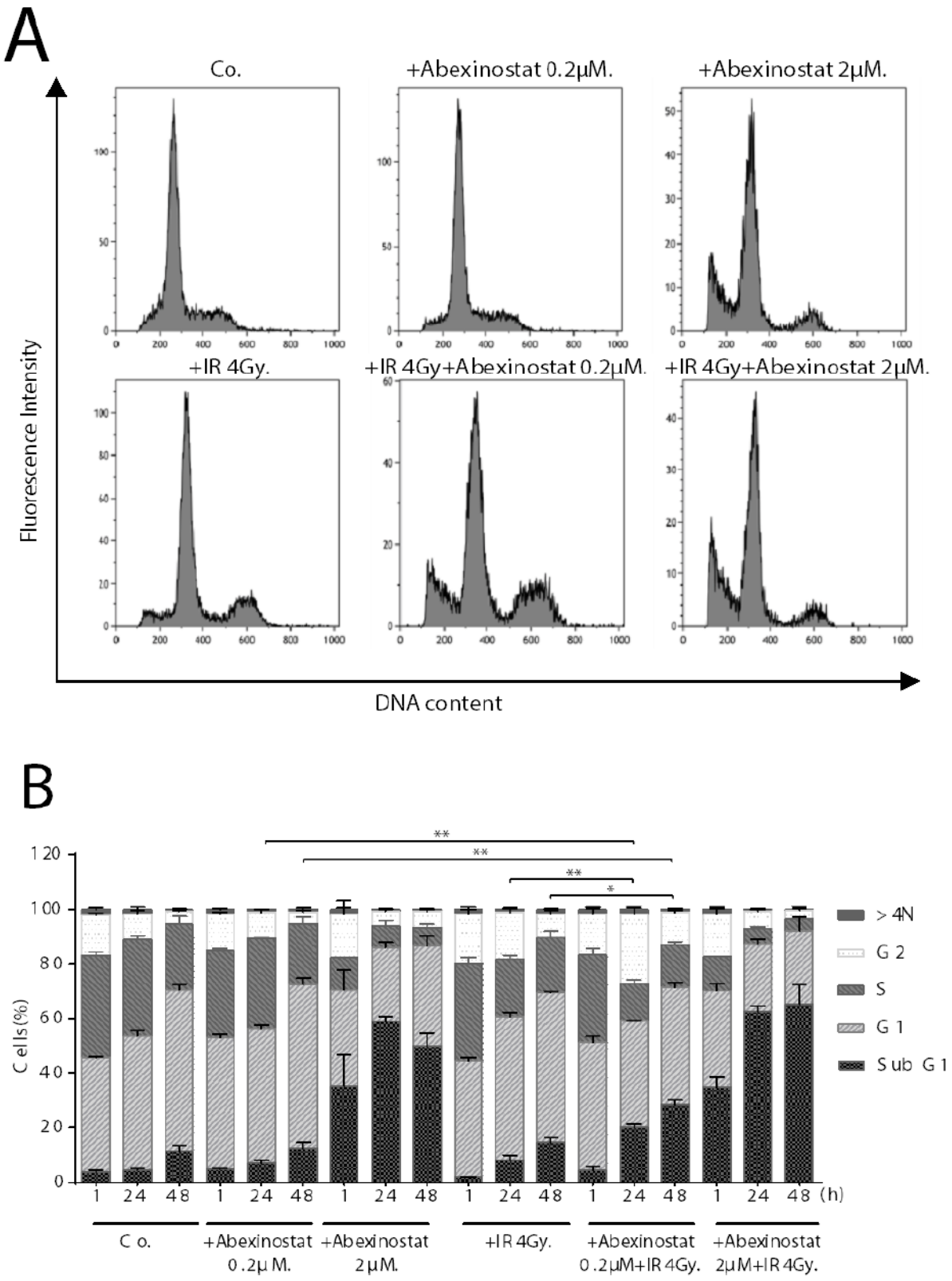
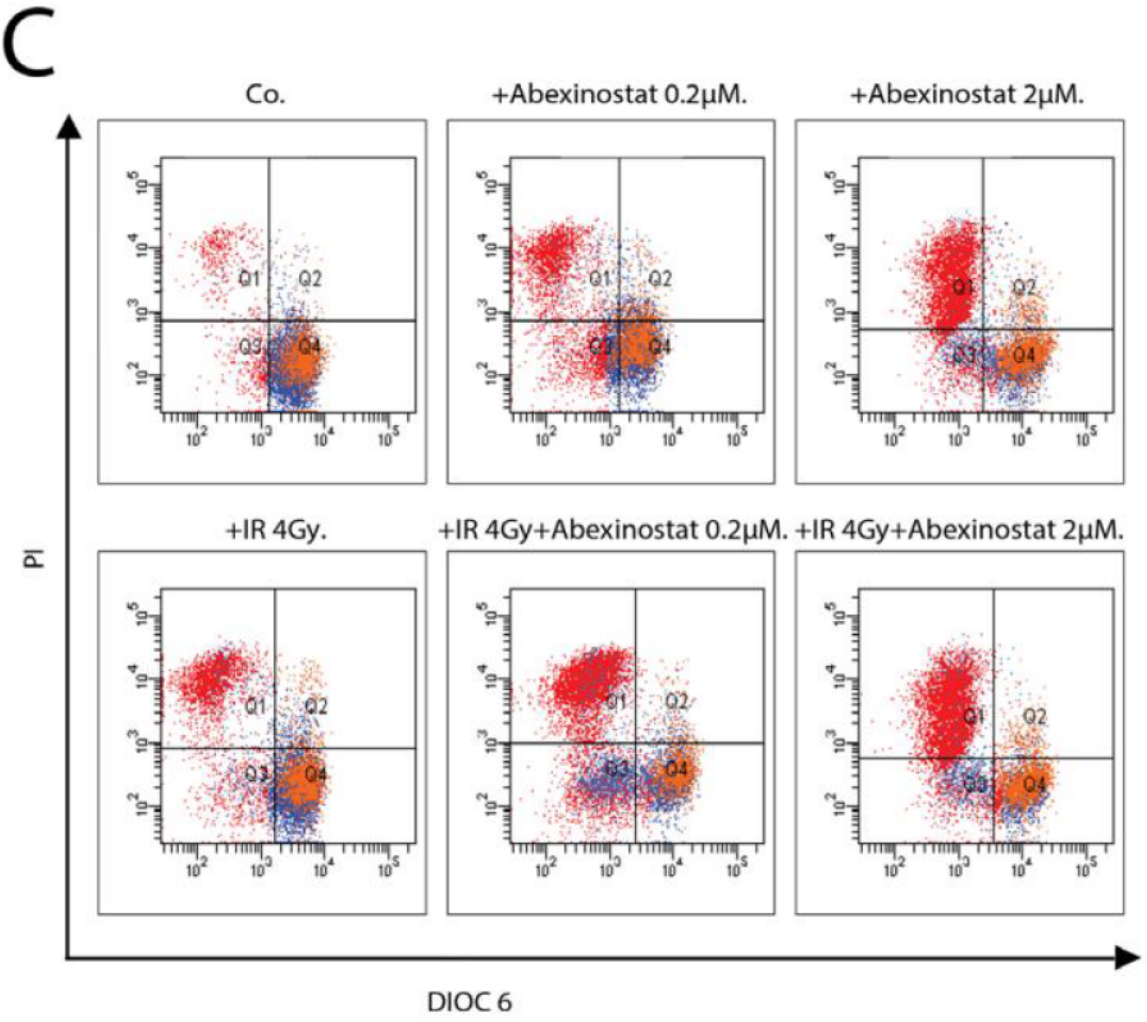


Figure 36 : L'abexinostat induit une augmentation concentration dépendante de la population de H460 en subG1

Les cellules H460 ont été traitées 24 h aux concentrations indiquées d'abexinostat puis irradiées (4 Gy) ou non. La distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire

*a été analysée par cytométrie de flux 1 h (B), 24 h (B) et 48 h (A, B) après irradiation. L'analyse en cytométrie de flux (A) représente le résultat d'une des 3 expérimentations indépendantes réalisées. Les histogrammes (B) représentent les moyennes +/- déviations standards (n = 3; t-test; *P < 0.05; **P < 0.01). Les barres d'erreur représentent les déviations standards.*

Afin de déterminer si l'augmentation de la fraction cellulaire en subG1 correspond à une augmentation de la population en apoptose, nous avons réalisé un marquage à l'iodure de propidium (PI), qui est un agent intercalant des acides nucléiques (l'ADN ou l'ARN) et une molécule fluorescente, utilisé comme marqueur de l'ADN afin de marquer le noyau des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire lors de l'apoptose tardive et de la mort cellulaire. Nous avons également utilisé un marquage au 3.3' dihexyloxacarbocyanine iodide (DIOC6), qui marque les mitochondries et dont la diminution témoigne de la réduction du potentiel transmembranaire mitochondrial au cours de l'apoptose.



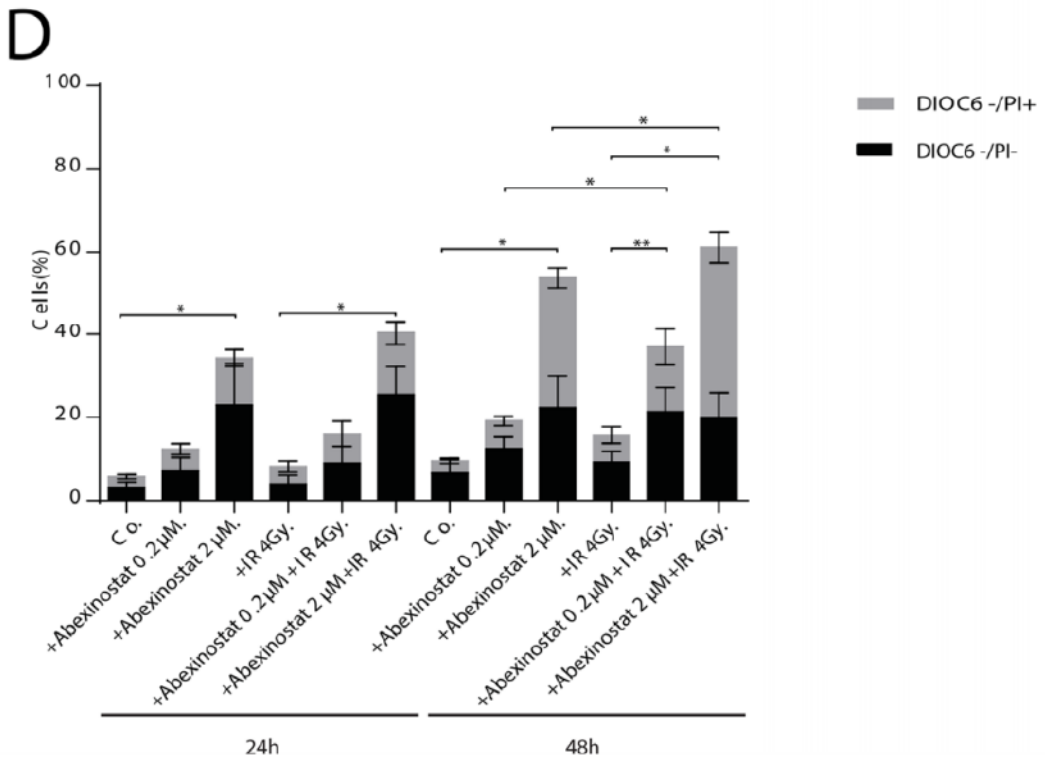


Figure 37 : L'abexinostat induit une augmentation concentration dépendante de l'apoptose des cellules H460

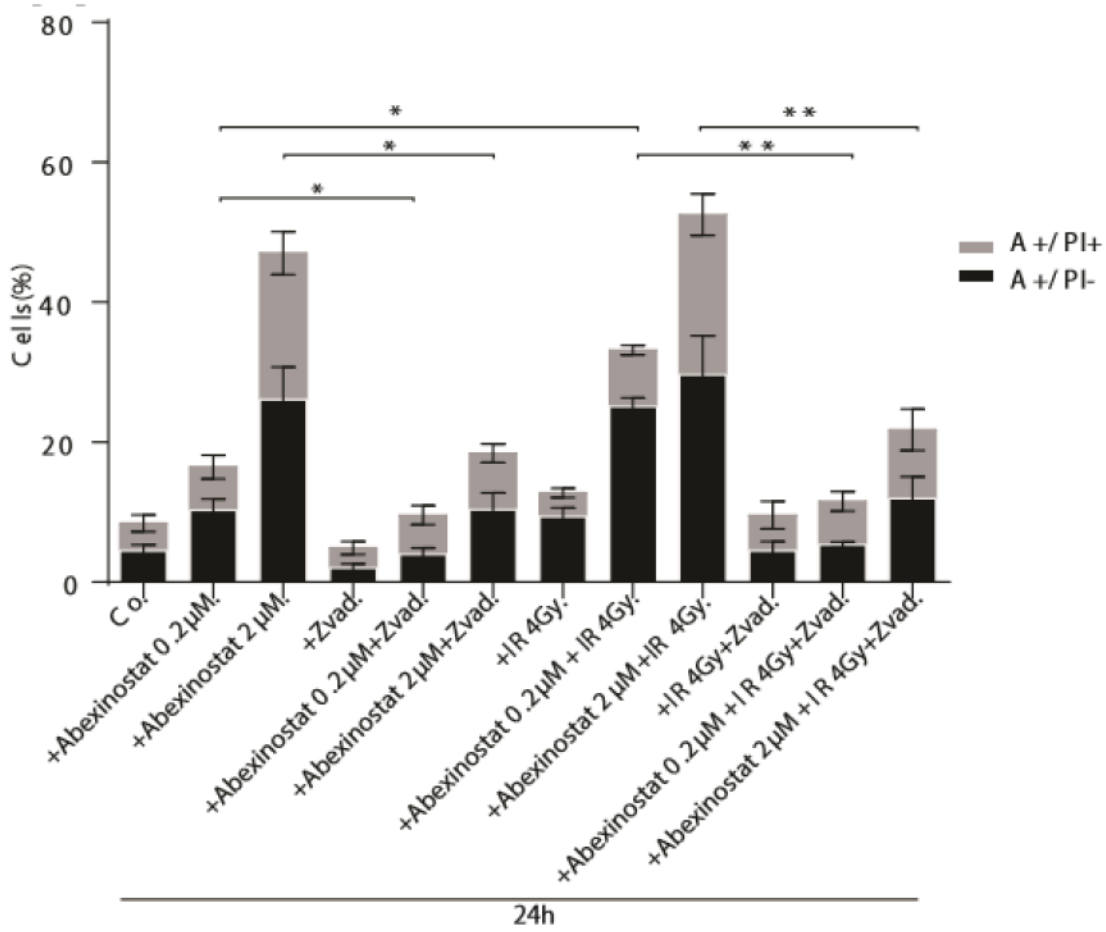
*Les cellules H460 ont été traitées 24 h aux concentrations indiquées d'abexinostat puis irradiées (4 Gy) ou non. La distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a été analysée par cytométrie de flux 24 h (C, D) et 48 h (C) après irradiation. L'analyse en cytométrie de flux (C) représente le résultat d'une des 3 expérimentations indépendantes réalisées. Les histogrammes (D) représentent les moyennes +/- déviations standards (n = 3; t-test; *P < 0.05; **P < 0.01). Les barres d'erreur représentent les déviations standards. La population DIOC-/PI+ correspond aux cellules mortes en apoptose tardive. La population DIOC-/PI- correspond aux cellules en apoptose précoce (dépolarisation de la membrane mitochondriale mais membrane plasmique sans perte d'intégrité)*

L'Abexinostat augmente de manière significative la mortalité cellulaire comparativement aux contrôles seuls ainsi qu'aux contrôles irradiés comme en témoigne l'augmentation de la population de cellules H460 DIOC6-/PI+ (Figure 37 C, D). De plus, l'abexinostat augmente également la population de cellule H460 DIOC6-/PI- 48h après irradiation ce qui suggère une augmentation de la population en apoptose précoce présentant une dépolarisation de leur membrane mitochondriale (Figure 37 C, D).

3.1.2.3 L'apoptose des cellules H460 induite par l'abexinostat est caspase dépendante et implique la voie mitochondriale

Afin de préciser si l'apoptose induite par l'abexinostat est caspase dépendante, nous avons utilisé un marquage au PI et à l'annexine V (protéine avec une forte affinité pour les phosphatidylsérines qui sont exposées à la face extracellulaire de la membrane plasmique dès le début de l'apoptose, cette protéine est donc utilisée comme marqueur d'apoptose) avec ou sans Z-vad (un inhibiteur des caspases et donc de l'apoptose caspase dépendante). Les cellules H460 ont été traitées pendant 24 h par abexinostat aux concentrations indiquées sur la Figure 38 puis irradiées (4 Gy) ou non. L'analyse en cytométrie de flux a été réalisée 24 h et 48 h après irradiation (Figure 38 A, B)

A



B

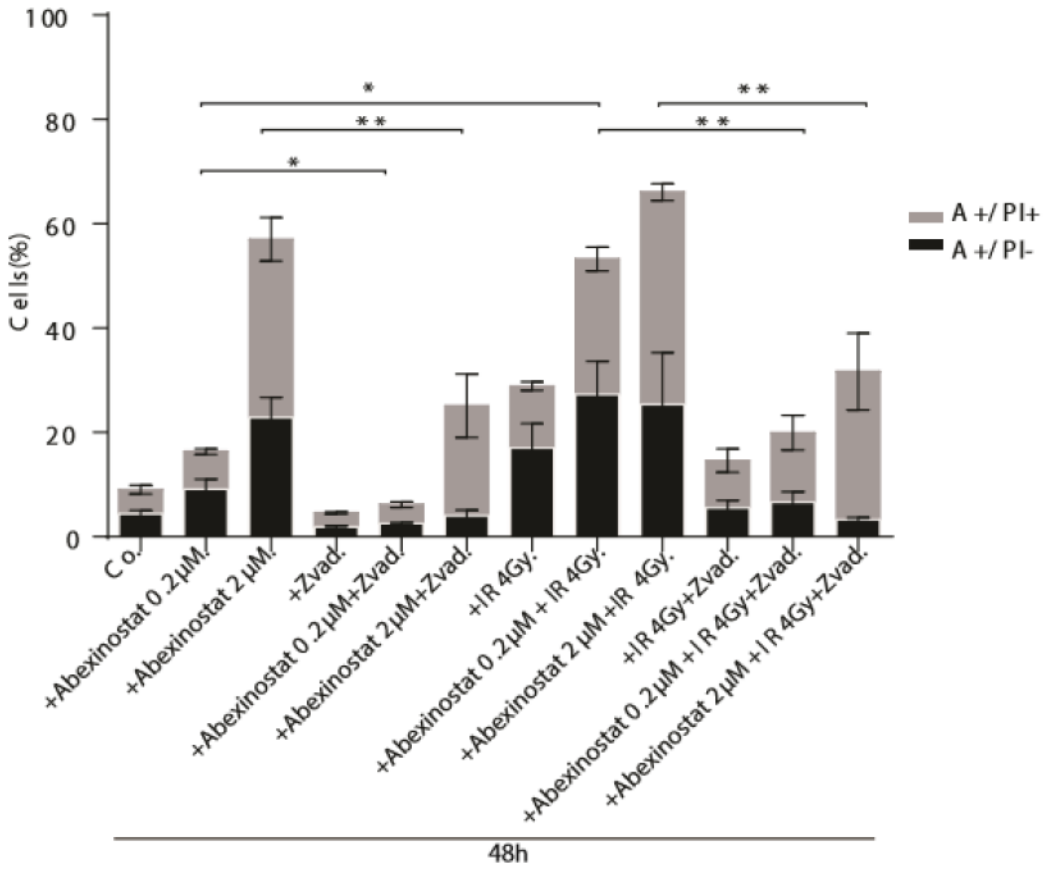


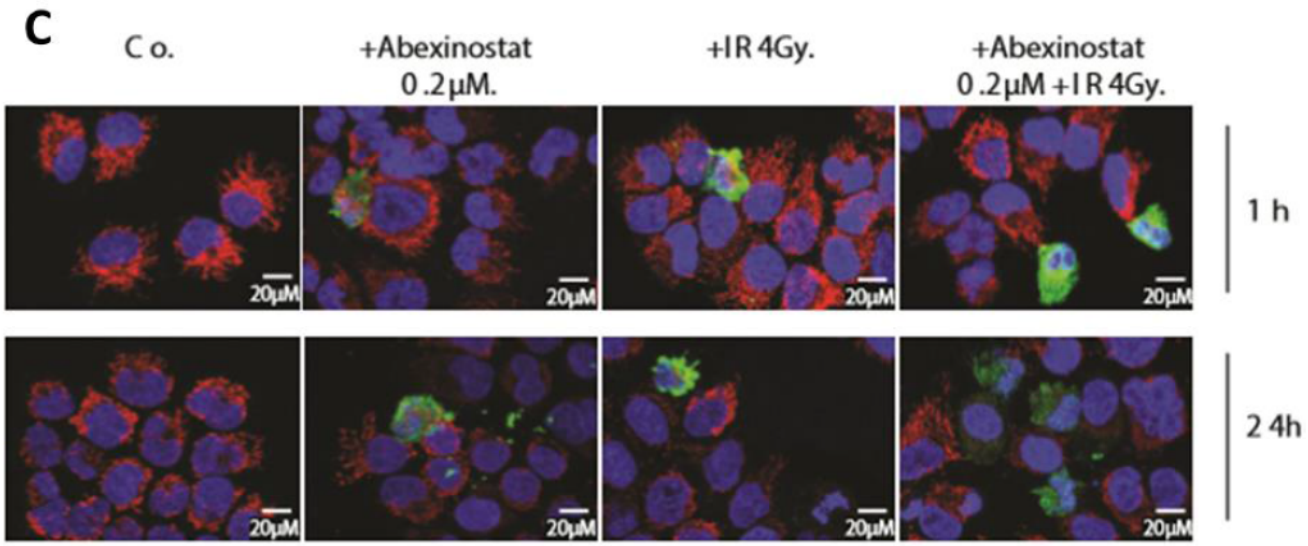
Figure 38 : L'apoptose induite par l'abexinostat est caspase dépendante

*Les cellules H460 ont été traitées 24 h (A) ou 48h (B) aux concentrations indiquées d'abexinostat puis irradiées (4 Gy) ou non. Les histogrammes (A, B) représentent les moyennes +/- déviations standards (n = 3; t-test; *P < 0.05; **P < 0.01). Les barres d'erreur représentent les déviations standards. A+ = cellules avec marquage positif (+) ou non (-) à l'annexine V. PI+/- = cellules avec marquage positif (+) ou non (-) au PI. La population annexine V+/PI- correspond aux cellules en apoptose précoce. La population annexine V+/PI+ correspond aux cellules mortes par apoptose.*

Le Z-vad diminue significativement la population de cellules annexine V+/PI- (correspondant aux cellules en apoptose précoce) traitées par abexinostat à 0.2 µM et 2 µM comparativement aux cellules contrôles dans du milieu de culture sans abexinostat à 24 et 48 h (Figure 38 A, B). Nous avons également montré que l'apoptose caspase dépendante est significativement augmentée par la combinaison abexinostat et irradiation par rapport à l'irradiation seule (Figure 38 A, B). Les cellules traitées par abexinostat à 0.2 µM présentent une mortalité cellulaire modérément augmentée alors que les cellules traitées par la combinaison abexinostat à 0.2 µM et irradiation présentent une augmentation significative de l'apoptose caspase dépendante à 24 h et 48 h (Figure 38 A, B). En revanche, l'exposition à de plus fortes concentrations

d'abexinostat (2 µM) seul est associée à une plus forte mortalité cellulaire (population annexine V+/PI+). A cette dose (2 µM), la combinaison abexinostat et radiothérapie n'a pas montré de majoration significative de l'apoptose caspase dépendante par rapport au traitement par abexinostat (2 µM) seul possiblement du fait de la forte cytotoxicité de l'abexinostat seul à cette concentration. En effet, on observe un taux moyen de mortalité cellulaire de 20.9 % et 34.2 % à 24 h et 48 h respectivement sous abexinostat 2 µM (Figure 38 A, B).

Pour valider ces résultats nous avons évalué l'activation de la caspase 3 en analysant le clivage de la caspase 3 et le relargage du cytochrome C dans les cellules H460 par immun marquage (comme indiqué en annexe 1 dans les matériels et méthodes). Nous avons montré que l'abexinostat à 0.2 µM augmente significativement le taux basal et post irradiation de caspase 3 clivée et de cytochrome C relargué 1 h et 24 h après irradiation (Figure 39 C-E).



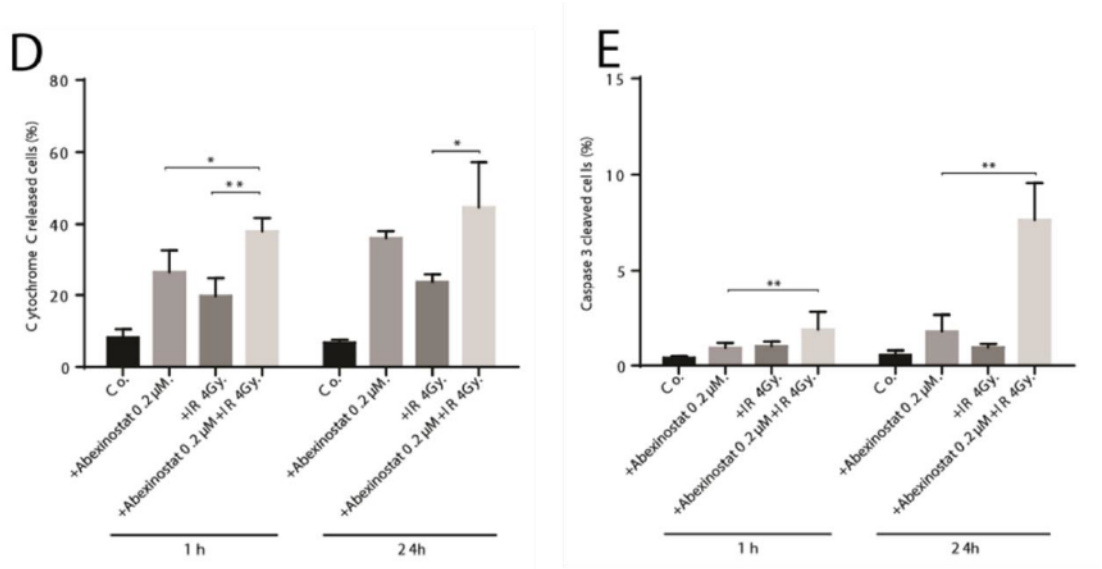


Figure 39 : L'apoptose induite par l'abexinostat est médiée par la dépolarisation mitochondriale et l'activation de la caspase 3

*Les cellules H460 ont été traitées aux concentrations indiquées d'abexinostat (0.2 ou 2 µM), le milieu de culture sans abexinostat servant de contrôle, pendant 24 h avant irradiation (0 ou 4 Gy). La caspase 3 clivée (utilisée comme marqueur d'apoptose) (C, E) et le relargage du cytochrome C (utilisé comme marqueur de la dépolarisation mitochondriale) (C, D) ont été évalué 1 h et 24 h après irradiation par immun marquage. Les cellules caspase 3 clivée positive (en vert) et les cellules présentant un relargage du cytochrome C (en rouge) ont été comptées au microscope avec 300 cellules comptées par condition expérimentale (D, E). Les histogrammes représentent les moyennes +/- déviations standards (n = 3; t-test; *P < 0.05; **P < 0.01). Les barres d'erreur représentent les déviations standards.*

Ces données sont confirmées par une augmentation du niveau d'expression de la caspase 3 clivée après exposition à l'abexinostat 2 µM seul ou en combinaison avec l'irradiation comme le montre le Western blot suivant 24 h après irradiation (Figure 40).

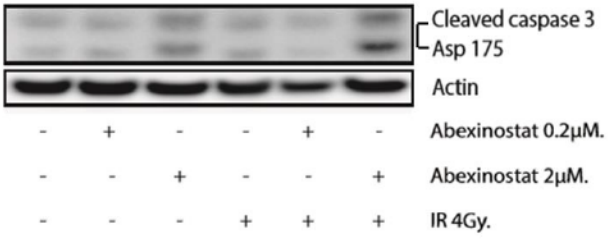


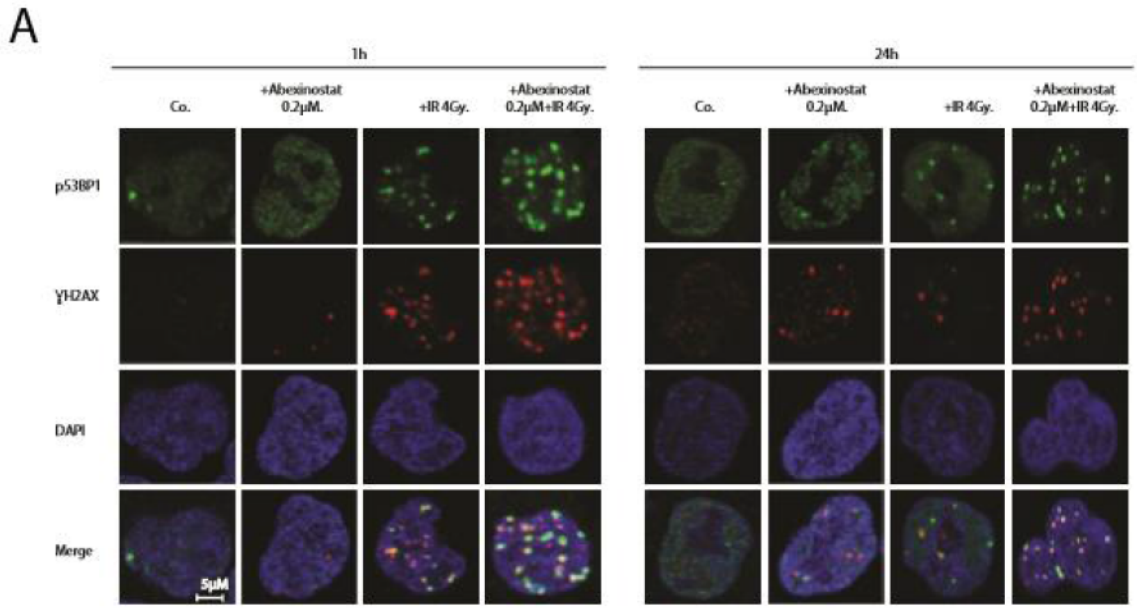
Figure 40 : L'abexinostat augmente le niveau d'expression de la caspase 3 clivée

Evaluation par Western blot du niveau d'expression de la caspase 3 activée dans les cellules H460 24h après irradiation. Les cellules ont été traitées par abexinostat 2 µM pendant 24 h puis irradiées (0 ou 4 Gy). L'activation de la caspase 3 résulte de son clivage adjacent à une

asparagine 175 (cleaved caspase 3 Asp 175). L'actine est utilisée comme contrôle de dépôt. Les Western blots présentés dans cette figure sont représentatifs des 3 expérimentations indépendantes effectuées (n = 3).

3.1.2.4 L'abexinostat augmente le nombre et la persistance des cassures double brin de l'ADN (CDB) induites par l'irradiation dans les cellules H460

Nous avons évalué les foci ɣH2AX and p53BP1 par immunofluorescence comme marqueurs des CDB de l'ADN (Figure 41 A, B).



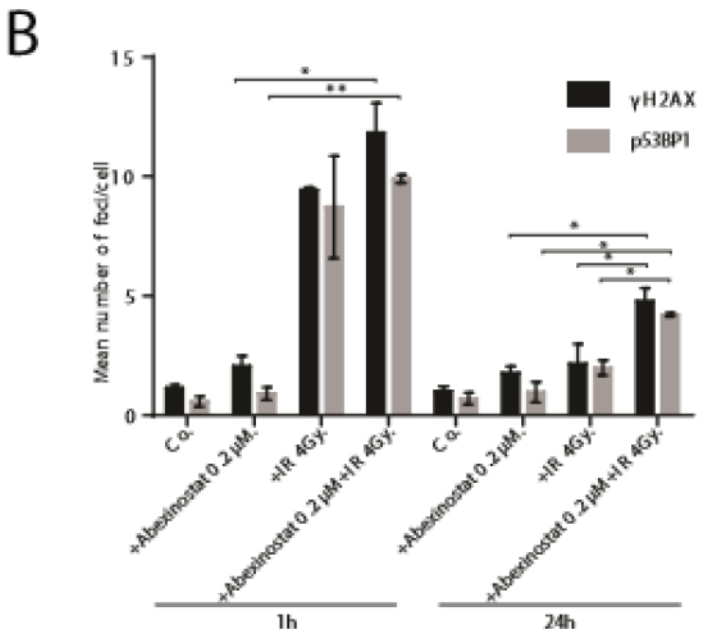


Figure 41 : L'abexinostat majore les CDB radio-induites de manière prolongée

*Les cellules H460 ont été traitées par abexinostat 0.2 µM pendant 24 h puis irradiées (0 ou 4 Gy). Les foci ɣH2AX and p53BP1 ont été évalué par immunofluorescence 1 h et 24 h après irradiation. Sur les images en microscopie à fluorescence ci-dessus les foci ɣH2AX sont marqués en rouge, les foci p53BP1 en vert et les noyaux sont marqués au DAPI en bleu. Les foci de 300 cellules par condition ont été comptés sur chacune des 3 expérimentations indépendantes réalisées. Les histogrammes représentent les moyennes du nombre de foci par cellule +/- déviations standards (n = 3; t-test; *P < 0.05; **P < 0.01). Les barres d'erreur représentent les déviations standards.*

Nous avons observé, 1 h après irradiation seule, une augmentation des foci ɣH2AX et p53BP1 dont le taux revient au niveau basal après 24 h ce qui correspond à une réparation des CDB à 24 h comme attendu (Figure 41 A, B). Nous avons montré que le prétraitement par abexinostat avant irradiation augmente le nombre de foci ɣH2AX et p53BP1 après irradiation dans les cellules H460 (Figure 41 A, B). Nos résultats indiquent que les CDB de l'ADN persistent de manière plus prolongée après la combinaison abexinostat et irradiation qu'après irradiation seule (Figure 41 A, B). En effet, lors du traitement par la combinaison abexinostat et irradiation, 24 h après irradiation, il persiste un taux élevé de foci ce qui suggère une altération des capacités de réparation de l'ADN sous l'effet de la combinaison avec l'abexinostat (Figure 41 A, B).

L'augmentation du niveau d'expression de phospho-H2AX induite par l'abexinostat à 2 µM dans les cellules H460 24 h après irradiation que nous avons montrée par Western blot est également en faveur d'une induction par l'abexinostat de dommages persistants à type de CDB. En effet, nous avons observé une augmentation de l'expression de phospho-H2AX 1h après

irradiation (0 ou 4 Gy) dans les cellules H460 traitées par abexinostat 2 µM seul ou en combinaison avec l'irradiation mais cette augmentation est plus marquée 24 h après irradiation. Ceci corrobore la persistance prolongée de CDB sous l'effet de la combinaison abexinostat et radiothérapie et ceci de manière plus marquée qu'avec l'abexinostat seul (Figure 42). De plus, 24 h après irradiation la combinaison abexinostat 0.2 µM et irradiation entraîne une augmentation du niveau d'expression de phospho-H2AX ce qui n'est pas le cas pour l'abexinostat 0.2 µM seul.

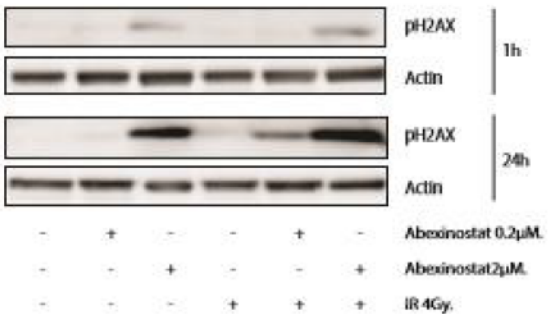


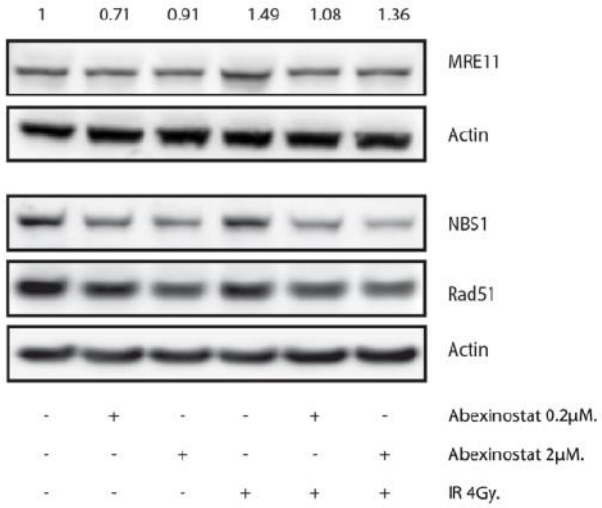
Figure 42 : L'abexinostat augmente l'expression de phospho-H2AX de manière prolongée

Evaluation par Western blot du niveau d'expression de phospho-H2AX (pH2AX) dans les cellules H460 1 h et 24 h après irradiation. Les cellules ont été traitées par abexinostat 0.2 µM ou 2 µM pendant 24 h puis irradiées (0 ou 4 Gy). L'actine (actin) est utilisée comme contrôle de dépôt. Les Western blots présentés dans cette figure sont représentatifs des 3 expérimentations indépendantes effectuées (n = 3).

3.1.2.5 L'abexinostat diminue la signalisation et la réparation des dommages de l'ADN induits par l'irradiation dans les cellules H460

Puisque les dommages persistants de l'ADN peuvent être dus à un défaut de réparation de l'ADN, nous avons fait l'hypothèse que l'abexinostat peut altérer les mécanismes de réparation de l'ADN. Pour tester cette hypothèse, nous avons évalué l'expression de protéines du complexe MRE11/Rad50/NBS1 (MRN), qui initie les principaux mécanismes de réparation des CDB de l'ADN, comme nous l'avons vu en introduction. Nous avons évalué le niveau d'expression des protéines MRE11 et NBS1 par Western blot et nous avons montré une diminution dose dépendante de l'expression de ces deux protéines modérée 1 h après irradiation et plus marquée 24 h après irradiation (Figure 43 A, B).

A



B

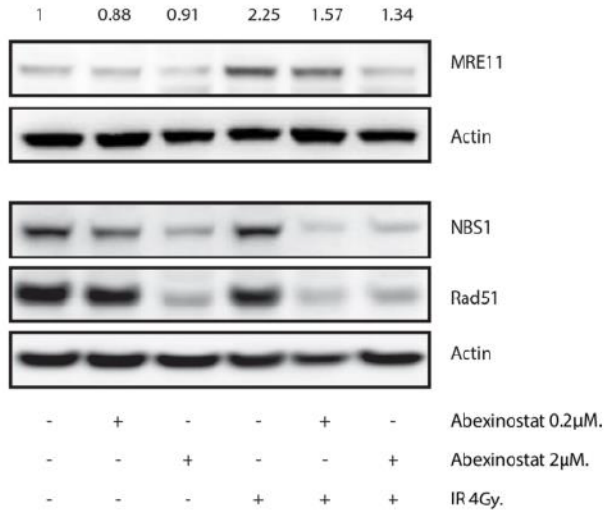
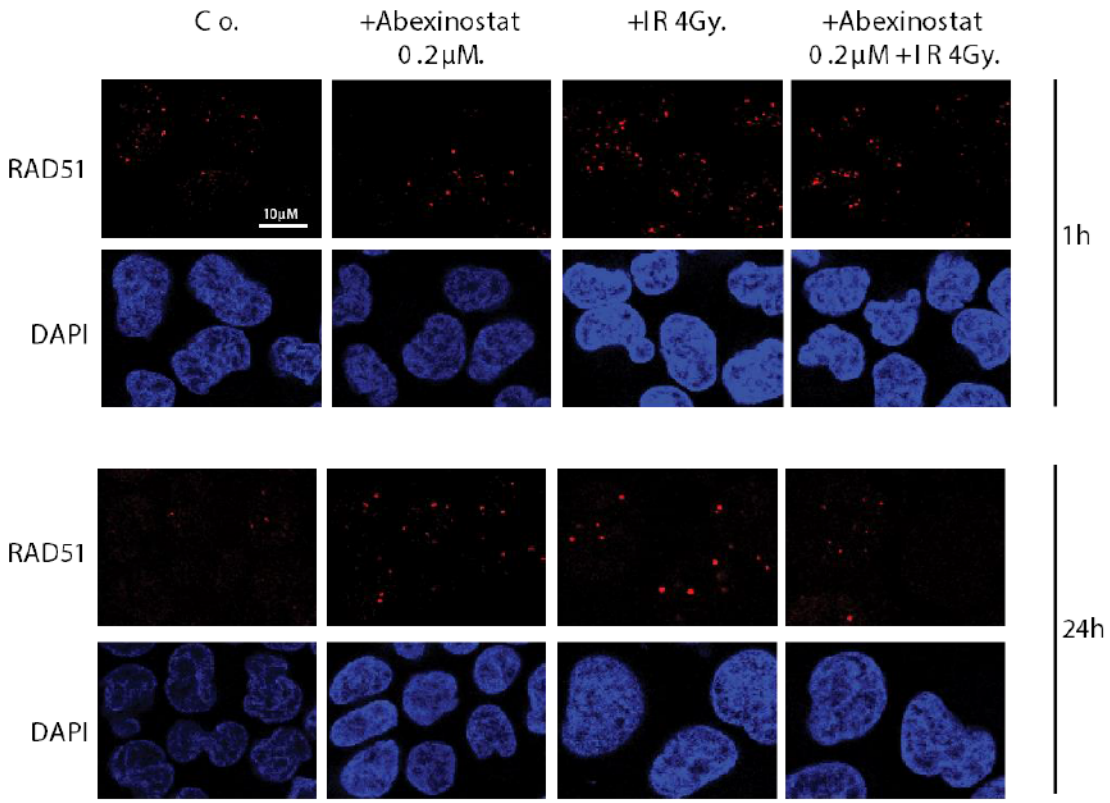


Figure 43 : L'abexinostat diminue l'expression de MRE11, NBS1 et Rad51 de manière temps et dose dépendante

Evaluation par Western blot du niveau d'expression de MRE11, NBS1 et Rad51 dans les cellules H460 1 h (A) et 24 h (B) après irradiation. Les cellules ont été traitées par abexinostat 0.2 µM ou 2 µM pendant 24 h puis irradiées (0 ou 4 Gy). L'actine (actin) est utilisée comme contrôle de dépôt. Les Western blots présentés dans cette figure sont représentatifs des 3 expérimentations indépendantes effectuées (n = 3).

On observe 24 h après irradiation (Figure 43 B), une nette diminution des protéines MRE11 et NBS1 lorsque l'on combine l'abexinostat et l'irradiation par rapport à l'abexinostat seul y compris pour une concentration de 0.2 µM. Ceci suggère une altération des capacités d'initiation du processus de réparation des cassures double-brin par HR et/ou NHEJ qui sont les 2 voies principales de réparation de cassures double-brin survenant après irradiation. Puisque Rad51 est l'une des protéines clé de la réparation de l'ADN par HR nous avons décidé d'étudier son implication dans la persistance des dommages observés dans nos travaux. Les cellules H460 ont été traitées aux concentrations croissantes d'abexinostat indiquées sur la Figure 43 24 h avant irradiation (0 ou 4 Gy). Nous avons montré par Western blot que le niveau d'expression de Rad51 une heure après irradiation est modérément diminué dans les cellules traitées par abexinostat seul (Figure 43 A). Lorsque l'on combine l'abexinostat à l'irradiation à 4 Gy des résultats similaires sont observés (Figure 43 A). Cependant, cette diminution est plus marquée 24 heures après irradiation pour les cellules traitées par abexinostat et irradiation (Figure 43 B). La diminution du niveau d'expression de Rad51 est à la fois temps dépendante et dose dépendante. L'exposition à l'abexinostat 0.2 µM combinée à l'irradiation potentialise la diminution d'expression de Rad51 en comparaison avec le traitement par abexinostat seul à la même dose (Figure 43 B). Ces résultats sont corroborés par l'étude en immunohistochimie que nous avons réalisée en marquant les foci Rad51.



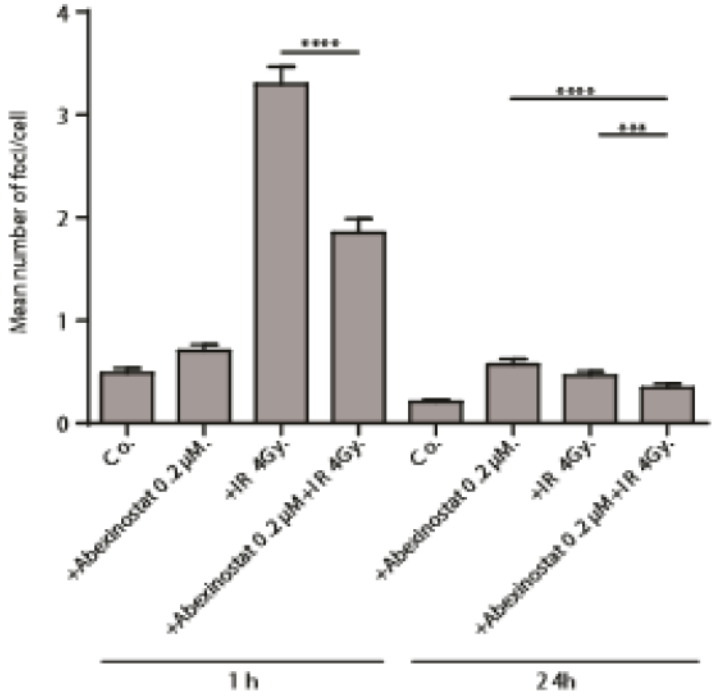


Figure 44 : L'abexinostat réduit le nombre de foci Rad51radio-induits

*Les cellules H460 ont été traitées par abexinostat 0.2 µM pendant 24 h puis irradiées (0 ou 4 Gy). Les foci Rad51 ont été évalué par immunofluorescence 1 h et 24 h après irradiation. Sur les images en microscopie à fluorescence ci-dessus les foci Rad51 sont marqués en rouge et les noyaux sont marqués au DAPI, en bleu. Les foci de 300 cellules par condition ont été comptés sur chacune des 3 expérimentations indépendantes réalisées. Les histogrammes représentent les moyennes du nombre de foci par cellule +/- déviations standards (n = 3; t-test; ***P < 0.005; ****P < 0.001). Les barres d'erreur représentent les déviations standards.*

Comme attendu, après irradiation seule, nous avons observé une augmentation des foci Rad51 une heure après irradiation à 4 Gy. Le taux de ces foci après irradiation seule revient au niveau du taux contrôle (cellules non traitées, non irradiées) 24 h après irradiation. De plus, pour les cellules traitées par abexinostat et irradiation, la diminution du nombre de foci Rad51 par rapport à l'irradiation seule persiste à 24 h (Figure 44).

3.1.2.6 L'abexinostat potentialise le retard de croissance tumorale en combinaison avec différentes modalités thérapeutiques avec une toxicité acceptable in vivo dans des modèles de CBNPC

Nous avons ensuite évalué l'effet de l'abexinostat sur la réponse à l'irradiation *in vivo*. Pour cela, nous avons évalué la croissance tumorale de xénogreffes de cellules A549 et H460 sur le flanc de souris nudes traitées par abexinostat et/ou irradiation localisée dans un premier temps. Les souris porteuses de tumeurs A549 ou H460 ont été traitées par abexinostat administré par injection intrapéritonéale (IP) à la dose de 25 mg/kg x2/j avec 4 jours d'abexinostat suivi de 3 jours sans, puis 4 jours d'abexinostat suivi de 3 jours sans puis 4 jours d'abexinostat (schéma dit « 4 jours on / 3 jours off / 4 jours on / 3 jours off / 4 jours on» (comme indiqué dans les matériels et méthodes) +/- irradiation à la dose de 2 Gy par fraction et par jour les jours 2, 3 et 4.

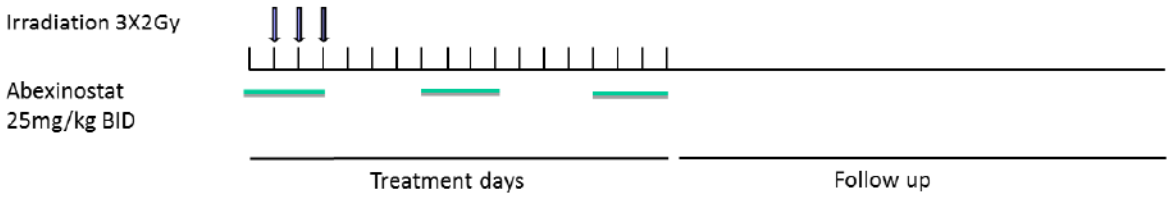
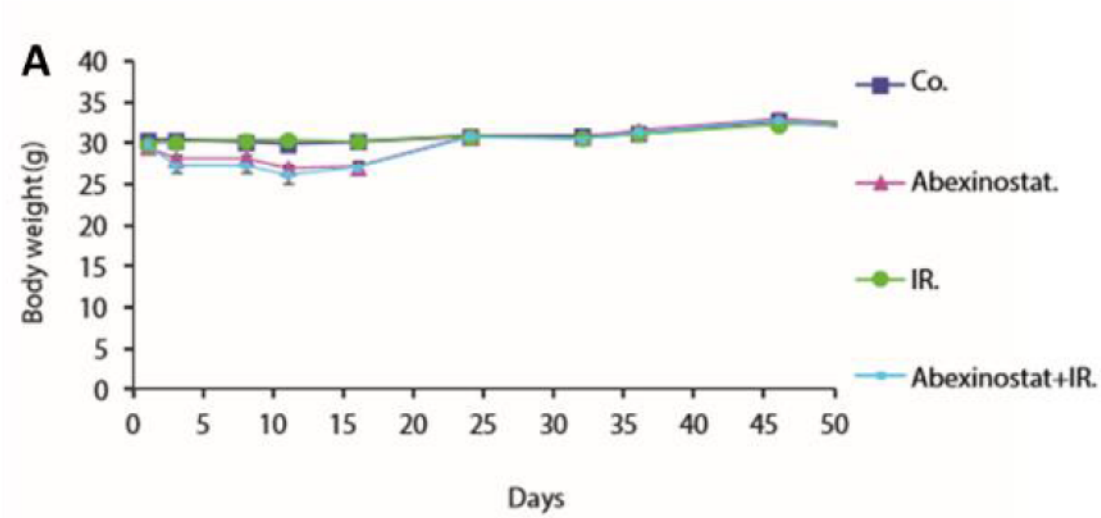


Figure 45 : Schéma de traitement de la combinaison abexinostat et radiothérapie

Le poids des souris a été utilisé comme un indicateur de l'état général des souris et de leur tolérance au traitement.



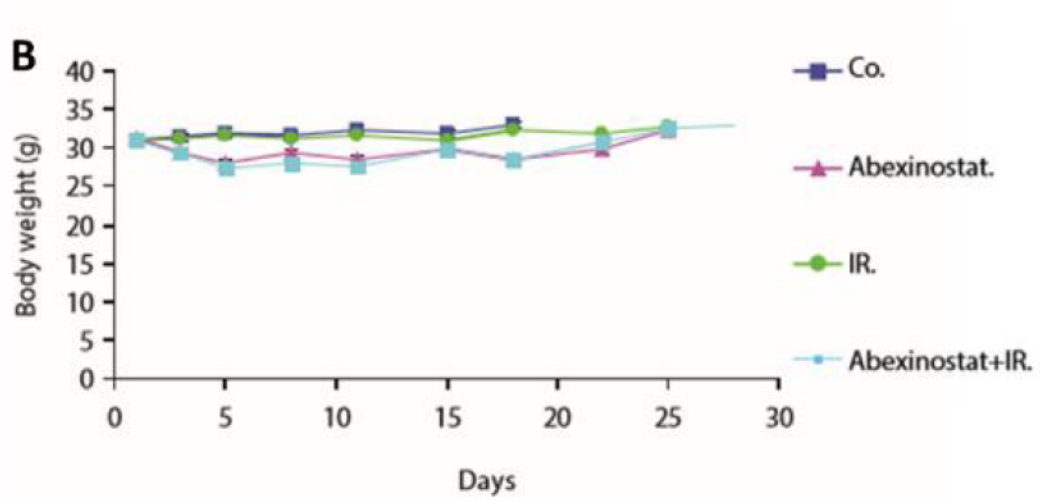


Figure 46 : Suivi du poids des souris

Suivi du poids des souris nudes porteuses de xenogreffes A459 (A) ou H460 (B) mesuré 2 fois par semaine pour les 4 groupes de traitement dans chaque expérimentation (contrôles (Co), traitées au DMSO ; abexinostat seul, irradiation seule (IR), combinaison abexinostat et irradiation).

Nous avons ainsi observé une perte de poids moyen maximale dans les groupes traités de 12.4 % et 8.7 % au onzième jour de traitement, respectivement dans le groupe traité par abexinostat combiné à l'irradiation et dans le groupe traité par abexinostat seul. Cette perte de poids a complètement récupéré à l'arrêt du traitement au 24ème jour pour tous les groupes traités et a donc été considérée comme acceptable.

Le traitement par abexinostat seul provoque une inhibition significative de la croissance tumorale des xenogreffes A549 (p = 0.005) (Figure 47 A) et H460 (p = 0.0009) (Figure 47 B) de même ordre de grandeur que l'irradiation seule. De manière intéressante, la croissance tumorale des deux lignées testées est significativement retardée par la combinaison abexinostat et radiothérapie comparée à un seul de ces deux traitements utilisé individuellement. Pour A549, nous avons observé un volume tumoral moyen de 464.54 mm3 (SEM = 28.02) dans le groupe traité par abexinostat seul versus 283.78 mm^3 (SEM = 19.71) dans le groupe traité par la combinaison 46 jours après le début du traitement (p = 0.006) (Figure 47 A). Pour H460, la croissance tumorale est bien plus rapide que pour A549 avec un volume tumoral moyen de 688.13 mm^3 (SEM = 52.98) dans le groupe traité par abexinostat seul versus 331.77mm^3 (SEM = 31.24) dans le groupe traité par la combinaison 18 jours après le début du traitement (p = 0.034) (Figure 47 B).

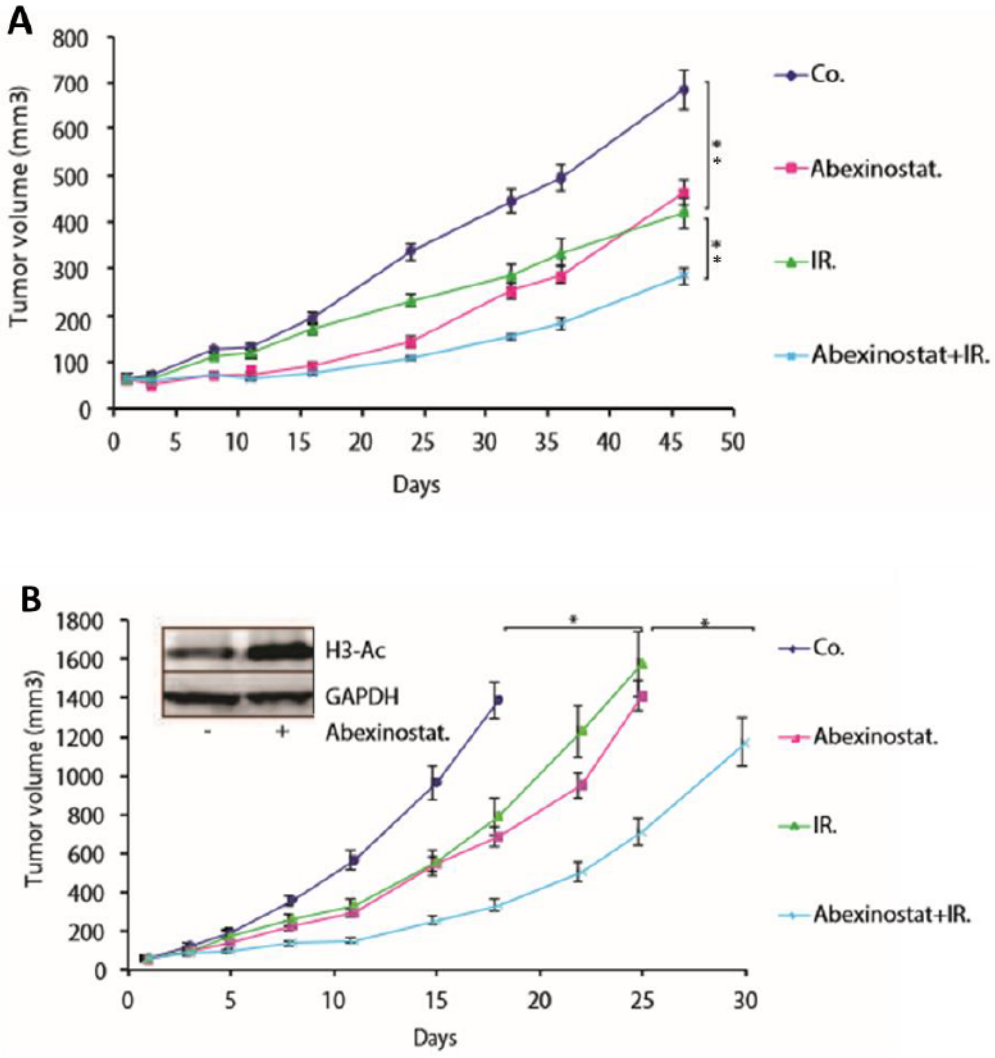


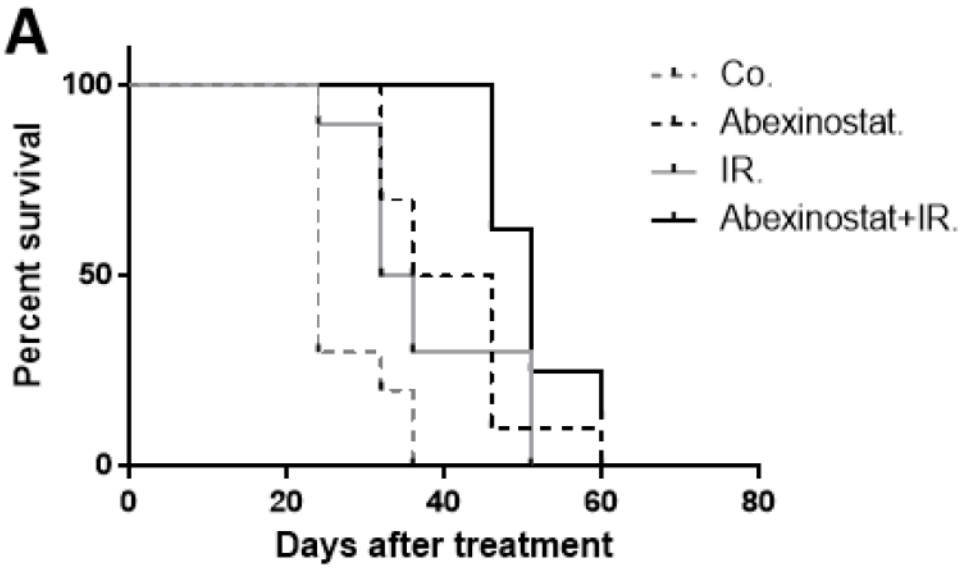
Figure 47 : L'abexinostat induit un retard de croissance tumorale et majore l'effet anti tumoral de l'irradiation

*Suivi du volume tumoral des xenogreffes A459 (A) ou H460 (B) mesuré 2 fois par semaine pour les 4 groupes de traitement dans chaque expérimentation (contrôles (Co), traitées au DMSO ; abexinostat seul, irradiation seule (IR), combinaison abexinostat et irradiation). (n = 2 avec 10 souris par groupe; t-test; *P < 0.05; **P < 0.01). Evaluation par Western blot du niveau d'expression de l'histone H3 acétylé dans les cellules H460 4 h après la deuxième injection d'abexinostat du quatrième jour consécutif de traitement par abexinostat. La GAPDH est utilisée comme contrôle de dépôt. Les Western blots présentés dans cette figure sont représentatifs des 2 expérimentations indépendantes effectuées (n = 2).*

Pour confirmer la diffusion de la drogue au sein de la tumeur, nous avons mesuré la concentration d'abexinostat *ex vivo* à partir de broyats de tumeurs prélevées après 4 jours consécutifs de traitement (25 mg/kg biquotidien). Les concentrations moyennes d'abexinostat mesurées dans les tumeurs sont de 477 ng/ml, 428 ng/ml et 73.4 ng/ml respectivement à 4 h, 7 h et 20 h de la deuxième injection IP du jour dans le groupe abexinostat seul. Pour évaluer l'activité

inhibitrice des histones désacétylases de l'abexinostat nous avons évalué par Western blot *ex vivo* sur broyat tumoral de cellules H460 l'acétylation de l'histone H3 dans le groupe contrôle et le groupe traité par abexinostat après 4 jours consécutifs de traitement. L'augmentation du niveau de l'histone H3 acétylé dans le groupe traité par abexinostat corrèle avec l'effet anti tumoral de l'abexinostat comme le montre la courbe de retard de croissance tumorale de la Figure 47 B.

Le retard de développement des cellules cancéreuses dans les xénogreffes se traduit par un bénéfice en survie pour les deux modèles de cancers pulmonaires étudiés. Pour les tumeurs A549 (Figure 48 A), la survie médiane est de 24 jours dans le groupe contrôle, 41 jours dans le groupe abexinostat, 34 jours dans le groupe radiothérapie, et 51 jours dans le groupe recevant la combinaison abexinostat et radiothérapie (p = 0,023 pour la comparaison entre la radiothérapie et la combinaison abexinostat et radiothérapie). Le bénéfice absolu en survie est de 17 jours pour le groupe traité par abexinostat, dix jours pour le groupe traité par radiothérapie, et 27 jours pour le groupe recevant la combinaison. Ainsi, le bénéfice en survie d'un traitement combiné était égal à la somme des bénéfices en survie de chacun des traitements délivrés seuls, l'abexinostat et l'irradiation ont donc un effet additif sur la survie.



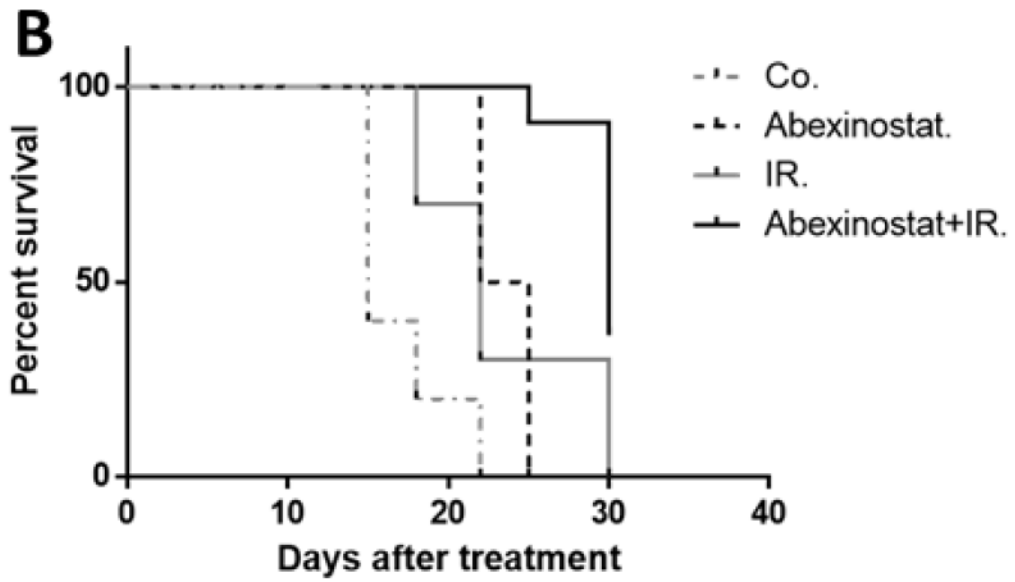


Figure 48 : L'abexinostat améliore la survie des souris porteuses de tumeur A549 et H460 traitées par radiothérapie +/- abexinostat

Courbes de Kaplan-Meier présentant la survie des souris avec xénogreffe A549 (A) et H460 (B) pour les 4 groupes de traitement dans chaque expérimentation (contrôles (Co), traitées au DMSO ; abexinostat seul, irradiation seule (IR), combinaison abexinostat et irradiation). (10 souris par groupe; p = 0.023 (A) et p = 0.0013 (B), log Rank test pour les groupes radiothérapie versus abexinostat plus radiothérapie).

Pour les tumeurs H460 (Figure 48 B), la survie médiane est de 15 jours dans le groupe contrôle, 23.5 jours dans le groupe abexinostat, 22 jours dans le groupe radiothérapie, et 30 jours dans le groupe recevant la combinaison abexinostat et radiothérapie (p = 0,0013 pour la comparaison entre la radiothérapie et la combinaison abexinostat et radiothérapie). Le bénéfice absolu en survie est de 8,5 jours pour le groupe traité par abexinostat, sept jours pour le groupe traité par radiothérapie, et 15 jours pour le groupe recevant la combinaison.

Puisque le traitement standard des CBNPC localement avancés repose sur la radio chimiothérapie concomitante avec un doublé de chimiothérapie à base de platine nous avons décidé d'étudier la triple combinaison d'abexinostat, irradiation et cisplatine en faisant l'hypothèse que la toxicité limitée observée lors de la combinaison abexinostat-radiothérapie pourrait permettre l'adjonction de cisplatine à la combinaison préalablement testée et que l'abexinostat pourrait renforcer l'effet anti tumoral de la combinaison cisplatine-radiothérapie. Nous avons évalué la croissance tumorale de xénogreffes A549 chez des souris traitées par abexinostat et/ou cisplatine et/ou radiothérapie. Pour cela nous avons testé différents schéma thérapeutiques en nous adaptant à la tolérance du traitement par les souris. Nous avons abouti au schéma de traitement où les souris porteuses de tumeurs A549 ont été traitées par abexinostat administré par injection

IP à la dose de 25 mg/kg x 2/j avec 5 jours d'abexinostat suivi de 4 jours sans, puis 3 jours d'abexinostat suivi de 3 jours sans puis 5 jours d'abexinostat (schéma dit « 5 jours on / 4 jours off / 3 jours on / 3 jours off / 5 jours on» +/- cisplatine administré par injection IP à la dose de 1 mg/kg x 1/j les jours 2 et 16, 1 h avant l'irradiation +/- irradiation à la dose de 2 Gy par fraction et par jour les jours 2, 3 et 4 (comme indiqué dans les matériels et méthodes).

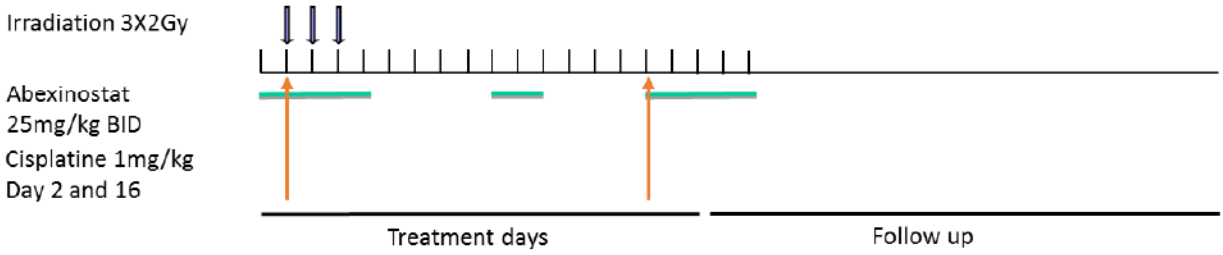


Figure 49 : Schéma de traitement de la combinaison abexinostat +/- cisplatine +/- radiothérapie

Le poids des souris a été utilisé comme un indicateur de l'état général des souris et de leur tolérance au traitement. Le schéma de traitement a été adapté à la tolérance et au profil de toxicité. Comme le montre la Figure 50 A, nous avons observé une perte de poids moyen maximale dans les groupes traités de 10.7 % pour le groupe abexinostat seul et 6.9 % pour le groupe abexinostat et radiothérapie après 17 jours de traitement. Pour le groupe traité par la triple combinaison (abexinostat, cisplatine et irradiation), nous avons observé une perte de poids maximale de 9.4% au sixième jour de traitement avec un effet marqué sur la perte de poids après chaque injection de cisplatine délivrée les 2ème et 16 ^{ème} jours de traitement. Ces pertes de poids ont totalement récupéré à l'arrêt du traitement pour tous les groupes au 25ème jour.

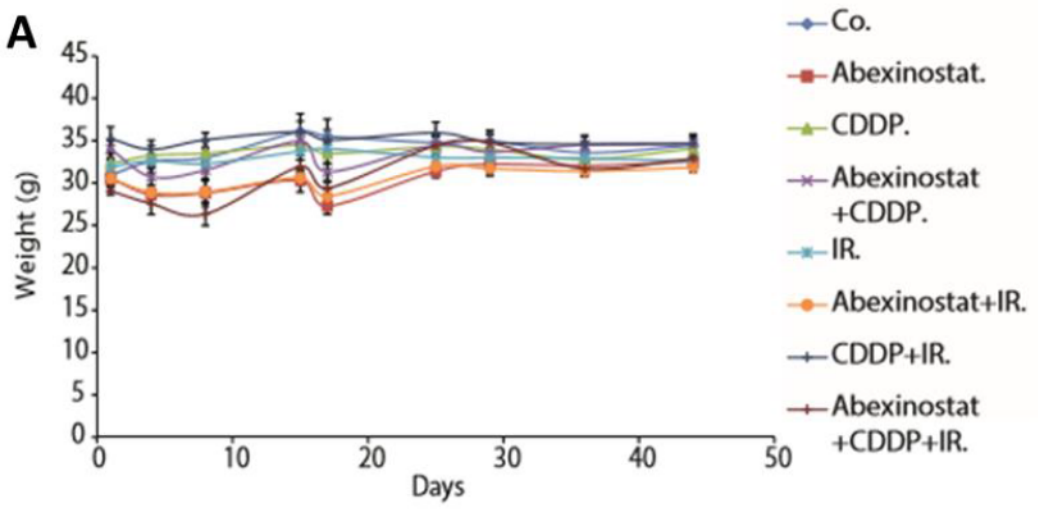


Figure 50 : Suivi du poids des souris lors de la combinaison abexinostat +/- cisplatine +/- radiothérapie

Suivi du poids des souris nudes porteuses de xenogreffes A459 mesuré 2 fois par semaine pour les 8 groupes de traitement dans chaque expérimentation. Co = contrôles, CDDP = cisplatine, IR = irradiation).

Le groupe traité par abexinostat en combinaison à l'irradiation présente un retard de croissance tumorale par rapport au groupe traité par abexinostat seul à la limite de la significativité statistique ($p = 0.05$). Le groupe traité par la triple combinaison (abexinostat, cisplatine et irradiation) présente un retard de croissance tumorale significatif en comparaison avec le groupe traité par cisplatine et irradiation ($p = 0.03$) ainsi qu'avec le groupe traité par abexinostat seul ($p = 0.004$).

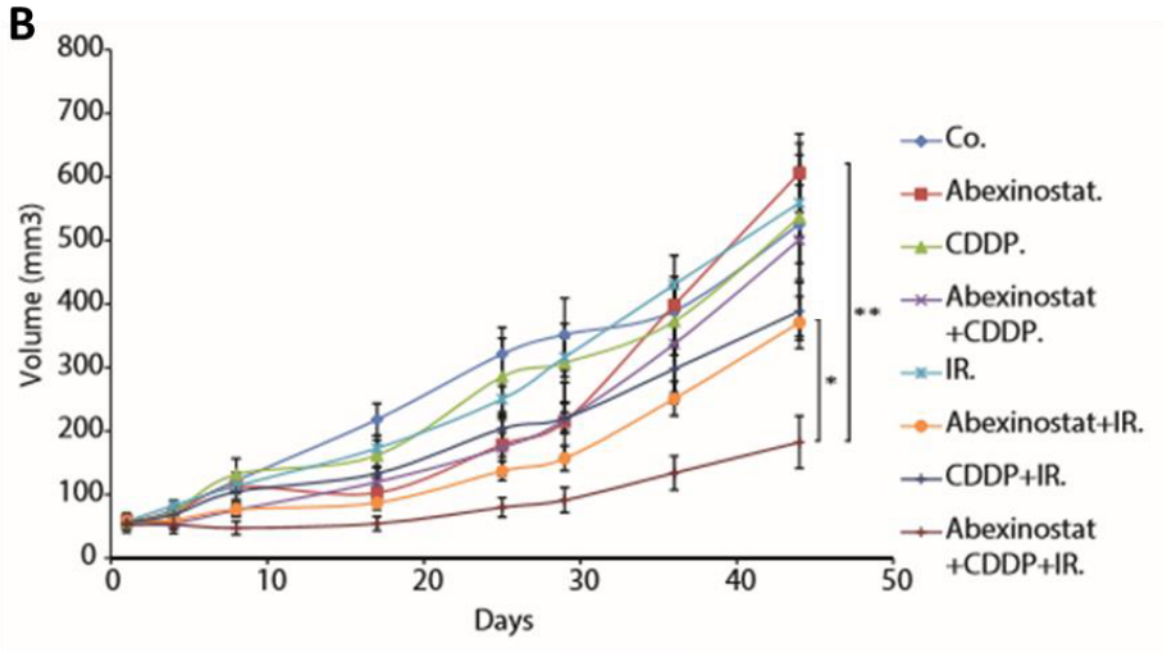


Figure 51 : L'abexinostat majore l'effet anti tumoral de la combinaison irradiation et cisplatine

*Suivi du volume tumoral des xenogreffes A459 mesuré 2 fois par semaine pour les 8 groupes de traitement dans chaque expérimentation (contrôles (Co), traitées au DMSO ; abexinostat seul, irradiation seule (IR), combinaison abexinostat et irradiation). (n = 2 avec 10 souris par groupe; t-test; *P < 0.05; **P < 0.01).*

Le retard de développement des cellules cancéreuses dans les xénogreffes ayant un atteint une différence significative en terme de volume nous avons sacrifié les souris restantes à J51 et J65 pour des raisons pratiques bien que les souris restantes dans les groupes traités par Abexinostat et cisplatine ; cisplatine et irradiation ainsi que abexinostat, cisplatine et irradiation n'aient même pas atteints 300mm^3. Par conséquent, ceci ne se traduit pas par un bénéfice en survie dans le modèle de cancers pulmonaires étudiés (A549). Toutefois, la réalisation d'un test du Log Rank pour la tendance (« Log Rank test for trend ») est statistiquement significatif (p = 0.0096) ce qui suggère qu'avec un suivi plus long nous aurions probablement eu une différence en survie.

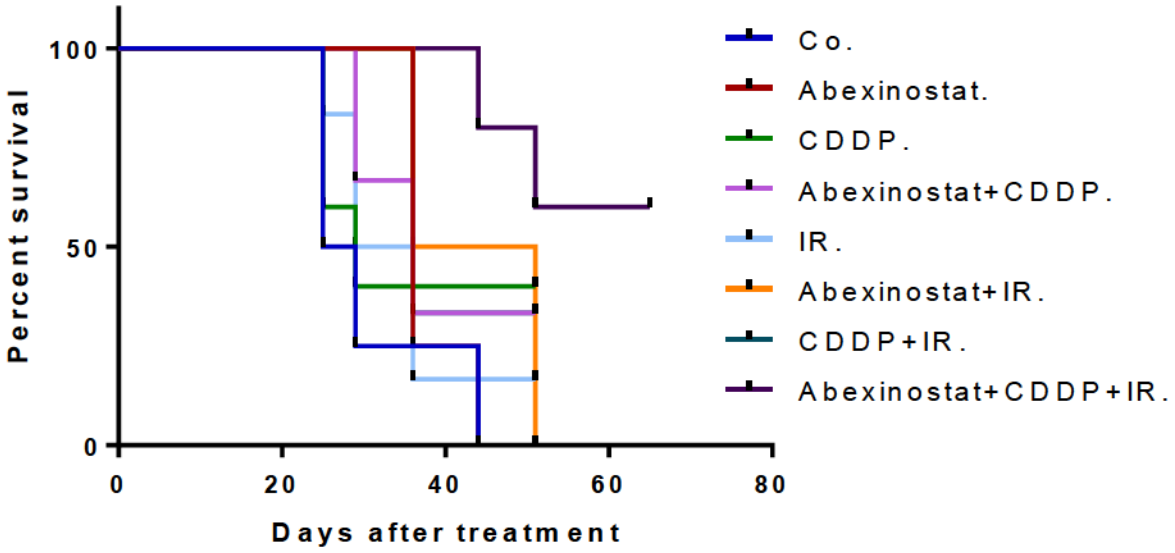


Figure 52 : Effet de la triple combinaison par abexinostat, cisplatine et irradiation sur la survie des souris porteuses de tumeur A549

Courbes de Kaplan-Meier présentant la survie des souris avec xénogreffe A549 pour les 8 groupes de traitement (Co = contrôles, IR = irradiation, CDDP = cisplatine). (10 souris par groupe; p = 0.25, log Rank test pour les groupes cisplatine et radiothérapie versus abexinostat, cisplatine et radiothérapie).

3.1.2.7 Evaluation de l'effet de la combinaison abexinostat et irradiation sur les tissus sains pulmonaires *in vivo*

Nous avons vu sur les expériences précédemment décrites que la tolérance globale de la combinaison d'abexinostat et de radiothérapie présente une tolérance acceptable et une toxicité globale limité lorsque l'on prend comme indicateur le poids des souris. Lors de l'irradiation de tumeurs pulmonaires le facteur limitant majeur est le risque de fibrose pulmonaire qui impose des contraintes de dose sur les volumes irradiés. Ce risque pouvant être modifié par l'association de drogues à la radiothérapie il nous est apparu important d'évaluer le risque de fibrose pulmonaire de la combinaison abexinostat radiothérapie. Ce d'autant que, comme nous l'avons vu en introduction un effet anti fibrosant des HDACi a été décrit par certains et que ceci pourrait constituer une opportunité d'escalade de dose de radiothérapie.

Nous avons utilisé un protocole d'irradiation thoracique fractionnée mis en place en routine dans notre unité INSERM 1030, sur souris C57B6, sans greffe tumorale, délivrant 9 x 3.5 Gy en combinaison avec de l'abexinostat selon un schéma d'administration intensifié d'abexinostat représenté ci-dessous. L'abexinostat a été donné 5j/7 sur 2 semaines aux doses de 100 ou 50 mg/kg/j en une seule injection IP/j. L'abexinostat a été débuté 48 h avant l'irradiation et les jours

d'irradiation l'abexinostat a été administré 1 h avant l'irradiation. Le poids des souris a été utilisé comme un indicateur de l'état général des souris et de leur tolérance au traitement. Les prélèvements des poumons des souris ont été réalisés à 10 et 22 semaines du début du traitement selon les groupes puis fixés et analysés en histologie comme décrit dans les matériels et méthodes afin de quantifier les zones de fibrose.

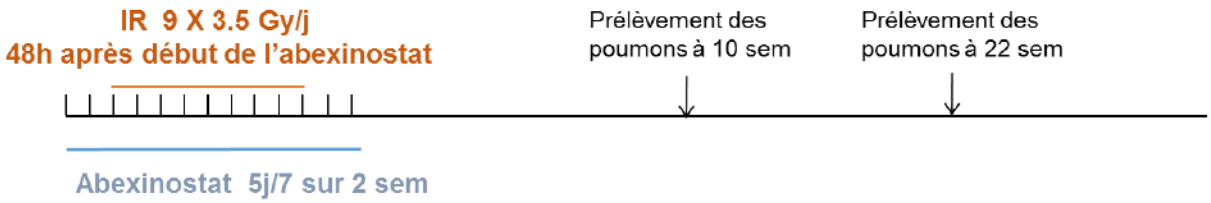


Figure 53 : Schéma de traitement du modèle d'évaluation de la fibrose pulmonaire radio induite

Nous avons observé une perte de poids moyen maximale dans les groupes traités de 12% en cours de traitement. Cette perte de poids a complètement récupéré à l'arrêt du traitement pour tous les groupes traités et a donc été considérée comme acceptable.

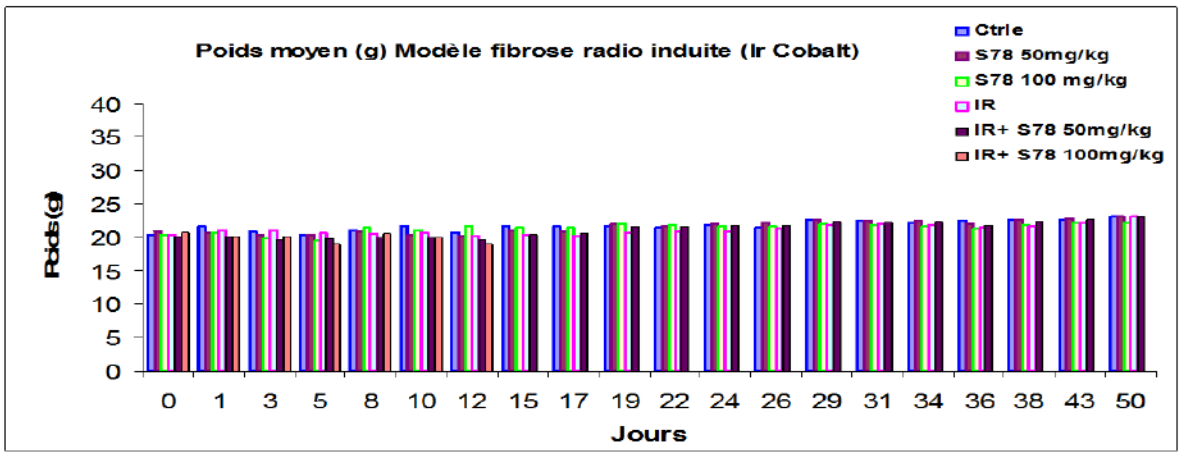


Figure 54 : Suivi du poids des souris lors de la combinaison abexinostat +/- radiothérapie

Suivi du poids des souris C57B6 mesuré 2 fois par semaine pour les 6 groupes de traitement. (Co = contrôles, CDDP = cisplatine, IR = irradiation, S78 = abexinostat), (n = 1, 6 souris par groupe)

A 10 semaines, comme attendu les souris contrôles ainsi que les souris irradiées présentent peu ou pas de fibrose. Les souris traitées par abexinostat et celle traitées par abexinostat et radiothérapie non plus. Nous pouvons donc conclure qu'à ce stade précoce l'abexinostat ne semble pas induire de fibrose pulmonaire que ce soit seul ou en association à la radiothérapie.

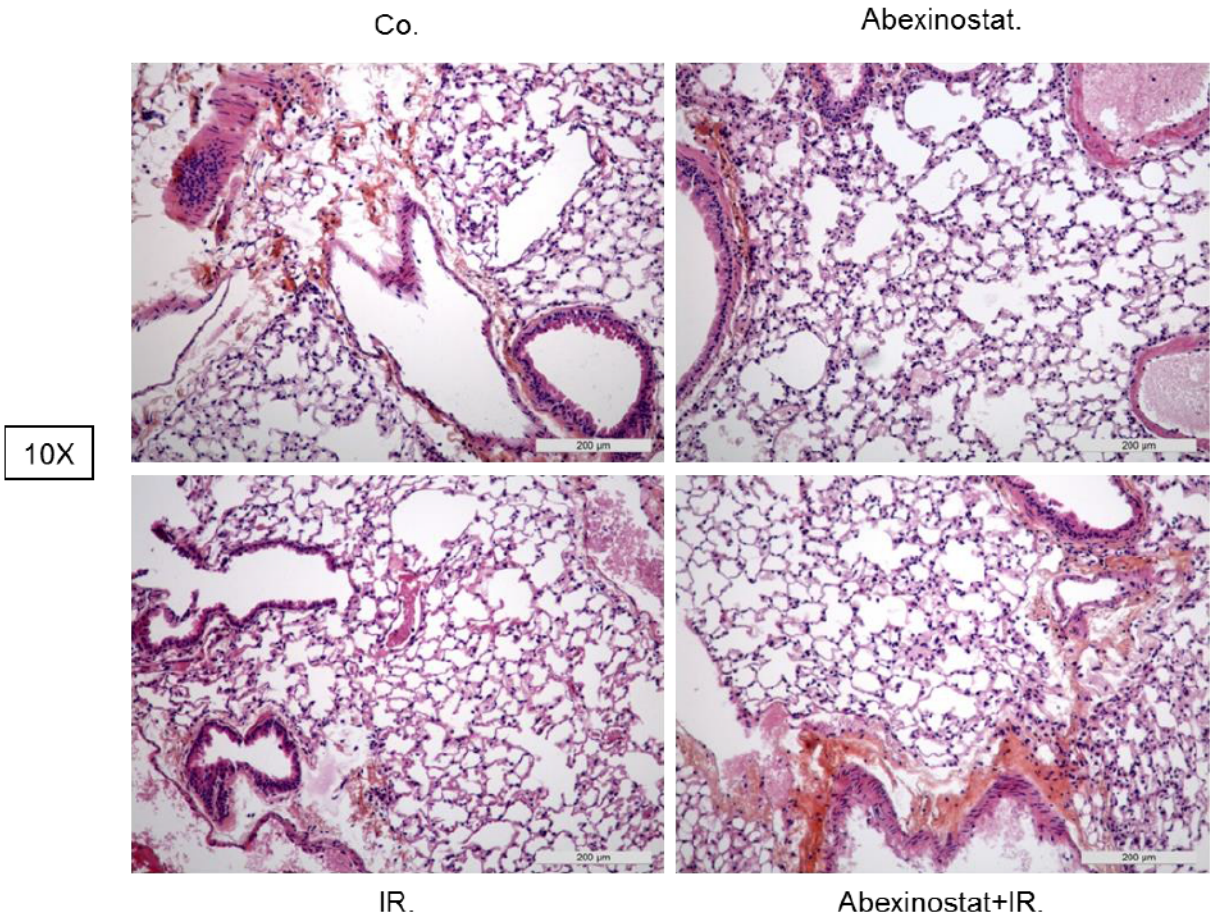


Figure 55 : Effet de l'abexinostat sur les tissus sains pulmonaires 10 semaines après traitement par abexinostat +/- irradiation thoracique

Evaluation de la toxicité pulmonaire à 10 semaines du traitement par abexinostat +/- irradiation (9 x 3.5 Gy/j) des souris C57B6 pour les 4 groupes de traitement. (Co = contrôles, IR = irradiation), (n = 1, 6 souris par groupe). Les souris ont été sacrifiées et leur poumons prélevés pour étude histologique après coloration en hématoxyline éosine.

A 22 semaines, comme attendu, les souris irradiées présentent une fibrose radio induite, caractérisée par un épaississement des travées entre les alvéoles pulmonaires. Cependant, dans cette expérience, nous avons constaté une hétérogénéité de la fibrose pulmonaire rendant difficile sa quantification objective. Les souris traitées par abexinostat seul n'ont pas développé de fibrose et présente un parenchyme pulmonaire tout à fait similaire à celui des souris contrôles non traitées. Les poumons des souris traitées par abexinostat et radiothérapie présentent des plages de fibrose très hétérogènes qui semblent moins marquées et moins étendues que les plages de fibrose pulmonaire des souris traitées par irradiation seule. Une importante hétérogénéité au sein des

poumons d'une même souris, ainsi que d'une souris à l'autre, nous fait conclure que, bien que prometteurs, ces résultats nécessitent d'être confirmés en reproduisant ces expérimentations.

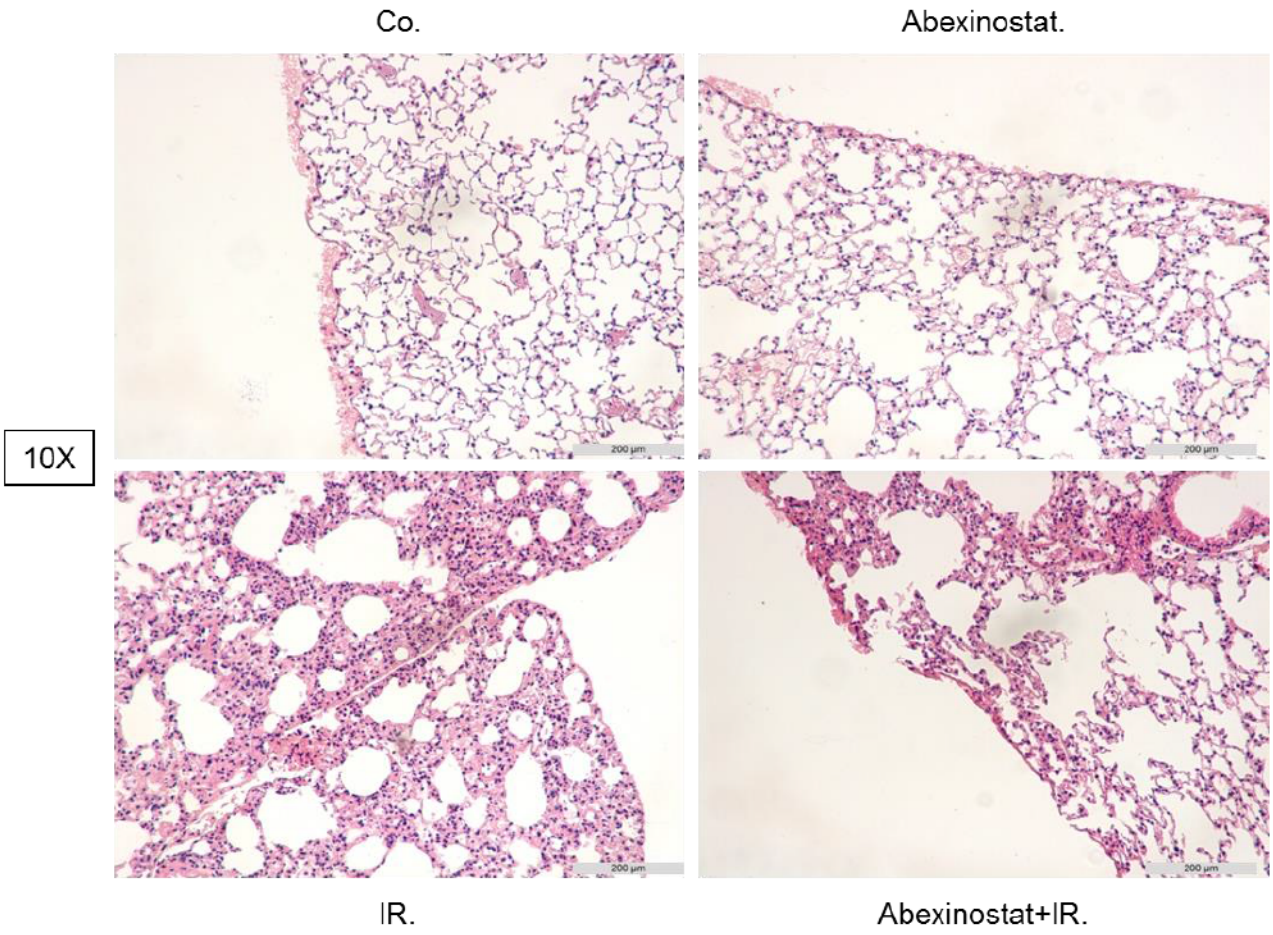


Figure 56 : Effet de l'abexinostat sur les tissus sains pulmonaires 22 semaines après traitement par abexinostat +/- irradiation thoracique

Evaluation de la toxicité tardive pulmonaire à 22 semaines du traitement par abexinostat +/- irradiation (9 x 3.5 Gy/j) des souris C57B6 pour les 4 groupes de traitement. (Co = contrôles, IR = irradiation), (n = 1, 6 souris par groupe). Les souris ont été sacrifiées et leur poumons prélevés pour étude histologique après coloration en hématoxyline éosine.

3.2 *EVALUATION DE LA TOXICITE ET DE LA TOLERANCE DE LA COMBINAISON ABEXINOSTAT ET RADIOTHERAPIE CHEZ L'HOMME DANS LE CADRE D'UN ESSAI DE PHASE I (DONNEES SOUMISES A ONCOTARGET, EN REVISION SOUS LA REFERENCE N° #018377)*

3.2.1 Rationnel

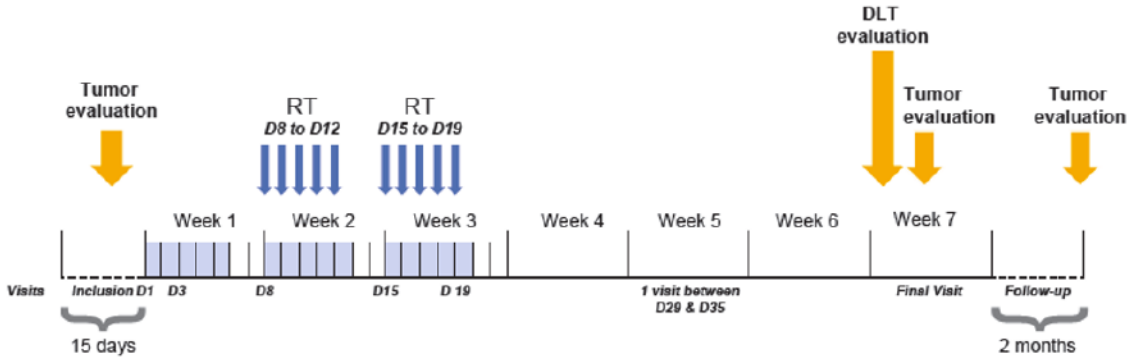
Comme nous l'avons vu en introduction, plusieurs HDACi sont en développement clinique pour leurs propriétés anti tumorales. Du fait de leur activité et de leur toxicité limitée en monothérapie, des stratégies de combinaisons à d'autres agents thérapeutiques ont été développées pour le traitement des tumeurs solides. L'abexinostat est un pan-HDACi à large spectre de la famille des acides phényl hydroxamiques, qui a montré une activité anti tumorale en monothérapie *in vitro* dans des lignées de neuroblastome, ainsi qu'une efficacité en combinaison avec le bortesomib in vivo sur des modèles de xénogreffes de neuroblastome (394). L'abexinostat a également démontré une activité anti tumorale seul et en combinaison avec de la chimiothérapie dans des modèles de sarcomes des tissus mous (395). De plus, il a été montré que l'abexinostat peut induire une activation de l'apoptose et la production de ROS (396). Enfin, nous avons montré qu'en cas de prétraitement par abexinostat, celui-ci majore l'effet anti tumoral de l'irradiation *in vitro* et *in vivo* et que la combinaison présente un profil acceptable de tolérance chez les souris. Ces données précliniques nous ont servi de rationnel pour conduire un essai de phase I, exploratoire, d'escalade de dose, évaluant pour la première fois chez l'homme la combinaison d'abexinostat et de radiothérapie chez des patients présentant des tumeurs solides avancées dans un contexte palliatif.

3.2.2 Résultats

3.2.2.1 Patients de l'étude

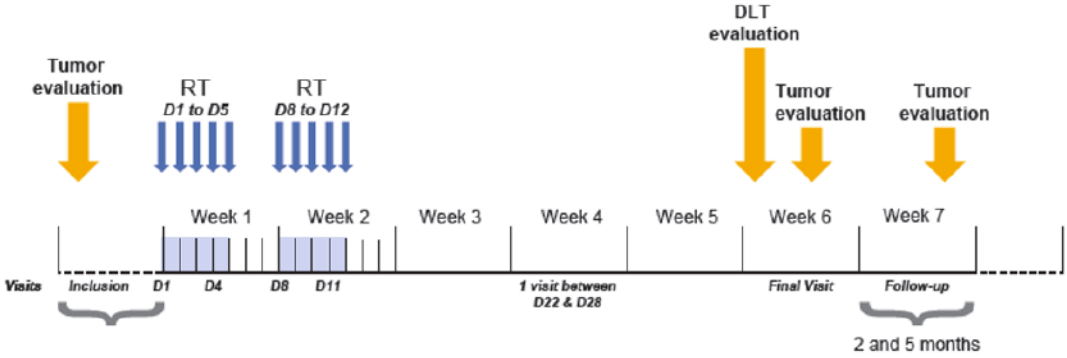
Au total, 62 patients ont été inclus dans cette étude de septembre 2010 à mars 2015. Cinquante-huit patients ont reçu au moins une dose d'abexinostat, parmi eux 33 patients ont été traités selon le schéma 1 et 25 patients ont été traités selon le schéma 2. Les schémas de traitement 1 et 2, décrits dans les matériels et méthodes, sont représentés sur la figure ci-dessous.

A. Schedule 1



RT, radiotherapy (3 Grays per day for 5 consecutive days for 2 weeks)
Abx BID for 5 consecutive days for the 3 weeks (from week 1 to week 3)

B. Schedule 2



RT, radiotherapy (3 Grays per day for 5 consecutive days for 2 weeks)
Abx BID for 4 consecutive days for 2 weeks (from week 1 to week 2)

Figure 57 : Schémas de traitement de l'étude de phase I de combinaison abexinostat et radiothérapie

Quatre patients ont été sortis d'étude (3 du fait d'effets secondaires, 1 du fait d'une déviation protocolaire). Le nombre de patients des groupes sus et sous diaphragmatiques est rapporté dans le tableau ci-dessous.

Tableau 5 - Répartition du nombre de patients selon chaque schéma de traitement et selon chaque groupe en fonction du site irradié

Subdiaphragmatic (n=25)					
Schedule 1	**Dose Level (BID)**	**# of Patients**	**Schedule 2**	**Dose Level (BID)**	**# of Patients**
	15 mg/m^2	3		60 mg/m^2	0
	30 mg/m^2	3		75 mg/m^2 =120 mg	3
	45 mg/m^2	3		90 mg/m^2 =140 mg	3
	60 mg/m^2	5		105 mg/m^2 =160 mg	5
Supradiaphragmatic (n=33)					
Schedule 1	15 mg/m^2	3	**Schedule 2**	60 mg/m^2	6
	30 mg/m^2	4		75 mg/m^2 =120 mg	4
	45 mg/m^2	3		90 mg/m^2 =140 mg	3
	60 mg/m^2	9		105 mg/m^2 =160 mg	1

Les caractéristiques de la population de l'étude sont résumées dans le tableau suivant.

Tableau 6 - Caractéristiques de la population de l'étude dans les schémas de traitement 1 et 2

Characteristic	Schedule 1 (n=33)	Schedule 2 (n=25)	Schedule 1 + Schedule 2 (N=58)
Median age (range), years	61 (20-76)	61 (37-82)	61.5 (20-82)
>65 years, n (%)	13 (39%)	9 (36%)	22 (38%)
Males, n (%)	13 (39%)	8 (32%)	21 (36%)
Eastern Cooperative Oncology Group performance status, n (%)			
Normal activity without restriction	17 (52%)	6 (24%)	23 (40%)
Ambulatory but restricted in physical activity	15 (46%)	14 (56%)	29 (50%)
Ambulatory but unable to carry out any work	1 (3%)	5 (20%)	6 (10%)
Limited self-care, 50% in bed	0	0	0
Completely disabled, self-care limited	0	0	0
Types of prior therapies, n (%)			
Antineoplastic agents	30 (91%)	22 (88%)	52 (90%)
Endocrine therapy	7 (21%)	7 (28%)	14 (24%)
All other therapeutic products	9 (27%)	4 (16%)	13 (22%)
Drugs for treatment of bone diseases	0 (0%)	3 (12%)	3 (5%)
Pituitary and hypothalamic hormones and analogues	1 (3%)	1 (4%)	2 (3%)
Antiemetics and antinauseants	1 (3%)	0 (0%)	1 (2%)
Diagnostic radiopharmaceuticals	1 (3%)	0 (0%)	1 (2%)
Immunostimulants	1 (3%)	0 (0%)	1 (2%)
Sex hormones and modulators of the genital system	1 (3%)	0 (0%)	1 (2%)
Number of prior chemotherapy lines, n (%)			
1	6 (18%)	3 (12%)	9 (16%)
2	7 (21%)	7 (28%)	14 (24%)
3	9 (27%)	4 (16%)	13 (22%)
≥4	11 (33%)	8 (32%)	19 (33%)
Median number of prior therapy lines (range)	3 (1-10)	3 (1-8)	3 (1-10)
Primary diagnosis, n (%)			
Breast cancer	10 (30%)	11 (44%)	21 (36%)
Lung cancer	7 (21%)	7 (28%)	14 (24%)
Colorectal cancer	5 (15)	0 (0%)	5 (9%)
Neuroendocrine cancer	3 (9%)	2 (8%)	5 (9%)
Malignant melanoma	3 (9%)	0 (0%)	3 (5%)
Other cancers	5 (15%)	5 (20%)	10 (16%)

L'âge médian dans notre étude est de 61.5 ans (20-82), avec 38 % de patients de plus de 65 ans. Le diagnostic primitif le plus fréquent est le cancer du sein (36 %), suivi des cancers bronchiques (24 %), des cancers colorectaux (9 %) et des tumeurs neuroendocrines (9 %). Parmi les patients étudiés, 33 % ont présenté une tumeur classée T2 initialement, 21 % T3 et 17 % T4. Au total, 41 % des patients ont été classés M1 initialement et 43 % M0. Parmi les 58 patients traités, 95 % ont reçu préalablement de la chimiothérapie ou des combinaisons de chimiothérapie et chirurgie et/ou radiothérapie (sur un autre site que celui irradié dans le cadre de cette étude). On note que 33 % des patients ont été traités par au moins 4 lignes de chimiothérapie avant d'entrer dans cette étude. Les chimiothérapies reçues au préalable les plus fréquentes sont le fluor uracile (40%), le cisplatine (33 %), le cyclophosphamide (29 %), le docétaxel (28 %) et l'épirubicine (22 %). Aucun patient n'a été traité préalablement par chirurgie ou radiothérapie seule. Seuls 2 patients (3 %) n'ont pas reçu de traitement préalable pour le contrôle de leur maladie carcinomateuse.

Dans le groupe sus diaphragmatique, les sites d'irradiation les plus fréquents dans le cadre de l'étude sont le poumon/médiastin (n = 13 patients) et le cerveau (n = 10 patients) suivi des lésions osseuses (n = 7 patients dont 2 métastases scapulaires, 2 vertébrales, 2 sternales et 1 costale), des tissus mous (n = 4 patients) et cervicales (n = 3 patients). Dans le groupe sous diaphragmatique, les sites d'irradiation les plus fréquents dans le cadre de l'étude sont les lésions osseuses (n = 12 patients dont 6 métastases vertébrales, 2 fémorales et 4 iliaques) suivi des lésions des tissus mous (n = 4 patients dont 1 métastase abdominale, 1 de la hanche, 1 supra rénale et 1 de la cuisse), du pelvis (n = 4 patients), des lésions d'organes (n = 2 patients) et des adénopathies (n = 3).

Avec un suivi médian de 16 semaines (0.6-52.6), 83 % des patients traités ont terminé l'étude. Parmi les 58 patients traités, 10 patients (17 %) ont interrompu leur traitement. Les principales raisons d'arrêt de traitement sont un effet secondaire (6 patients, 10 %), une progression de la maladie (2 patients, 3 %), une déviation protocolaire (1 patient, 2 %) et une raison non médicale (1 patient, 2 %). Aucun patient n'a été perdu de vue.

Tableau 7 - Statut de complétude de l'étude par schéma de traitement

All Treated, n (%)	Schedule 1 (n=33)	Schedule 2 (n=25)	Schedule 1 + Schedule 2 (N=58)
Completed	28 (85%)	20 (80%)	48 (83%)
Withdrawn due to	5 (15%)	5 (20%)	10 (17%)
Adverse event	4 (12%)	2 (8%)	6 (10%)
Protocol deviation	1 (3%)	1 (4%)	2 (3%)
Progressive disease	0 (0%)	1 (4%)	1 (2%)
Nonmedical reason	0 (0%)	1 (4%)	1 (2%)
Lost to follow-up	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

3.2.2.2 Etude d'efficacité

Parmi les 51 patients évaluables pour la réponse tumorale, le taux de meilleure réponse globale est de 8 % avec 1 réponse complète et 3 réponses partielles. Le taux de meilleure réponse locorégionale est de 12 %, avec 1 réponse complète et 5 réponses partielles avec un suivi médian de 16 semaines. Les tableaux suivants résument ces réponses tumorales par schéma et par groupe de traitement.

Dix patients ont présenté des lésions cérébrales initialement considérées comme cible ou non cible, avec pour primitif le plus fréquent les adénocarcinomes mammaires (n = 6 patients), suivi par 1 cas d'adénocarcinome colique, 1 adénocarcinome de l'œsophage, 1 adénocarcinome bronchique et 1 mélanome. L'efficacité locorégionale a été évaluée chez 7 patients. Parmi les 4 patients présentant des lésions cérébrales considérées comme lésions cibles, 1 patient a présenté une réponse partielle comme meilleure réponse locorégionale et 3 ont présenté une stabilité de la

maladie locorégionale (taux de réponse locorégionale de 25 %). Parmi les 6 patients présentant des lésions cérébrales non cibles, on observe 1 réponse complète comme meilleure réponse locorégionale, 4 patients classés comme non en réponse complète/ non en progression et un patient en progression de la maladie (taux de réponse locorégionale de 17 %). L'histologie primitive du patient en réponse complète est un adénocarcinome. Trois patients n'ont pas eu la visite d'évaluation à 6 semaines selon les recommandations du protocole (mais ils ont eu leurs visites de suivi par la suite). Ils ont donc été considérés comme non évaluables pour l'efficacité finale du traitement.

Tableau 8 - Meilleure réponse globale et locorégionale par schéma de traitement

Best ORR, n (%)	**Schedule 1 (n=30)**	**Schedule 2 (n=21)**	**Schedule 1 + Schedule 2 (N=51)**
CR	0 (0.0%)	1 (5%)	1 (2%)
PR	1 (3%)	2 (10%)	3 (6%)
SD	17 (57%)	10 (48%)	27 (53%)
PD	10 (33%)	8 (38%)	18 (35%)
Non-CR/Non-PD	2 (7%)	0 (0%)	2 (4%)
Objective response rate	1 (3%)	3 (14%)	4 (8%)
95% CI	0.1-17.2	3.0-36.3	2.2-18.9
Best Loco-regional Response Rate, n (%)	**Schedule 1 (n=30)**	**Schedule 2 (n=21)**	**Schedule 1 + Schedule 2 (N=51)**
CR	0 (0%)	1 (5%)	1 (2%)
PR	1 (3%)	4 (19%)	5 (10%)
SD	21 (70%)	11 (52%)	32 (63%)
PD	4 (13%)	4 (19%)	8 (16%)
Non-CR/Non-PD	1 (3%)	1 (5%)	2 (4%)
Objective response rate	1 (3%)	5 (24%)	6 (12%)
95% CI	0.1-17.2	8.2-47.2	4.4-23.9

Tableau 9 - Meilleure réponse globale et locorégionale par groupe de traitement (sus ou sous diaphragmatique)

Best Loco-regional Response, n (%)	Supradiaphragmatic (n=29)	Subdiaphragmatic (n=22)
CR	0 (0.0%)	1 (5%)
PR	4 (14%)	1 (5%)
Stable disease (SD)	18 (62%)	14 (64%)
PD	5 (17%)	3 (14%)
Non CR/Non PD	0 (0%)	2 (9%)
Objective response rate	4 (14%)	2 (9%)
95% CI	3.9-31.7	1.1-29.2
Best Overall Response, n (%)		
CR	0 (0%)	1 (5%)
PR	3 (10%)	0 (0%)
SD	15 (52%)	12 (55%)
PD	11 (38%)	7 (32%)
Non-CR/Non-PD	0 (0%)	2 (9%)
Objective response rate	3 (10%)	1 (5%)
95% CI	2.2-27.4	0.1-22.8

3.2.2.3 Etude de la toxicité

3.2.2.3.1 Dose maximale tolérée (MTD) et toxicité dose limitante (DLT)

Au total, 27 patients ont été considérés comme évaluables pour déterminer la toxicité dose limitante dans le schéma 1. La MTD pour le schéma 1 a été atteinte à 60mg/m² dans le groupe sus diaphragmatique (2 DLT pour 6 patients évaluables) et considéré comme la MTD1. Puis, pour le schéma 2 d'administration (4 jours on, 3 jours off, par semaine sur 2 semaines comme décrit dans les matériels et méthodes), l'escalade de dose a été débutée à la MTD1 (60 mg/m²). La MTD du schéma 1 n'a pas été atteinte dans le groupe sous diaphragmatique à 60 mg/m² x 2/j. L'escalade de dose du schéma 2 pour ce groupe a donc débutée un pallier au-dessus, à 75 mg/m² x 2/j.

Vingt-deux patients ont été évalués pour la DLT dans le schéma 2. La MTD du schéma 2 appelée MTD2 a été atteinte à 105 mg/m² x 2/j pour le groupe sous diaphragmatique. Quatre

patients traité au pallier de dose de 105 mg/m² dans les groupes sus et sous diaphragmatiques ont été considérés comme évaluables pour les DLT. Le nombre de patients et les DLT à chaque niveau de doses pour les groupes sus et sous diaphragmatiques sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 10 - DLT en fonction des niveaux de dose et des groupes de radiothérapie (sus ou sous diaphragmatique)

Schedule 1 (n=27)							
	Dose Level	Subdiaphragmatic		Supradiaphragmatic		Total Numbers	
		# of Patients	# of DLTs	# of Patients	# of DLTs	# of Evaluable Patients	# of DLTs
5d/7, 3w, 1 cycle Hydrochloride formula	15 mg/m²	3	0	3	0	6	0
	30 mg/m²	3	0	4 (1 NE)	0	6	0
	45 mg/m²	3	0	3	0	6	0
	60 mg/m²	5 (2 NE)	0	9 (3 NE)[b]	2	9	2

Schedule 2 (n=23)							
	Dose Level	Subdiaphragmatic		Supradiaphragmatic		Total Numbers	
		# of Patients	# of DLTs	# of Patients	# of DLTs	# of Evaluable Patients	# of DLTs
4d/7, 2w, 1 cycle Hydrochloride formula/tosylate formula	60 mg/m²	-	-	7 (1 NE)	1	6	1
	75 mg/m²=120 mg[a]	3	0	5 (2 NE)	0	6	0
	90 mg/m²=140 mg[a]	3	0	4 (1 NE)	0	6	0
	105 mg/m² =160 mg[a]	5 (1 NE)[c]	2	1	1	5	3

DLTs, dose-limiting toxicities; NE, not evaluable

[a]Equivalence in tosylate formula.

[b]MTD1 for schedule 1 was reached at 60 mg/m² in supradiaphragmatic group.

[c]MTD2 of schedule 2 was reached at 105 mg/m² (160 mg[a]) for subdiaphragmatic group.

Au niveau de dose le plus élevé, 105 mg/m², 3 des 4 patients évaluables ont présenté une DLT (2 dans le groupe sous diaphragmatique et 1 dans le groupe sus diaphragmatique) d'ordre hématologique ou gastro-intestinal (2 cas de thrombopénie grade 4 et 1 cas de diarrhée grade 3). Aucune différence cliniquement significative n'a été observée entre les groupes sus et sous diaphragmatiques en termes de fréquence des DLT. A partir des DLT observées, le sponsor de l'étude et les investigateurs ont considéré la MTD2 comme atteinte à 105 mg/m². La dose recommandée pour une future phase 2 est par conséquent 90 mg/m² pour les groupes sus et sous diaphragmatiques.

3.2.2.3.2 Effets secondaires

Nous avons observé au moins un effet secondaire chez 98 % des patients traités. Des effets secondaires de grade ≥ 3 ont été observés chez 55 % des patients. Les effets secondaires hématologiques de grade ≥ 3 observés chez plus d'un patient sont la thrombopénie (n = 10, 17 %),

la lymphopénie (n = 7, 12 %) et la neutropénie (n = 2, 3 %). Le tableau ci-dessous résume les effets secondaires les plus fréquents.

Tableau 11 - Aperçu des effets secondaires fréquents (> 10 %) et de grade ≥ 3 chez plus d'un patient

	AE (>10%)	Any grade	Grade ≥3
Hematologic AEs, n (%)	Thrombocytopenia	32 (55%)	10 (17%)
	Lymphopenia	8 (14%)	7 (12%)
	Anemia	8 (14%)	0 (0%)
	Neutropenia	4 (7%)	2 (3%)
Nonhematologic AEs, n (%)	Nausea	32 (55%)	1 (2%)
	Diarrhea	29 (50%)	2 (3%)
	Asthenia	28 (48%)	3 (5%)
	Vomiting	26 (45%)	0 (0%)
	Decreased appetite	15 (26%)	2 (3%)
	Anemia	8 (14%)	0 (0%)
	Headache	8 (14%)	0 (0%)
	Constipation	7 (12%)	0 (0%)
	Dry mouth	7 (12%)	0 (0%)
	Hypokalemia	5 (9%)	4 (7%)
	Neutropenia	4 (7%)	2 (3%)
	Malignant neoplasm progression	3 (5%)	3 (5%)
	Gamma-glutamyltransferase increased	2 (3%)	2 (3%)

Les effets secondaires non hématologiques de grade ≥ 3 survenant chez plus d'un patient comprennent l'hypokaliémie (n = 4 ; 7%), l'asthénie (n = 3 ; 5%), la diarrhée (n = 2 ; 3 %), l'augmentation des gamma glutamyl transférases (GGT) (n = 2 ; 3 %) et la perte d'appétit (n =2 ; 3 %). Là aussi nous n'avons pas observé de différence notable en termes de toxicités entre les groupes sus et sous diaphragmatique. Nous avons observé des effets indésirables graves chez 12 % des patients (9 % de grade ≥ 3).Une progression de la maladie néoplasique conduisant au décès du patient a été rapportée chez 3 patients (5 %).

Six patients (10 %) ont interrompu le traitement du fait d'effets secondaires (4 pour thrombopénie, 1 pour vomissements et diarrhées, 1 pour une angiocholite). Nous n'avons pas observé de prolongation de l'intervalle QTc de garde ≥ 3 ni de garde ≥ 2 persistant plus de 14 jours (d'après la relecture centralisée de tous les ECG par un centre spécialisé). Aucun patient n'a interrompu le traitement du fait d'un allongement du QTc.

4 – DISCUSSION ET PERSPECTIVES

De nombreuses études précliniques et cliniques précoces ont montré des résultats prometteurs concernant l'effet anti tumoral des HDACi seuls ou en combinaison avec des agents de chimiothérapie en rapport avec une altération des capacités de réparation de l'ADN (20, 392, 397). Plus récemment, un nombre croissant d'études précliniques *in vitro* et *in vivo* ont montré un effet radio sensibilisant de différents HDACi dans différents types de cellules tumorales expliqué par les modifications de conformation de l'ADN ou une réduction des capacités de réparation des lésions de l'ADN lors de la combinaison d'HDACi à l'irradiation (382). *In vivo*, des études ont suggéré un effet radio sensibilisant dans différents types de tumeurs comme les cancers du sein (398, 399), les cancers colorectaux (400-402), les cancers de l'œsophage (403), les cancers gastro-intestinaux (404), les cancers de la prostate (344, 405), les cancers du poumon (392, 406), les cancers neurologiques (345, 407-410) et les tumeurs rabdomyoïdes (411). Comme les effets des HDACi semblent être dépendants à la fois du type cellulaire et du type spécifique d'HDACi utilisé (164, 412) des études complémentaires précliniques nous ont parues nécessaires pour identifier les meilleures modalités de combinaison des HDACi à la radiothérapie pour accroître les chances de succès en phase clinique. En testant *in vitro*, *in vivo* et chez l'homme l'abexinostat, un pan-HDACi à base d'acide hydroxamique récemment développé en association à la radiothérapie nous avons produit des données renforçant le rationnel pour un développement clinique de la combinaison radiothérapie-HDACi en clinique et en particulier dans les CBNPC.

Nos résultats soulignent pour la première fois l'importance de la séquence d'administration de l'abexinostat avec la radiothérapie. En effet, nous avons montré avec l'abexinostat que l'administration d'un HDACi 24 h avant l'irradiation induit un effet radio sensibilisant *in vitro* et potentialise le retard de croissance *in vivo*. Cet effet, qui n'a pas été observé lorsque l'abexinostat est débuté en concomitance immédiate avec l'irradiation, est concordant avec un mécanisme qui nécessite un temps d'exposition à la drogue permettant aux modifications épigénétiques de se mettre en place comme cela a été suggéré avec la plus part de HDACi comme le LBH589, le Vorinostat, le TSA et le NDACI054 (351, 392, 393, 399). Ces résultats sont d'une importance majeure en vue d'un transfert en clinique et justifient de débuter l'abexinostat avant l'irradiation dans les essais à venir combinant HDACi et radiothérapie.

Les tumeurs hypoxiques présentent un phénotype plus agressif souvent associé à une plus faible radiosensibilité et à une plus faible chimio sensibilité. La majorité des tumeurs humaines et en particulier les CBNPC comportent une part substantielle de cellules hypoxiques. Il est donc fondamental lorsque l'on évalue une combinaison de drogue et de radiothérapie d'évaluer non seulement l'effet radio sensibilisant en conditions normoxiques mais également en conditions hypoxiques. Saelen *et al*. ont montré *in vitro* et *in vivo* que le vorinostat majore la radiosensibilité des cellules de cancer colique et contrebalance presque leur radiosensibilité réduite en hypoxie

(402). La capacité des HDACi à réverser la radiorésistance induite par l'hypoxie pourrait être un avantage majeur pour le traitement des tumeurs hypoxiques comme les CBNPC.

La majorité des HDACi testés dans la littérature a montré un effet cytotoxique et des capacités d'induction de la mort cellulaire par apoptose, nécrose ou autophagie mais les mécanismes précis sous-jacents et la répartition entre les différents types de mort n'ont pas encore été élucidés (45). Plusieurs études ont montré que les HDACi pouvaient induire une mort par apoptose empruntant différentes voies, incluant la voie extrinsèque et la voie intrinsèque mitochondriale mais la voie prédominante reste débattue (45, 392). Toutefois, il existe des données controversées dans la littérature concernant la capacité des HDACi à induire de l'apoptose. Des données discordantes dans les études sur les cellules de CBNPC ont montré soit un effet pro apoptotique, soit une absence d'effet sur l'apoptose, selon le type d'HDACi utilisé et les lignées de cellules étudiées. Hehlgans *et al* ont montré *in vitro* un effet radio sensibilisant de l'HDACi NDAC1054 sur les cellules A549, sans augmentation de l'apoptose, alors que Geng *et al* et Zhang *et al* ont montré un effet radio sensibilisant associé à une induction d'apoptose *in vitro* dans les cellules H460 et A549, respectivement avec du LBH589 et de la trichostatine A (392, 393, 413). Dans nos travaux, nous avons évalué l'effet de l'abexinostat sur la prolifération cellulaire, la progression dans le cycle cellulaire et l'apoptose dans les cellules de CBNPC A549 et H460 (figure 26-29 et 36-40). Dans les cellules H460, le traitement par abexinostat induit une augmentation de la population cellulaire en sub G1. Cette population correspond à une augmentation de la fraction cellulaire en apoptose, comme le montre l'analyse en cytométrie de flux après marquage à l'annexine V et à l'iodure de propidium. Par ailleurs, nous n'avons pas observé de modification significative de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire (Figure 38). La réponse apoptotique induite par l'abexinostat est caspase dépendante, comme le montre l'augmentation de la caspase 3 clivée sur Western blot et la réduction significative de l'apoptose induite par l'abexinostat, lorsque l'on utilise le Z-VAD, un pan caspase inhibiteur (Figure 38,Figure 40). La voie intrinsèque de l'apoptose est activée par différents types de stress, comme les radiations ionisantes, bien que la mort radio induite, comme nous l'avons vu en introduction, se fasse majoritairement par mort mitotique ou catastrophe mitotique (45, 414). Précocement dans le phénomène d'apoptose radio induite, on note une réduction du potentiel transmembranaire mitochondrial avec une solution de continuité de la membrane mitochondriale, une externalisation des phosphatidyl sérines et un relargage du cytochrome C (protéine mitochondriale) dans le cytoplasme (45, 415). Dans nos travaux, nous avons montré que la réponse apoptotique à l'abexinostat implique et potentialise la voie intrinsèque de l'apoptose, comme l'indique la réduction du niveau de marquage au DIOC6 correspondant à la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial et au relargage du cytochrome C (Figure 39). Nos résultats suggèrent que l'abexinostat rend les cellules H460 plus susceptibles d'apoptose après irradiation et que la voie intrinsèque de l'apoptose est un mécanisme impliqué lors de la combinaison de l'abexinostat avec l'irradiation.

La réponse cellulaire à l'irradiation est caractérisée par la capacité de réparation des dommages radio induits de l'ADN et, en particulier, par l'efficacité de réparation des cassures

double brins qui jouent un rôle majeur comme nous l'avons vu en introduction (416). Un nombre croissant de publications suggèrent que les HDACi peuvent avoir un effet radio sensibilisant par inhibition des voies de réparation de l'ADN, dans différents types tumoraux et avec différents HDACi (388). Il a précédemment été montré *in vitro* que l'abexinostat, également appelé PCI-24781 ou S78454, peut inhiber la recombinaison homologue dans les cellules HCT116, en réprimant la transcription et par conséquent l'expression de Rad51, ce qui pourrait expliquer l'effet radio sensibilisant de l'abexinostat (391). Nos résultats confirment que dans les cellules H460, qui correspondent à une lignée moins radiosensible que les HCT116, l'abexinostat a également un effet radio sensibilisant. Cet effet est corrélé avec une diminution du niveau de protéine Rad51, comme le montrent nos Western blots et la diminution du nombre de foci Rad51 lorsque l'on combine l'abexinostat à l'irradiation (Figure 44). Nos travaux contribuent au faisceau de preuves montrant que les HDACi peuvent jouer un rôle important dans la modulation de la recombinaison homologue, non seulement en régulant les effecteurs de la réparation par recombinaison homologue mais également en modulant l'initiation de cette voie, par son action sur la formation des complexes de réparation de l'ADN comme le complexe MRN, qui sont considérés comme représentatifs du « réparosome » (417). Une autre approche utilisée dans la littérature pour évaluer la réparation de l'ADN consiste à évaluer l'expression des protéines de signalisation des dommages comme H2AX phosphorylée ou la formation de foci γH2AX et 53BP1. En effet, H2AX est rapidement phosphorylé sur les sites des cassures double brins et agit de concert avec 53BP1 pour signaler la présence de dommages en formant des foci nucléaires visibles en immunofluorescence au microscope (418, 419). Le mécanisme d'action précis de ces protéines reste peu clair mais la variation du nombre de foci est considérée comme représentative de l'induction et de la réparation des cassures double brins (417). Nos résultats suggèrent non seulement une diminution de la réparation des cassures double brins avec une expression prolongée des foci γH2AX et 53BP1 (conforme au données de la littérature concernant l'effet radio sensibilisant des HDACi) mais aussi une augmentation de l'induction de dommages de l'ADN, avec une augmentation du nombre de cassures double brins induites comme le montre l'augmentation des foci γH2AX et 53BP1 dès 1 heure après l'irradiation (Figure 41).

Le cancer bronchique reste la première cause de mortalité par cancer. La radio chimiothérapie est toujours le traitement standard des cancers bronchiques localement avancés non résecables (379). En dépit du rationnel fort et des données pré cliniques *in vitro* et *in vivo* prometteuses, l'utilisation des thérapies ciblées en combinaison avec la radiothérapie dans les CBNPC reste limitée faute de preuves cliniques. Plusieurs tentatives ont été conduites pour relever ce défi des combinaisons drogue-radiothérapie en phase clinique précoce dans le CBNPC. Dernièrement, en clinique, la plus part de ces études se sont focalisées sur l'utilisation d'anti EGFR et d'autres inhibiteurs de la transduction du signal, du fait de leur rôle dans diverses voies oncogéniques et du manque d'efficacité de ces agents sur des tumeurs non sélectionnées. Craignant les toxicités possibles d'une triple combinaison, l'essai de phase II randomisé RTOG 1306 évalue l'impact sur la survie sans progression de thérapies ciblées (erlotinib pour les tumeurs EGFR mutées ou crizotinib pour les tumeurs présentant la translocation ALK) avant une radio

chimiothérapie concomitante chez des patients présentant un CBNPC de stade III (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01822496). La question de la triple combinaison radiothérapie, chimiothérapie et thérapie ciblée ou autre thérapie innovante mérite une évaluation méthodique et prudente mais pourrait ouvrir la voie à de nouveaux progrès thérapeutiques, qui font cruellement défaut en particulier dans le traitement des cancers bronchiques. Les preuves reliant la modulation épigénétique et la radiosensibilité sont encore limitées et reposent principalement sur des données *in vitro* (420). Un effet synergique des anti-EGFR et des HDACi a été rapporté dans les CBNPC par Edwards *et al* qui ont montré que l'HDACi LBH 589 majore l'apoptose uniquement dans les cellules de CBNPC mutées pour EGFR (421). Toutefois, comme nous l'avons vu, nous avons montré un effet radio sensibilisant de l'abexinostat avec une potentialisation de l'apoptose radio induite sur les cellules H460, qui sont des cellules de CBNPC non mutées pour EGFR.

Quelques études *in vitro* et *in vivo* ont montré un effet synergique de la combinaison HDACi et cisplatine (422, 423). Le traitement standard des CBNPC localement avancés non opérables est la radio chimiothérapie concomitante avec un doublé de chimiothérapie intégrant un sel de platine (379). Divers doublés à base de platine ont été testés ces dernières années en concomitant de la radiothérapie et n'ont permis qu'une amélioration très modeste de la survie globale, lorsque l'on compare un doublé à un autre (424). Nos résultats montrent pour la première fois une potentialisation *in vivo* de l'effet anti tumoral de la combinaison cisplatine-radiothérapie par un HDACi. En effet, l'abexinostat majore le retard de croissance tumorale lorsque l'on utilise la triple combinaison abexinostat-cisplatine-radiothérapie par rapport à une double combinaison cisplatine-irradiation ou abexinostat-irradiation. Ces données prometteuses pourraient donc servir de base pour de plus amples investigations, pour guider le transfert en clinique des HDACi et tenter de répondre aux besoins cruciaux d'amélioration de l'efficacité de nos thérapeutiques dans les CBNPC en particulier.

Les traitements actuels des patients présentant des tumeurs solides métastatiques avancées sont essentiellement palliatifs et constituent un domaine dans lequel les progrès sont nécessaires et attendus. La radio chimiothérapie concomitante est une modalité de traitement établie pour les tumeurs solides, en particulier en vue du contrôle locorégional de la maladie (312). Toutefois, la limitation majeure de la chimiothérapie combinée à la radiothérapie est le risque de possible majoration des toxicités aigues et tardives sur les tissus sains, liées à l'un et l'autre des traitements. Il y a donc un besoin d'optimisation de la radiothérapie pour le traitement des métastases de tumeurs solides, en utilisant des combinaisons avec des agents thérapeutiques actifs et peu toxiques par eux-mêmes. L'essai thérapeutique de phase I que nous avons réalisé a été dessiné pour évaluer la toxicité et la tolérance de ce nouvel HDACi qu'est l'abexinostat, en combinaison avec la radiothérapie, dans un contexte d'évaluation de la maladie systémique métastatique, où les toxicités dépendent en partie du site irradié et sont différentes de celles des stades précoces, où la maladie est localisée (127). D'autres groupes ont déjà utilisé ce type de design d'étude, qui offre l'avantage d'une meilleure balance toxicité/sécurité lorsqu'une drogue est utilisée pour la première fois chez l'homme en combinaison à la radiothérapie (425). A l'inverse, les essais portant sur un seul type de cancer localisé traité par radiothérapie dans une intention

curative peuvent apporter plus d'informations en termes de tolérance pour un organe donné mais ce type d'essai se serait accompagné inévitablement d'un risque de toxicité majeure et définitive chez une population de patients curables, pour qui la balance bénéfice/risque devient alors très discutable.

Les études de modélisation pharmacocinétique et pharmacodynamique réalisées préalablement par l'industriel développant l'abexinostat ont permis de définir le schéma optimal d'administration de l'abexinostat, avec une dose optimale et un risque minimum de thrombopénie. Il a été montré que le schéma d'administration avec 4 jours d'abexinostat suivi de 3 jours sans (schéma dit « 4 jours on/ 3 jours off » qui est le schéma 2 de la phase I que nous avons réalisée) est associé à un risque plus faible de chute du taux de plaquettes. La dose maximale tolérée de ce schéma optimisé d'administration est de 105 mg/m² 2 fois par jour et la dose recommandée est de 90 mg/m² 2 fois par jour (426). Ces doses correspondent bien aux résultats observés dans notre étude. Nous avons fait l'hypothèse que le profil pharmacocinétique de l'abexinostat (avec une demi-vie de 4-5 heures) avec une administration biquotidienne pourrait apporter un profil de toxicité avantageux en combinaison avec la radiothérapie pour le traitement des tumeurs solides (426).

Nos données démontrent une bonne tolérance et un profil de toxicité acceptable de l'abexinostat en combinaison avec la radiothérapie hypo fractionnée palliative chez une population de patients présentant des tumeurs solides avancées. Nous n'avons pas observé de différence significative en termes de toxicités (fréquence des toxicités dose limitantes, effets secondaires) entre les groupes traités en sus et sous diaphragmatiques. La thrombopénie est l'effet secondaire hématologique le plus fréquent, présent chez 55 % des patients, mais seuls 17 % des patients ont présenté une thrombopénie de grade ≥ 3. Ces résultats sont cohérents avec ceux montrant que la thrombopénie de grade ≥ 3 est moins fréquente avec le schéma d'administration « 4 jours on /3 jours off » qu'avec un schéma délivrant 14 jours d'abexinostat/ 21 jours chez les patients traités pour des lymphomes non Hodgkinien ou des leucémies lymphoïdes chroniques (426, 427). Les toxicités non hématologiques les plus fréquemment rapportées sont nausées, diarrhée, asthénie et vomissements qui ont également été rapportés avec les autres HDACi testés chez l'homme. Les toxicités cardiaques comme l'allongement du QT/QTc ont été particulièrement étudiées car elles ont été rapportées avec certains HDACi (428, 429). Dans notre étude, avec revue centralisée des ECG nous n'avons observé aucune prolongation du QTc de grade ≥ 3. Seuls 2 patients du schéma 2 ont eu une prolongation du QTc de grade 2. Aucun patient n'a interrompu le traitement du fait d'une prolongation du QTc. Les 2 prolongations du QTc de grade 2 ont été spontanément résolutives, sans réduction de dose d'abexinostat, sans aucun symptôme et ont été considérées par les investigateurs comme probablement non reliées au traitement de l'étude. Au total, seul 10 % des patients traités ont interrompu leur traitement ce qui démontre un profil de toxicité acceptable de l'abexinostat en combinaison avec la radiothérapie.

Dans notre étude la combinaison d'abexinostat et d'une radiothérapie palliative à la dose de 30 Gy en 10 fractions a permis un taux de réponse locorégionale de 12 %, avec 5

réponses partielles et 1 réponse complète. 63 % des patients ont atteints une stabilité de la maladie sur l'évaluation locorégionale. Un suivi à plus long terme et un nombre plus important de patients sont bien évidemment nécessaires pour confirmer ces réponses. Nous n'avons pas observé de différence d'efficacité cliniquement significative entre les 2 schémas ni entre les 2 groupes sous et sus diaphragmatiques. Du fait du nombre plus important de patients inclus dans certaines cohortes de doses, nous n'avons pas pu établir de conclusion statistiquement valide sur la relation dose/réponse.

La capacité de l'abexinostat à traverser la barrière hémato-encéphalique, démontrée en préclinique par Pharmacyclics (données non publiées), est compatible avec les réponses locorégionales encourageantes observées chez les patients présentant des lésions cérébrales dans notre étude. Ceci suggère que l'abexinostat en combinaison avec la radiothérapie pourrait constituer une option intéressante pour le traitement de ces lésions. Ces résultats sont particulièrement intéressants car on note une réponse complète chez un patient présentant des lésions cérébrales non cibles et que les HDACi approuvés à l'heure actuelle (vorinostat et romidepsin) ont une efficacité modeste en monothérapie ou en combinaison avec d'autres drogues chez les patients présentant des gliomes de haut grade et des glioblastomes (430-433).

Nous avons montré un effet additif de la combinaison abexinostat et irradiation sur le retard de croissance tumorale de CBNPC humain *in vivo* sur souris nudes. Toutefois les souris nudes tolérant la greffe de tumeurs d'origine humaine sont immunodéprimées et ne constituent donc peut-être pas le modèle le plus pertinent pour évaluer et prédire les effets de la combinaison d'HDACi et radiothérapie chez l'homme. En effet, un nombre croissant de données montrent que la radiothérapie a non seulement un effet local mais aussi un effet systémique. Celui-ci est influencé par l'immunocompétence de l'hôte, via le recrutement d'effecteurs biologiques en dehors du champ d'irradiation, et les HDACi ont un effet immunomodulateur, comme nous l'avons vu en introduction (434, 435). Cette limitation liée au modèle que nous avons choisi mériterait la comparaison avec un modèle immuno compétent.

Il a été montré que les HDACi ont un effet immunomodulateur des cellules cancéreuses, en augmentant l'expression de ligands activateurs des lymphocytes NK « natural Killers », des molécules du MHC de classe I et II et des molécules CD40 (144, 146, 436). Il a également été montré que le vorinostat active la réponse immunitaire anti tumorale dans des modèles murins de cancers coliques, en induisant une mort cellulaire immunogénique (163). De plus, l'effet abscopal de la radiothérapie est médié par la réponse immunitaire, en partie via l'interleukine 12 (IL-12), les cellules dendritiques et les lymphocytes T (437-439). Par conséquent, l'effet immunomodulateur des HDACi pourrait avoir des implications intéressantes pour l'effet immunologique de la radiothérapie et mérite d'être évalué dans les futurs essais combinant les HDACi et la radiothérapie. Ces essais devront se focaliser sur un type tumoral spécifique (car la réponse immunitaire est très variable d'un type de tumeur à l'autre) et nécessitent de passer par des essais de phase I/II de méthodologie stricte, tout particulièrement si, en plus de la combinaison

abexinostat / radiothérapie, il est ajouté une chimiothérapie ou un autre immunomodulateur, comme un antiPD1 ou un antiPDL1.

A l'heure du développement explosif de l'immunothérapie et plus particulièrement de l'immuno-radiothérapie, ces possibilités de combinaisons thérapeutiques soulignent l'intérêt stratégique majeur des modulations épigénétiques dans les traitements des cancers.

Le développement récent des inhibiteurs de BET constitue également une opportunité de combinaison thérapeutique qui relance l'intérêt de la modulation épigénétique dans le traitement des cancers. En effet, les protéines BET sont constituées de 2 bromodomaines capables de « lire » l'état d'acétylation des histones et d'un domaine extra terminal (ET) et leur rôle en cancérologie est de mieux en mieux connu. Comme nous l'avons vu les mécanismes de cancérogénèse reposent non seulement sur des mutations de gènes mais également sur des anomalies de la régulation épigénétique de l'état de condensation de la chromatine limitant ou non l'accès de facteurs transcriptionnels. L'état épigénétique de la chromatine est « décodé » et « codé » par des protéines dites « readers », « writters » et « erasers » aux fonctions d'écriture, lecture et d'effacement. Les HAT et les méthyltransférases sont typiquement des protéines d'écriture épigénétique qui transfèrent des groupes acétyl ou méthyl sur les queues des histones. Les HDAC et les déméthylases sont des protéines capables « d'effacer » ces marques épigénétiques en retirant les groupes acétyl ou méthyl. Les protéines BET quant à elles, capables de lire la présence de groupes acétyl. Lorsque ces protéines « liseuses » détectent que la chromatine est sous forme active, elles permettent l'élongation transcriptionnelle via l'activation de l'ARN polymérase II.(440, 441)

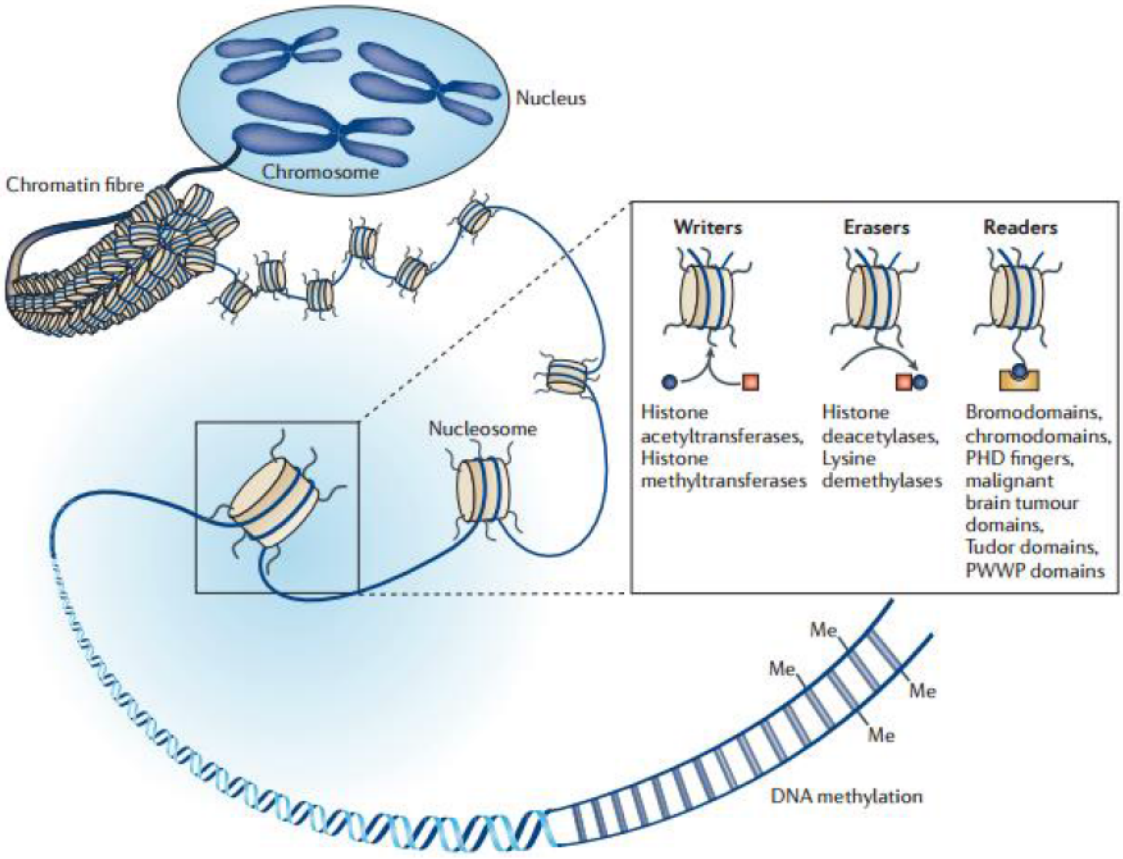


Figure 58 : Les modifications covalentes des histones et de l'ADN sont des mécanismes clé de la régulation épigénétique de l'expression des gènes (440)

Les inhibiteurs de BET miment les histones acétylés et se lient spécifiquement aux bromodomaines de BET. Ces inhibiteurs inhibent l'interaction de BET avec la chromatine. Ils agissent donc potentiellement de manière complémentaire avec les HDACi. Les effets anti tumoraux des inhibiteurs de BET ont initialement été décrits *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de cancers épidermoïdes agressifs. Ils sont à l'heure actuelle en développement clinique dans divers type de tumeurs solides et en particulier dans le traitement de tumeurs cérébrales (442). Les protéines BET BRD2, BRD3 et BRD4 sont exprimées dans la plupart des cellules de l'organisme. Par conséquent il peut y avoir des craintes sur les profils de toxicité et de tolérance de ces drogues qui sont en cours d'évaluation. L'utilisation de ces drogues en combinaison pourrait permettre de réduire la dose nécessaire et donc de réduire les risques de toxicités. La stratégie de développement clinique des inhibiteurs de BET est donc principalement une stratégie de combinaison de drogue et/ou d'agent thérapeutique. A ce jour il n'existe pas de données concernant l'association des inhibiteurs de BET à la radiothérapie mais il a été montré que les HDACi peuvent avoir un effet synergique avec les inhibiteurs de BET. En effet, la combinaison de ces deux types d'inhibiteurs a un effet synergique en termes de retard de croissance tumorale et d'induction de l'apoptose, *in vitro* et *in vivo,* dans des modèles de neuroblastome, de carcinomes pancréatiques, de carcinomes mammaires invasifs, de mélanomes et de leucémie myéloïde aigüe

(443-447). De plus, les BET inhibiteurs répriment la transcription de divers facteurs inflammatoires comme l'IL-6, le TNF-α ou l'IL-12 et certaines fonctions des cellules dendritiques et des lymphocytes T régulateurs (448). Il semble donc important d'évaluer plus en détail l'impact de l'effet immunomodulateur des inhibiteur de BET sur leur effet anti tumoral en particulier dans le cadre combinaison avec d'autres agents immunomodulateur come les HDACi et/ou la radiothérapie.

Enfin la méthodologie classique selon un design 3+3 de notre étude de phase I peut également être discutée. Comme nous l'avons vu nous avons introduit 2 schémas de traitement et 2 sous-groupes de localisations tumorales pour élargir le panel d'informations recueillies dans le cadre de cette phase I. Toutefois, avec le développement des essais de combinaison de drogues et de radiothérapie, de nouvelles questions au-delà de la simple escalade de dose de la drogue associée se posent. Les nouvelles méthodologies proposées pour l'évaluation de combinaison de deux drogues pourraient s'appliquer aux combinaisons drogue-radiothérapie (315). Dans ce contexte, une évaluation de la dose, du fractionnement ou de la séquence de radiothérapie associée à la drogue pourrait également être étudiée afin d'accroître les chances d'optimisation et de succès de nouvelles combinaisons de drogue et de radiothérapie. Une approche multidimensionnelle comme le design « PIPE » (Product of Independent beta Probabilities dose Escalation) pourrait être utilisée pour identifier les combinaisons les plus prometteuse pour de futures essais de phase II (449). PIPE est un exemple de design non paramétrique pour essais cliniques testant deux agents, dans lequel les paramètres du modèle sont les probabilités de toxicité de chacune des combinaisons de dose. Pour créer ce type de modèle, il est nécessaire d'avoir une connaissance préalable des toxicités attendues qui sont ensuite rapidement mises à jour à partir des données obtenues dans l'essai thérapeutique suivant ce design. L'autre option que l'on pourrait proposer pour une études associant de multiples drogues à la radiothérapie pour la première fois et où le recrutement des patients dans l'essai a des chances d'être régulier est un design « flip-flop ». Dans ce type de design, l'escalade de dose de chaque drogue se fait en alternant les cohortes de patients ce qui permet de continuer le recrutement des patients dans une autre cohorte pendant la phase d'observation des toxicités de la première cohorte. Le recrutement des patients s'en trouve ainsi optimisé (450).

L'identification de biomarqueurs d'efficacité de la combinaison thérapeutique est un élément clé qui peut permettre de sélectionner précocement les patients pouvant tirer bénéfice du traitement évaluer et accélérer le transfert en Clinique et les approbations nécessaires pour la mise sur le marché de la combinaison étudiée. Ces biomarqueurs peuvent également permettre l'identification de combinaisons inefficaces et/ou toxiques précocement et limiter les risques encourus par les patients (451). Peu d'études de combinaison de drogue et radiothérapie évaluent des biomarqueurs prédictifs de réponse au traitement susceptibles de guider une adaptation du choix thérapeutique dans les essais de phase précoce. Ceci représente pourtant un champ de recherche très important. L'implémentation de biomarqueurs de l'effet de la radiothérapie ou de biomarqueurs associés aux mécanismes expliquant la synergie d'une combinaison drogue-radiothérapie pourrait aider à réduire les risques d'échec des essais de phase III. Dans notre étude

de combinaison d'abexinostat et radiothérapie nous avons voulu évalué les foci H2AX comme biomarqueur *ex vivo*. L'hétérogénéité de ces foci au sein des tumeurs traitées ne nous a pas encore permis de conclure sur la faisabilité et la robustesse de l'utilisation de ce possible biomarqueur.

5 – CONCLUSION

Au total, nos données démontrent, *in vitro* et *in vivo,* une potentialisation de l'effet anti tumoral de l'irradiation par l'abexinostat dans deux modèles de CBNPC. De plus, nos travaux suggèrent pour la première fois à notre connaissance, des opportunités prometteuses de triple combinaison avec les HDACi, l'irradiation et le cisplatine qui méritent de plus amples investigations. Nos travaux pourraient donc être d'un intérêt majeur pour le traitement des CBNPC, pour lesquels il existe actuellement un besoin crucial d'amélioration d'efficacité des traitements mais où les possibilités sont restées très limitées, du fait de la toxicité des combinaisons thérapeutiques proposées jusqu'à présent.

Le traitement par abexinostat oral en combinaison avec la radiothérapie hypo fractionnée présente une activité anti tumorale, avec des réponses spécifiques locorégionales chez des patients présentant des tumeurs solides déjà préalablement lourdement traités par chirurgie et/ou chimiothérapie et/ou radiothérapie. La combinaison d'abexinostat et radiothérapie est bien tolérée. En effet, la majorité des effets secondaires observés sont de grade 1 ou 2. Bien que notre population étudiée soit peu nombreuse, les résultats positifs observés suggèrent un potentiel intéressant de cette combinaison, en particulier pour le traitement des métastases cérébrales et mérite des investigations sur une plus large population et avec un suivi à plus long terme.

Nos travaux s'inscrivent dans une stratégie de recherche translationnelle et montrent l'importance de la recherche préclinique pour les études d'association aux rayonnements ionisants. Seuls un développement préclinique rationnel et un développement clinique méthodique permettront l'émergence de combinaisons modulant la radiosensibilité tumorale de manière suffisamment efficace pour modifier nos standards de traitement et améliorer le pronostic de nos patients.

6 – REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références :

1. Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. Nature reviews Drug discovery. 2002 Apr;1(4):287-99. PubMed PMID: 12120280.

2. McCarthy N. Glioblastoma: histone mutations take the MYCN. Nature reviews Cancer. 2013 Jun;13(6):382-3. PubMed PMID: 23615692.

3. Bert SA, Robinson MD, Strbenac D, Statham AL, Song JZ, Hulf T, et al. Regional activation of the cancer genome by long-range epigenetic remodeling. Cancer cell. 2013 Jan 14;23(1):9-22. PubMed PMID: 23245995.

4. Schubeler D. Function and information content of DNA methylation. Nature. 2015 Jan 15;517(7534):321-6. PubMed PMID: 25592537.

5. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. Nature genetics. 2003 Mar;33 Suppl:245-54. PubMed PMID: 12610534.

6. Hovestadt V, Jones DT, Picelli S, Wang W, Kool M, Northcott PA, et al. Decoding the regulatory landscape of medulloblastoma using DNA methylation sequencing. Nature. 2014 Jun 26;510(7506):537-41. PubMed PMID: 24847876.

7. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. Nature reviews Genetics. 2012 Jul;13(7):484-92. PubMed PMID: 22641018.

8. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. Carcinogenesis. 2010 Jan;31(1):27-36. PubMed PMID: 19752007. Pubmed Central PMCID: 2802667.

9. Shen Z, Pardington-Purtymun PE, Comeaux JC, Moyzis RK, Chen DJ. UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins. Genomics. 1996 Sep 1;36(2):271-9. PubMed PMID: 8812453.

10. Geiss-Friedlander R, Melchior F. Concepts in sumoylation: a decade on. Nature reviews Molecular cell biology. 2007 Dec;8(12):947-56. PubMed PMID: 18000527.

11. Kee Y, Huang TT. Role of Deubiquitinating Enzymes in DNA Repair. Molecular and cellular biology. 2016 Feb;36(4):524-44. PubMed PMID: 26644404. Pubmed Central PMCID: 4751696.

12. Husnjak K, Dikic I. Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions. Annual review of biochemistry. 2012;81:291-322. PubMed PMID: 22482907.

13. Grice GL, Nathan JA. The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2016 May 2. PubMed PMID: 27137187.

14. Peth A, Uchiki T, Goldberg AL. ATP-dependent steps in the binding of ubiquitin conjugates to the 26S proteasome that commit to degradation. Molecular cell. 2010 Nov 24;40(4):671-81. PubMed PMID: 21095592. Pubmed Central PMCID: 3038635.

15. Finley D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. Annual review of biochemistry. 2009;78:477-513. PubMed PMID: 19489727. Pubmed Central PMCID: 3431160.

16. Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. Molecular oncology. 2007 Jun;1(1):19-25. PubMed PMID: 19383284.

17. Ceccacci E, Minucci S. Inhibition of histone deacetylases in cancer therapy: lessons from leukaemia. British journal of cancer. 2016 Mar 15;114(6):605-11. PubMed PMID: 26908329. Pubmed Central PMCID: 4800301.

18. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, et al. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. Cell. 2001 Oct 19;107(2):137-48. PubMed PMID: 11672522.

19. Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, et al. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. Cell. 2001 Oct 19;107(2):149-59. PubMed PMID: 11672523.

20. Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. Nature reviews Cancer. 2006 Jan;6(1):38-51. PubMed PMID: 16397526.

21. Wanga X, XW, QP, FY. Histone deacetylases and their inhibitors: molecular

mechanisms and therapeutic implications in

diabetes mellitus. Acta Pharmaceutica Sinica B. 2012;2(4):387–95.

22. Zahnow CA, Topper M, Stone M, Murray-Stewart T, Li H, Baylin SB, et al. Inhibitors of DNA Methylation, Histone Deacetylation, and Histone Demethylation: A Perfect Combination for Cancer Therapy. Advances in cancer research. 2016;130:55-111. PubMed PMID: 27037751.

23. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. Nature genetics. 1999 Feb;21(2):163-7. PubMed PMID: 9988266.

24. Dobzhansky T. Genetics of Natural Populations. Xiii. Recombination and Variability in Populations of Drosophila Pseudoobscura. Genetics. 1946 May;31(3):269-90. PubMed PMID: 17247197. Pubmed Central PMCID: 1209328.

25. Boone C, Bussey H, Andrews BJ. Exploring genetic interactions and networks with yeast. Nature reviews Genetics. 2007 Jun;8(6):437-49. PubMed PMID: 17510664.

26. Hartman JLt, Garvik B, Hartwell L. Principles for the buffering of genetic variation. Science. 2001 Feb 9;291(5506):1001-4. PubMed PMID: 11232561.

27. Kaelin WG, Jr. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. Nature reviews Cancer. 2005 Sep;5(9):689-98. PubMed PMID: 16110319.

28. Lehar J, Stockwell BR, Giaever G, Nislow C. Combination chemical genetics. Nature chemical biology. 2008 Nov;4(11):674-81. PubMed PMID: 18936752. Pubmed Central PMCID: 2712875.

29. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. Cell. 2009 Mar 6;136(5):823-37. PubMed PMID: 19269363. Pubmed Central PMCID: 2894612.

30. Hillenmeyer ME, Fung E, Wildenhain J, Pierce SE, Hoon S, Lee W, et al. The chemical genomic portrait of yeast: uncovering a phenotype for all genes. Science. 2008 Apr 18;320(5874):362-5. PubMed PMID: 18420932. Pubmed Central PMCID: 2794835.

31. Nijman SM. Synthetic lethality: general principles, utility and detection using genetic screens in human cells. FEBS letters. 2011 Jan 3;585(1):1-6. PubMed PMID: 21094158. Pubmed Central PMCID: 3018572.

32. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. Nature genetics. 2005 Apr;37(4):391-400. PubMed PMID: 15765097.

33. Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. The Prostate. 2004 May 1;59(2):177-89. PubMed PMID: 15042618.

34. Song J, Noh JH, Lee JH, Eun JW, Ahn YM, Kim SY, et al. Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. 2005 Apr;113(4):264-8. PubMed PMID: 15865607.

35. Yang XJ. The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. Nucleic acids research. 2004;32(3):959-76. PubMed PMID: 14960713. Pubmed Central PMCID: 384351.

36. Nguyen CT, Weisenberger DJ, Velicescu M, Gonzales FA, Lin JC, Liang G, et al. Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. Cancer research. 2002 Nov 15;62(22):6456-61. PubMed PMID: 12438235.

37. Valk-Lingbeek ME, Bruggeman SW, van Lohuizen M. Stem cells and cancer; the polycomb connection. Cell. 2004 Aug 20;118(4):409-18. PubMed PMID: 15315754.

38. Kondo Y, Shen L, Ahmed S, Boumber Y, Sekido Y, Haddad BR, et al. Downregulation of histone H3 lysine 9 methyltransferase G9a induces centrosome disruption and chromosome instability in cancer cells. PloS one. 2008;3(4):e2037. PubMed PMID: 18446223. Pubmed Central PMCID: 2323574.

39. Kondo Y, Shen L, Suzuki S, Kurokawa T, Masuko K, Tanaka Y, et al. Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas. Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology. 2007 Nov;37(11):974-83. PubMed PMID: 17584191.

40. Cloos PA, Christensen J, Agger K, Helin K. Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. Genes & development. 2008 May 1;22(9):1115-40. PubMed PMID: 18451103. Pubmed Central PMCID: 2732404.

41. Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. Cell. 2004 Dec 29;119(7):941-53. PubMed PMID: 15620353.

42. Metzger E, Wissmann M, Yin N, Muller JM, Schneider R, Peters AH, et al. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. Nature. 2005 Sep 15;437(7057):436-9. PubMed PMID: 16079795.

43. Shi Y. Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease. Nature reviews Genetics. 2007 Nov;8(11):829-33. PubMed PMID: 17909537.

44. Schulte JH, Lim S, Schramm A, Friedrichs N, Koster J, Versteeg R, et al. Lysine-specific demethylase 1 is strongly expressed in poorly differentiated neuroblastoma: implications for therapy. Cancer research. 2009 Mar 1;69(5):2065-71. PubMed PMID: 19223552.

45. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. Nature reviews Drug discovery. 2006 Sep;5(9):769-84. PubMed PMID: 16955068.

46. Leder A, Orkin S, Leder P. Differentiation of erythroleukemic cells in the presence of inhibitors of DNA synthesis. Science. 1975 Nov 28;190(4217):893-4. PubMed PMID: 1059262.

47. Riggs MG, Whittaker RG, Neumann JR, Ingram VM. n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. Nature. 1977 Aug 4;268(5619):462-4. PubMed PMID: 268489.

48. Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. The Journal of biological chemistry. 1990 Oct 5;265(28):17174-9. PubMed PMID: 2211619.

49. Richon VM, Emiliani S, Verdin E, Webb Y, Breslow R, Rifkind RA, et al. A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998 Mar 17;95(6):3003-7. PubMed PMID: 9501205. Pubmed Central PMCID: 19684.

50. Fischle W, Dequiedt F, Hendzel MJ, Guenther MG, Lazar MA, Voelter W, et al. Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. Molecular cell. 2002 Jan;9(1):45-57. PubMed PMID: 11804585.

51. Hu E, Dul E, Sung CM, Chen Z, Kirkpatrick R, Zhang GF, et al. Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2003 Nov;307(2):720-8. PubMed PMID: 12975486.

52. Li J, Staver MJ, Curtin ML, Holms JH, Frey RR, Edalji R, et al. Expression and functional characterization of recombinant human HDAC1 and HDAC3. Life sciences. 2004 Apr 16;74(22):2693-705. PubMed PMID: 15043985.

53. Furumai R, Matsuyama A, Kobashi N, Lee KH, Nishiyama M, Nakajima H, et al. FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. Cancer research. 2002 Sep 1;62(17):4916-21. PubMed PMID: 12208741.

54. Blagosklonny MV, Robey R, Sackett DL, Du L, Traganos F, Darzynkiewicz Z, et al. Histone deacetylase inhibitors all induce p21 but differentially cause tubulin acetylation, mitotic arrest, and cytotoxicity. Molecular cancer therapeutics. 2002 Sep;1(11):937-41. PubMed PMID: 12481415.

55. Haggarty SJ, Koeller KM, Wong JC, Grozinger CM, Schreiber SL. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003 Apr 15;100(8):4389-94. PubMed PMID: 12677000. Pubmed Central PMCID: 153564.

56. Qian DZ, Kato Y, Shabbeer S, Wei Y, Verheul HM, Salumbides B, et al. Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors: the hydroxamic acid derivative LBH589. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2006 Jan 15;12(2):634-42. PubMed PMID: 16428510.

57. Warrener R, Beamish H, Burgess A, Waterhouse NJ, Giles N, Fairlie D, et al. Tumor cell-selective cytotoxicity by targeting cell cycle checkpoints. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2003 Aug;17(11):1550-2. PubMed PMID: 12824307.

58. Dokmanovic M, Marks PA. Prospects: histone deacetylase inhibitors. Journal of cellular biochemistry. 2005 Oct 1;96(2):293-304. PubMed PMID: 16088937.

59. Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC. Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. Annual review of pharmacology and toxicology. 2005;45:495-528. PubMed PMID: 15822187.

60. Kelly WK, Marks PA. Drug insight: Histone deacetylase inhibitors--development of the new targeted anticancer agent suberoylanilide hydroxamic acid. Nature clinical practice Oncology. 2005 Mar;2(3):150-7. PubMed PMID: 16264908.

61. Kelly WK, O'Connor OA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials. Expert opinion on investigational drugs. 2002 Dec;11(12):1695-713. PubMed PMID: 12457432.

62. Belka C, Jendrossek V, Pruschy M, Vink S, Verheij M, Budach W. Apoptosis-modulating agents in combination with radiotherapy-current status and outlook. International journal of radiation oncology, biology, physics. 2004 Feb 1;58(2):542-54. PubMed PMID: 14751526.

63. Eriksson D, Stigbrand T. Radiation-induced cell death mechanisms. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. 2010 Aug;31(4):363-72. PubMed PMID: 20490962.

64. Guan B, Yue P, Clayman GL, Sun SY. Evidence that the death receptor DR4 is a DNA damage-inducible, p53-regulated gene. Journal of cellular physiology. 2001 Jul;188(1):98-105. PubMed PMID: 11382926.

65. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. Journal of cell science. 2003 Oct 15;116(Pt 20):4077-85. PubMed PMID: 12972501.

66. Salvesen GS, Walsh CM. Functions of caspase 8: the identified and the mysterious. Seminars in immunology. 2014 Jun;26(3):246-52. PubMed PMID: 24856110. Pubmed Central PMCID: 4099255.

67. Anilkumar TV, Sarraf CE, Alison MR. The biology and pathology of programmed cell death (apoptosis). Veterinary and human toxicology. 1992 Jun;34(3):251-4. PubMed PMID: 1609501.

68. Stennicke HR, Salvesen GS. Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. Biochimica et biophysica acta. 2000 Mar 7;1477(1-2):299-306. PubMed PMID: 10708865.

69. Insinga A, Monestiroli S, Ronzoni S, Gelmetti V, Marchesi F, Viale A, et al. Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. Nature medicine. 2005 Jan;11(1):71-6. PubMed PMID: 15619634.

70. Willis SN, Adams JM. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. Current opinion in cell biology. 2005 Dec;17(6):617-25. PubMed PMID: 16243507. Pubmed Central PMCID: 2930980.

71. Ruefli AA, Ausserlechner MJ, Bernhard D, Sutton VR, Tainton KM, Kofler R, et al. The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001 Sep 11;98(19):10833-8. PubMed PMID: 11535817. Pubmed Central PMCID: 58560.

72. Mitsiades N, Mitsiades CS, Richardson PG, McMullan C, Poulaki V, Fanourakis G, et al. Molecular sequelae of histone deacetylase inhibition in human malignant B cells. Blood. 2003 May 15;101(10):4055-62. PubMed PMID: 12531799.

73. Peart MJ, Tainton KM, Ruefli AA, Dear AE, Sedelies KA, O'Reilly LA, et al. Novel mechanisms of apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors. Cancer research. 2003 Aug 1;63(15):4460-71. PubMed PMID: 12907619.

74. Zhang Y, Adachi M, Kawamura R, Imai K. Bmf is a possible mediator in histone deacetylase inhibitors FK228 and CBHA-induced apoptosis. Cell death and differentiation. 2006 Jan;13(1):129-40. PubMed PMID: 15947789.

75. Zhao Y, Tan J, Zhuang L, Jiang X, Liu ET, Yu Q. Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005 Nov 1;102(44):16090-5. PubMed PMID: 16243973. Pubmed Central PMCID: 1276064.

76. Rosato RR, Almenara JA, Grant S. The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21CIP1/WAF1 1. Cancer research. 2003 Jul 1;63(13):3637-45. PubMed PMID: 12839953.

77. Sade H, Sarin A. Reactive oxygen species regulate quiescent T-cell apoptosis via the BH3-only proapoptotic protein BIM. Cell death and differentiation. 2004 Apr;11(4):416-23. PubMed PMID: 14713957.

78. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. Nature reviews Cancer. 2009 Mar;9(3):153-66. PubMed PMID: 19238148.

79. Hochegger H, Takeda S, Hunt T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? Nature reviews Molecular cell biology. 2008 Nov;9(11):910-6. PubMed PMID: 18813291.

80. Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. Nature reviews Cancer. 2004 Jun;4(6):437-47. PubMed PMID: 15170446.

81. Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. Oncogene. 2004 Apr 12;23(16):2825-37. PubMed PMID: 15077146.

82. Santamaria D, Barriere C, Cerqueira A, Hunt S, Tardy C, Newton K, et al. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. Nature. 2007 Aug 16;448(7155):811-5. PubMed PMID: 17700700.

83. Bartek J, Lukas C, Lukas J. Checking on DNA damage in S phase. Nature reviews Molecular cell biology. 2004 Oct;5(10):792-804. PubMed PMID: 15459660.

84. Antoni L, Sodha N, Collins I, Garrett MD. CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy - two sides of the same coin? Nature reviews Cancer. 2007 Dec;7(12):925-36. PubMed PMID: 18004398.

85. Carrassa L, Damia G. Unleashing Chk1 in cancer therapy. Cell cycle. 2011 Jul 1;10(13):2121-8. PubMed PMID: 21610326.

86. Jung J, Lee JS, Dickson MA, Schwartz GK, Le Cesne A, Varga A, et al. TP53 mutations emerge with HDM2 inhibitor SAR405838 treatment in de-differentiated liposarcoma. Nature communications. 2016;7:12609. PubMed PMID: 27576846.

87. Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. Advances in cancer research. 2000;77:81-137. PubMed PMID: 10549356.

88. Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. Genes & development. 1993 Jul;7(7A):1126-32. PubMed PMID: 8319905.

89. Curtin NJ. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. Nature reviews Cancer. 2012 Dec;12(12):801-17. PubMed PMID: 23175119.

90. Stolz A, Ertych N, Bastians H. Tumor suppressor CHK2: regulator of DNA damage response and mediator of chromosomal stability. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2011 Feb 1;17(3):401-5. PubMed PMID: 21088254.

91. Marks PA, Miller T, Richon VM. Histone deacetylases. Current opinion in pharmacology. 2003 Aug;3(4):344-51. PubMed PMID: 12901942.

92. Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. Nature reviews Cancer. 2001 Dec;1(3):194-202. PubMed PMID: 11902574.

93. Marks PA, Richon VM, Rifkind RA. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. Journal of the National Cancer Institute. 2000 Aug 2;92(15):1210-6. PubMed PMID: 10922406.

94. Gabrielli BG, Johnstone RW, Saunders NA. Identifying molecular targets mediating the anticancer activity of histone deacetylase inhibitors: a work in progress. Current cancer drug targets. 2002 Dec;2(4):337-53. PubMed PMID: 12470210.

95. Vrana JA, Decker RH, Johnson CR, Wang Z, Jarvis WD, Richon VM, et al. Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) proceeds through pathways that are regulated by Bcl-2/Bcl-XL, c-Jun, and p21CIP1, but independent of p53. Oncogene. 1999 Nov 25;18(50):7016-25. PubMed PMID: 10597302.

96. Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000 Aug 29;97(18):10014-9. PubMed PMID: 10954755. Pubmed Central PMCID: 27656.

97. Kim YB, Lee KH, Sugita K, Yoshida M, Horinouchi S. Oxamflatin is a novel antitumor compound that inhibits mammalian histone deacetylase. Oncogene. 1999 Apr 15;18(15):2461-70. PubMed PMID: 10229197.

98. Qiu L, Burgess A, Fairlie DP, Leonard H, Parsons PG, Gabrielli BG. Histone deacetylase inhibitors trigger a G2 checkpoint in normal cells that is defective in tumor cells. Molecular biology of the cell. 2000 Jun;11(6):2069-83. PubMed PMID: 10848630. Pubmed Central PMCID: 14904.

99. Sandor V, Senderowicz A, Mertins S, Sackett D, Sausville E, Blagosklonny MV, et al. P21-dependent g(1)arrest with downregulation of cyclin D1 and upregulation of cyclin E by the histone

deacetylase inhibitor FR901228. British journal of cancer. 2000 Sep;83(6):817-25. PubMed PMID: 10952788. Pubmed Central PMCID: 2363539.

100. Glaser KB, Staver MJ, Waring JF, Stender J, Ulrich RG, Davidsen SK. Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. Molecular cancer therapeutics. 2003 Feb;2(2):151-63. PubMed PMID: 12589032.

101. Chen Z, Clark S, Birkeland M, Sung CM, Lago A, Liu R, et al. Induction and superinduction of growth arrest and DNA damage gene 45 (GADD45) alpha and beta messenger RNAs by histone deacetylase inhibitors trichostatin A (TSA) and butyrate in SW620 human colon carcinoma cells. Cancer letters. 2002 Dec 15;188(1-2):127-40. PubMed PMID: 12406558.

102. Jaboin J, Wild J, Hamidi H, Khanna C, Kim CJ, Robey R, et al. MS-27-275, an inhibitor of histone deacetylase, has marked in vitro and in vivo antitumor activity against pediatric solid tumors. Cancer research. 2002 Nov 1;62(21):6108-15. PubMed PMID: 12414635.

103. Burgess AJ, Pavey S, Warrener R, Hunter LJ, Piva TJ, Musgrove EA, et al. Up-regulation of p21(WAF1/CIP1) by histone deacetylase inhibitors reduces their cytotoxicity. Molecular pharmacology. 2001 Oct;60(4):828-37. PubMed PMID: 11562446.

104. Taddei A, Roche D, Bickmore WA, Almouzni G. The effects of histone deacetylase inhibitors on heterochromatin: implications for anticancer therapy? EMBO reports. 2005 Jun;6(6):520-4. PubMed PMID: 15940285. Pubmed Central PMCID: 1369099.

105. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. The New England journal of medicine. 1971 Nov 18;285(21):1182-6. PubMed PMID: 4938153.

106. Seiwert TY, Cohen EE. Targeting angiogenesis in head and neck cancer. Seminars in oncology. 2008 Jun;35(3):274-85. PubMed PMID: 18544442.

107. Harris AL. Antiangiogenesis for cancer therapy. Lancet. 1997 May;349 Suppl 2:SII13-5. PubMed PMID: 9164441.

108. Hinnen P, Eskens FA. Vascular disrupting agents in clinical development. Br J Cancer. 2007 Apr 23;96(8):1159-65. PubMed PMID: 17375046.

109. Siemann DW, Bibby MC, Dark GG, Dicker AP, Eskens FA, Horsman MR, et al. Differentiation and definition of vascular-targeted therapies. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2005 Jan 15;11(2 Pt 1):416-20. PubMed PMID: 15701823.

110. O'Reilly MS. Radiation combined with antiangiogenic and antivascular agents. Semin Radiat Oncol. 2006 Jan;16(1):45-50. PubMed PMID: 16378906.

111. Deroanne CF, Bonjean K, Servotte S, Devy L, Colige A, Clausse N, et al. Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. Oncogene. 2002 Jan 17;21(3):427-36. PubMed PMID: 11821955.

112. Michaelis M, Michaelis UR, Fleming I, Suhan T, Cinatl J, Blaheta RA, et al. Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. Molecular pharmacology. 2004 Mar;65(3):520-7. PubMed PMID: 14978230.

113. Pili R, Kruszewski MP, Hager BW, Lantz J, Carducci MA. Combination of phenylbutyrate and 13-cis retinoic acid inhibits prostate tumor growth and angiogenesis. Cancer research. 2001 Feb 15;61(4):1477-85. PubMed PMID: 11245454.

114. Rossig L, Li H, Fisslthaler B, Urbich C, Fleming I, Forstermann U, et al. Inhibitors of histone deacetylation downregulate the expression of endothelial nitric oxide synthase and compromise endothelial cell function in vasorelaxation and angiogenesis. Circulation research. 2002 Nov 1;91(9):837-44. PubMed PMID: 12411399.

115. Sasakawa Y, Naoe Y, Noto T, Inoue T, Sasakawa T, Matsuo M, et al. Antitumor efficacy of FK228, a novel histone deacetylase inhibitor, depends on the effect on expression of angiogenesis factors. Biochemical pharmacology. 2003 Sep 15;66(6):897-906. PubMed PMID: 12963476.

116. Crazzolara R, Johrer K, Johnstone RW, Greil R, Kofler R, Meister B, et al. Histone deacetylase inhibitors potently repress CXCR4 chemokine receptor expression and function in acute lymphoblastic leukaemia. British journal of haematology. 2002 Dec;119(4):965-9. PubMed PMID: 12472574.

117. Kim SH, Ahn S, Han JW, Lee HW, Lee HY, Lee YW, et al. Apicidin is a histone deacetylase inhibitor with anti-invasive and anti-angiogenic potentials. Biochemical and biophysical research communications. 2004 Mar 19;315(4):964-70. PubMed PMID: 14985106.

118. Klisovic DD, Klisovic MI, Effron D, Liu S, Marcucci G, Katz SE. Depsipeptide inhibits migration of primary and metastatic uveal melanoma cell lines in vitro: a potential strategy for uveal melanoma. Melanoma research. 2005 Jun;15(3):147-53. PubMed PMID: 15917695.

119. Liu LT, Chang HC, Chiang LC, Hung WC. Histone deacetylase inhibitor up-regulates RECK to inhibit MMP-2 activation and cancer cell invasion. Cancer research. 2003 Jun 15;63(12):3069-72. PubMed PMID: 12810630.

120. Coradini D, Zorzet S, Rossin R, Scarlata I, Pellizzaro C, Turrin C, et al. Inhibition of hepatocellular carcinomas in vitro and hepatic metastases in vivo in mice by the histone deacetylase inhibitor HA-But. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2004 Jul 15;10(14):4822-30. PubMed PMID: 15269158.

121. Lin KT, Wang YW, Chen CT, Ho CM, Su WH, Jou YS. HDAC inhibitors augmented cell migration and metastasis through induction of PKCs leading to identification of low toxicity modalities for combination cancer therapy. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2012 Sep 1;18(17):4691-701. PubMed PMID: 22811583.

122. Yamamoto N, Yang M, Jiang P, Xu M, Tsuchiya H, Tomita K, et al. Determination of clonality of metastasis by cell-specific color-coded fluorescent-protein imaging. Cancer research. 2003 Nov 15;63(22):7785-90. PubMed PMID: 14633704.

123. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. Cell. 2010 Mar 19;140(6):883-99. PubMed PMID: 20303878. Pubmed Central PMCID: 2866629.

124. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. Annual review of immunology. 2004;22:329-60. PubMed PMID: 15032581.

125. Gajewski TF, Meng Y, Blank C, Brown I, Kacha A, Kline J, et al. Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment. Immunological reviews. 2006 Oct;213:131-45. PubMed PMID: 16972901.

126. Gajewski TF, Fuertes M, Spaapen R, Zheng Y, Kline J. Molecular profiling to identify relevant immune resistance mechanisms in the tumor microenvironment. Current opinion in immunology. 2011 Apr;23(2):286-92. PubMed PMID: 21185705. Pubmed Central PMCID: 3070788.

127. Deutsch E, Levy A, Chargari C. [Radiation therapy and immunomodulation: Focus on experimental data]. Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique. 2015 Oct;19(6-7):515-8. PubMed PMID: 26293415. Radiotherapie et immunomodulation : mise au point sur les donnees experimentales.

128. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. Advances in immunology. 2000;74:181-273. PubMed PMID: 10605607.

129. Ferris RL, Jaffee EM, Ferrone S. Tumor antigen-targeted, monoclonal antibody-based immunotherapy: clinical response, cellular immunity, and immunoescape. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2010 Oct 1;28(28):4390-9. PubMed PMID: 20697078. Pubmed Central PMCID: 2954137.

130. Sanda MG, Restifo NP, Walsh JC, Kawakami Y, Nelson WG, Pardoll DM, et al. Molecular characterization of defective antigen processing in human prostate cancer. Journal of the National Cancer Institute. 1995 Feb 15;87(4):280-5. PubMed PMID: 7707419. Pubmed Central PMCID: 2104544.

131. Osada T, Chong G, Tansik R, Hong T, Spector N, Kumar R, et al. The effect of anti-VEGF therapy on immature myeloid cell and dendritic cells in cancer patients. Cancer immunology, immunotherapy : CII. 2008 Aug;57(8):1115-24. PubMed PMID: 18193223. Pubmed Central PMCID: 4110970.

132. Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. Cell. 2010 Mar 19;140(6):798-804. PubMed PMID: 20303871.

133. Gordon S. Alternative activation of macrophages. Nature reviews Immunology. 2003 Jan;3(1):23-35. PubMed PMID: 12511873.

134. Van Der Bruggen P, Zhang Y, Chaux P, Stroobant V, Panichelli C, Schultz ES, et al. Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells. Immunological reviews. 2002 Oct;188:51-64. PubMed PMID: 12445281.

135. Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, et al. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. Nature medicine. 1999 Apr;5(4):405-11. PubMed PMID: 10202929.

136. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. Human T cell responses against melanoma. Annual review of immunology. 2006;24:175-208. PubMed PMID: 16551247.

137. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. Nature medicine. 2007 Sep;13(9):1050-9. PubMed PMID: 17704786.

138. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. Nature medicine. 2009 Oct;15(10):1170-8. PubMed PMID: 19767732.

139. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. Nature medicine. 2007 Jan;13(1):54-61. PubMed PMID: 17187072.

140. Pere H, Tanchot C, Bayry J, Terme M, Taieb J, Badoual C, et al. Comprehensive analysis of current approaches to inhibit regulatory T cells in cancer. Oncoimmunology. 2012 May 1;1(3):326-33. PubMed PMID: 22737608. Pubmed Central PMCID: 3382865.

141. Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2009 Jan 10;27(2):186-92. PubMed PMID: 19064967.

142. Kao J, Ko EC, Eisenstein S, Sikora AG, Fu S, Chen SH. Targeting immune suppressing myeloid-derived suppressor cells in oncology. Critical reviews in oncology/hematology. 2011 Jan;77(1):12-9. PubMed PMID: 20304669. Pubmed Central PMCID: 2927714.

143. Maeda T, Towatari M, Kosugi H, Saito H. Up-regulation of costimulatory/adhesion molecules by histone deacetylase inhibitors in acute myeloid leukemia cells. Blood. 2000 Dec 1;96(12):3847-56. PubMed PMID: 11090069.

144. Magner WJ, Kazim AL, Stewart C, Romano MA, Catalano G, Grande C, et al. Activation of MHC class I, II, and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors. Journal of immunology. 2000 Dec 15;165(12):7017-24. PubMed PMID: 11120829.

145. Armeanu S, Bitzer M, Lauer UM, Venturelli S, Pathil A, Krusch M, et al. Natural killer cell-mediated lysis of hepatoma cells via specific induction of NKG2D ligands by the histone deacetylase inhibitor sodium valproate. Cancer research. 2005 Jul 15;65(14):6321-9. PubMed PMID: 16024634.

146. Skov S, Pedersen MT, Andresen L, Straten PT, Woetmann A, Odum N. Cancer cells become susceptible to natural killer cell killing after exposure to histone deacetylase inhibitors due to glycogen synthase kinase-3-dependent expression of MHC class I-related chain A and B. Cancer research. 2005 Dec 1;65(23):11136-45. PubMed PMID: 16322264.

147. Reddy P, Maeda Y, Hotary K, Liu C, Reznikov LL, Dinarello CA, et al. Histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid reduces acute graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia effect. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004 Mar 16;101(11):3921-6. PubMed PMID: 15001702. Pubmed Central PMCID: 374345.

148. Nusinzon I, Horvath CM. Interferon-stimulated transcription and innate antiviral immunity require deacetylase activity and histone deacetylase 1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003 Dec 9;100(25):14742-7. PubMed PMID: 14645718. Pubmed Central PMCID: 299790.

149. Yuan ZL, Guan YJ, Chatterjee D, Chin YE. Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. Science. 2005 Jan 14;307(5707):269-73. PubMed PMID: 15653507.

150. Chen L, Fischle W, Verdin E, Greene WC. Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. Science. 2001 Aug 31;293(5535):1653-7. PubMed PMID: 11533489.

151. Tao R, de Zoeten EF, Ozkaynak E, Chen C, Wang L, Porrett PM, et al. Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells. Nature medicine. 2007 Nov;13(11):1299-307. PubMed PMID: 17922010.

152. Lee SC, Bottaro A, Insel RA. Activation of terminal B cell differentiation by inhibition of histone deacetylation. Molecular immunology. 2003 May;39(15):923-32. PubMed PMID: 12695118.

153. Kienzler AK, Rizzi M, Reith M, Nutt SL, Eibel H. Inhibition of human B-cell development into plasmablasts by histone deacetylase inhibitor valproic acid. The Journal of allergy and clinical immunology. 2013 Jun;131(6):1695-9. PubMed PMID: 23465661.

154. Lucas JL, Mirshahpanah P, Haas-Stapleton E, Asadullah K, Zollner TM, Numerof RP. Induction of Foxp3+ regulatory T cells with histone deacetylase inhibitors. Cellular immunology. 2009;257(1-2):97-104. PubMed PMID: 19358983.

155. van Loosdregt J, Vercoulen Y, Guichelaar T, Gent YY, Beekman JM, van Beekum O, et al. Regulation of Treg functionality by acetylation-mediated Foxp3 protein stabilization. Blood. 2010 Feb 4;115(5):965-74. PubMed PMID: 19996091.

156. de Zoeten EF, Wang L, Butler K, Beier UH, Akimova T, Sai H, et al. Histone deacetylase 6 and heat shock protein 90 control the functions of Foxp3(+) T-regulatory cells. Molecular and cellular biology. 2011 May;31(10):2066-78. PubMed PMID: 21444725. Pubmed Central PMCID: 3133361.

157. de Zoeten EF, Wang L, Sai H, Dillmann WH, Hancock WW. Inhibition of HDAC9 increases T regulatory cell function and prevents colitis in mice. Gastroenterology. 2010 Feb;138(2):583-94. PubMed PMID: 19879272. Pubmed Central PMCID: 3369426.

158. Akimova T, Ge G, Golovina T, Mikheeva T, Wang L, Riley JL, et al. Histone/protein deacetylase inhibitors increase suppressive functions of human FOXP3+ Tregs. Clinical immunology. 2010 Sep;136(3):348-63. PubMed PMID: 20478744. Pubmed Central PMCID: 2917523.

159. Shen L, Ciesielski M, Ramakrishnan S, Miles KM, Ellis L, Sotomayor P, et al. Class I histone deacetylase inhibitor entinostat suppresses regulatory T cells and enhances immunotherapies in renal and prostate cancer models. PloS one. 2012;7(1):e30815. PubMed PMID: 22303460. Pubmed Central PMCID: 3267747.

160. Shen L, Pili R. Class I histone deacetylase inhibition is a novel mechanism to target regulatory T cells in immunotherapy. Oncoimmunology. 2012 Sep 1;1(6):948-50. PubMed PMID: 23162767. Pubmed Central PMCID: 3489755.

161. Shen L, Orillion A, Pili R. Histone deacetylase inhibitors as immunomodulators in cancer therapeutics. Epigenomics. 2016 Mar;8(3):415-28. PubMed PMID: 26950532.

162. Wang L, Liu Y, Han R, Beier UH, Bhatti TR, Akimova T, et al. FOXP3+ regulatory T cell development and function require histone/protein deacetylase 3. The Journal of clinical

investigation. 2015 Mar 2;125(3):1111-23. PubMed PMID: 25642770. Pubmed Central PMCID: 4362235.

163. West AC, Mattarollo SR, Shortt J, Cluse LA, Christiansen AJ, Smyth MJ, et al. An intact immune system is required for the anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. Cancer research. 2013 Dec 15;73(24):7265-76. PubMed PMID: 24158093.

164. Bhalla KN. Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of hematologic malignancies. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2005 Jun 10;23(17):3971-93. PubMed PMID: 15897549.

165. Jabbour EJ, Giles FJ. New agents in myelodysplastic syndromes. Current hematology reports. 2005 May;4(3):191-9. PubMed PMID: 15865871.

166. Cote S, Rosenauer A, Bianchini A, Seiter K, Vandewiele J, Nervi C, et al. Response to histone deacetylase inhibition of novel PML/RARalpha mutants detected in retinoic acid-resistant APL cells. Blood. 2002 Oct 1;100(7):2586-96. PubMed PMID: 12239173.

167. He LZ, Tolentino T, Grayson P, Zhong S, Warrell RP, Jr., Rifkind RA, et al. Histone deacetylase inhibitors induce remission in transgenic models of therapy-resistant acute promyelocytic leukemia. The Journal of clinical investigation. 2001 Nov;108(9):1321-30. PubMed PMID: 11696577. Pubmed Central PMCID: 209432.

168. Warrell RP, Jr., He LZ, Richon V, Calleja E, Pandolfi PP. Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase. Journal of the National Cancer Institute. 1998 Nov 4;90(21):1621-5. PubMed PMID: 9811311.

169. Reynolds CP, Lemons RS. Retinoid therapy of childhood cancer. Hematology/oncology clinics of North America. 2001 Oct;15(5):867-910. PubMed PMID: 11765378.

170. Coffey DC, Kutko MC, Glick RD, Butler LM, Heller G, Rifkind RA, et al. The histone deacetylase inhibitor, CBHA, inhibits growth of human neuroblastoma xenografts in vivo, alone and synergistically with all-trans retinoic acid. Cancer research. 2001 May 1;61(9):3591-4. PubMed PMID: 11325825.

171. Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. Nature genetics. 1999 Jan;21(1):103-7. PubMed PMID: 9916800.

172. Gore SD, Baylin S, Sugar E, Carraway H, Miller CB, Carducci M, et al. Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. Cancer research. 2006 Jun 15;66(12):6361-9. PubMed PMID: 16778214.

173. Fuino L, Bali P, Wittmann S, Donapaty S, Guo F, Yamaguchi H, et al. Histone deacetylase inhibitor LAQ824 down-regulates Her-2 and sensitizes human breast cancer cells to trastuzumab, taxotere, gemcitabine, and epothilone B. Molecular cancer therapeutics. 2003 Oct;2(10):971-84. PubMed PMID: 14578462.

174. Kim MS, Blake M, Baek JH, Kohlhagen G, Pommier Y, Carrier F. Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. Cancer research. 2003 Nov 1;63(21):7291-300. PubMed PMID: 14612526.

175. Catley L, Weisberg E, Tai YT, Atadja P, Remiszewski S, Hideshima T, et al. NVP-LAQ824 is a potent novel histone deacetylase inhibitor with significant activity against multiple myeloma. Blood. 2003 Oct 1;102(7):2615-22. PubMed PMID: 12816865.

176. Chauhan D, Hideshima T, Rosen S, Reed JC, Kharbanda S, Anderson KC. Apaf-1/cytochrome c-independent and Smac-dependent induction of apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. The Journal of biological chemistry. 2001 Jul 6;276(27):24453-6. PubMed PMID: 11356822.

177. Loprevite M, Tiseo M, Grossi F, Scolaro T, Semino C, Pandolfi A, et al. In vitro study of CI-994, a histone deacetylase inhibitor, in non-small cell lung cancer cell lines. Oncology research. 2005;15(1):39-48. PubMed PMID: 15839304.

178. Pauer LR, Olivares J, Cunningham C, Williams A, Grove W, Kraker A, et al. Phase I study of oral CI-994 in combination with carboplatin and paclitaxel in the treatment of patients with advanced solid tumors. Cancer investigation. 2004;22(6):886-96. PubMed PMID: 15641487.

179. Richards DA, Boehm KA, Waterhouse DM, Wagener DJ, Krishnamurthi SS, Rosemurgy A, et al. Gemcitabine plus CI-994 offers no advantage over gemcitabine alone in the treatment of patients with advanced pancreatic cancer: results of a phase II randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO. 2006 Jul;17(7):1096-102. PubMed PMID: 16641168.

180. Nakata S, Yoshida T, Horinaka M, Shiraishi T, Wakada M, Sakai T. Histone deacetylase inhibitors upregulate death receptor 5/TRAIL-R2 and sensitize apoptosis induced by TRAIL/APO2-L in human malignant tumor cells. Oncogene. 2004 Aug 19;23(37):6261-71. PubMed PMID: 15208660.

181. Zhang XD, Gillespie SK, Borrow JM, Hersey P. The histone deacetylase inhibitor suberic bishydroxamate regulates the expression of multiple apoptotic mediators and induces mitochondria-dependent apoptosis of melanoma cells. Molecular cancer therapeutics. 2004 Apr;3(4):425-35. PubMed PMID: 15078986.

182. Inoue S, MacFarlane M, Harper N, Wheat LM, Dyer MJ, Cohen GM. Histone deacetylase inhibitors potentiate TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in lymphoid malignancies. Cell death and differentiation. 2004 Dec;11 Suppl 2:S193-206. PubMed PMID: 15608694.

183. Rosato RR, Almenara JA, Dai Y, Grant S. Simultaneous activation of the intrinsic and extrinsic pathways by histone deacetylase (HDAC) inhibitors and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) synergistically induces mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells. Molecular cancer therapeutics. 2003 Dec;2(12):1273-84. PubMed PMID: 14707268.

184. Guo F, Sigua C, Tao J, Bali P, George P, Li Y, et al. Cotreatment with histone deacetylase inhibitor LAQ824 enhances Apo-2L/tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-induced death inducing signaling complex activity and apoptosis of human acute leukemia cells. Cancer research. 2004 Apr 1;64(7):2580-9. PubMed PMID: 15059915.

185. Singh TR, Shankar S, Srivastava RK. HDAC inhibitors enhance the apoptosis-inducing potential of TRAIL in breast carcinoma. Oncogene. 2005 Jul 7;24(29):4609-23. PubMed PMID: 15897906.

186. Watanabe K, Okamoto K, Yonehara S. Sensitization of osteosarcoma cells to death receptor-mediated apoptosis by HDAC inhibitors through downregulation of cellular FLIP. Cell death and differentiation. 2005 Jan;12(1):10-8. PubMed PMID: 15540114.

187. Kim EH, Kim HS, Kim SU, Noh EJ, Lee JS, Choi KS. Sodium butyrate sensitizes human glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis through inhibition of Cdc2 and the subsequent downregulation of survivin and XIAP. Oncogene. 2005 Oct 20;24(46):6877-89. PubMed PMID: 16007142.

188. Earel JK, Jr., VanOosten RL, Griffith TS. Histone deacetylase inhibitors modulate the sensitivity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-resistant bladder tumor cells. Cancer research. 2006 Jan 1;66(1):499-507. PubMed PMID: 16397266.

189. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. Blood. 2005 Apr 1;105(7):2640-53. PubMed PMID: 15618470.

190. Nimmanapalli R, Fuino L, Bali P, Gasparetto M, Glozak M, Tao J, et al. Histone deacetylase inhibitor LAQ824 both lowers expression and promotes proteasomal degradation of Bcr-Abl and induces apoptosis of imatinib mesylate-sensitive or -refractory chronic myelogenous leukemia-blast crisis cells. Cancer research. 2003 Aug 15;63(16):5126-35. PubMed PMID: 12941844.

191. Nimmanapalli R, Fuino L, Stobaugh C, Richon V, Bhalla K. Cotreatment with the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) enhances imatinib-induced

apoptosis of Bcr-Abl-positive human acute leukemia cells. Blood. 2003 Apr 15;101(8):3236-9. PubMed PMID: 12446442.

192. Yu C, Rahmani M, Almenara J, Subler M, Krystal G, Conrad D, et al. Histone deacetylase inhibitors promote STI571-mediated apoptosis in STI571-sensitive and -resistant Bcr/Abl+ human myeloid leukemia cells. Cancer research. 2003 May 1;63(9):2118-26. PubMed PMID: 12727828.

193. George P, Bali P, Annavarapu S, Scuto A, Fiskus W, Guo F, et al. Combination of the histone deacetylase inhibitor LBH589 and the hsp90 inhibitor 17-AAG is highly active against human CML-BC cells and AML cells with activating mutation of FLT-3. Blood. 2005 Feb 15;105(4):1768-76. PubMed PMID: 15514006.

194. Kawano T, Horiguchi-Yamada J, Iwase S, Akiyama M, Furukawa Y, Kan Y, et al. Depsipeptide enhances imatinib mesylate-induced apoptosis of Bcr-Abl-positive cells and ectopic expression of cyclin D1, c-Myc or active MEK abrogates this effect. Anticancer research. 2004 Sep-Oct;24(5A):2705-12. PubMed PMID: 15517875.

195. Kim JS, Jeung HK, Cheong JW, Maeng H, Lee ST, Hahn JS, et al. Apicidin potentiates the imatinib-induced apoptosis of Bcr-Abl-positive human leukaemia cells by enhancing the activation of mitochondria-dependent caspase cascades. British journal of haematology. 2004 Jan;124(2):166-78. PubMed PMID: 14687026.

196. Rahmani M, Reese E, Dai Y, Bauer C, Kramer LB, Huang M, et al. Cotreatment with suberanoylanilide hydroxamic acid and 17-allylamino 17-demethoxygeldanamycin synergistically induces apoptosis in Bcr-Abl+ Cells sensitive and resistant to STI571 (imatinib mesylate) in association with down-regulation of Bcr-Abl, abrogation of signal transducer and activator of transcription 5 activity, and Bax conformational change. Molecular pharmacology. 2005 Apr;67(4):1166-76. PubMed PMID: 15625278.

197. Rahmani M, Yu C, Dai Y, Reese E, Ahmed W, Dent P, et al. Coadministration of the heat shock protein 90 antagonist 17-allylamino- 17-demethoxygeldanamycin with suberoylanilide hydroxamic acid or sodium butyrate synergistically induces apoptosis in human leukemia cells. Cancer research. 2003 Dec 1;63(23):8420-7. PubMed PMID: 14679005.

198. Wang X, Ju W, Renouard J, Aden J, Belinsky SA, Lin Y. 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin synergistically potentiates tumor necrosis factor-induced lung cancer cell death by blocking the nuclear factor-kappaB pathway. Cancer research. 2006 Jan 15;66(2):1089-95. PubMed PMID: 16424045.

199. Hideshima T, Bradner JE, Wong J, Chauhan D, Richardson P, Schreiber SL, et al. Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005 Jun 14;102(24):8567-72. PubMed PMID: 15937109. Pubmed Central PMCID: 1150844.

200. Yu C, Rahmani M, Conrad D, Subler M, Dent P, Grant S. The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis in Bcr/Abl+ cells sensitive and resistant to STI571. Blood. 2003 Nov 15;102(10):3765-74. PubMed PMID: 12893773.

201. Pei XY, Dai Y, Grant S. Synergistic induction of oxidative injury and apoptosis in human multiple myeloma cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitors. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2004 Jun 1;10(11):3839-52. PubMed PMID: 15173093.

202. Adachi M, Zhang Y, Zhao X, Minami T, Kawamura R, Hinoda Y, et al. Synergistic effect of histone deacetylase inhibitors FK228 and m-carboxycinnamic acid bis-hydroxamide with proteasome inhibitors PSI and PS-341 against gastrointestinal adenocarcinoma cells. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2004 Jun 1;10(11):3853-62. PubMed PMID: 15173094.

203. Nawrocki ST, Carew JS, Pino MS, Highshaw RA, Andtbacka RH, Dunner K, Jr., et al. Aggresome disruption: a novel strategy to enhance bortezomib-induced apoptosis in pancreatic cancer cells. Cancer research. 2006 Apr 1;66(7):3773-81. PubMed PMID: 16585204.

204. Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao TP. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. Cell. 2003 Dec 12;115(6):727-38. PubMed PMID: 14675537.

205. Kopito RR. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. Trends in cell biology. 2000 Dec;10(12):524-30. PubMed PMID: 11121744.

206. Heath VL, Bicknell R. Anticancer strategies involving the vasculature. Nature reviews Clinical oncology. 2009 Jul;6(7):395-404. PubMed PMID: 19424102.

207. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. Science. 2005 Jan 7;307(5706):58-62. PubMed PMID: 15637262.

208. Horsman MR, Siemann DW. Pathophysiologic effects of vascular-targeting agents and the implications for combination with conventional therapies. Cancer research. 2006 Dec 15;66(24):11520-39. PubMed PMID: 17178843.

209. Siemann DW. The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. Cancer treatment reviews. 2011 Feb;37(1):63-74. PubMed PMID: 20570444. Pubmed Central PMCID: 2958232.

210. Ivy SP, Wick JY, Kaufman BM. An overview of small-molecule inhibitors of VEGFR signaling. Nature reviews Clinical oncology. 2009 Oct;6(10):569-79. PubMed PMID: 19736552.

211. Suit HD, Westgate SJ. Impact of improved local control on survival. International journal of radiation oncology, biology, physics. 1986 Apr;12(4):453-8. PubMed PMID: 3516948.

212. Chargari C, Soria JC, Deutsch E. Controversies and challenges regarding the impact of radiation therapy on survival. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO. 2013 Jan;24(1):38-46. PubMed PMID: 22898033.

213. Averbeck D. [Mechanisms of repair and radiation-induced mutagenesis in higher eukaryotes]. Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique. 2000 Sep-Oct;4(5):335-54. PubMed PMID: 11098222. Mecanismes de reparation et mutagenese radio-induite chez les eucaryotes superieurs.

214. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-biological interactions. 2006 Mar 10;160(1):1-40. PubMed PMID: 16430879.

215. Warters RL, Hofer KG. Radionuclide toxicity in cultured mammalian cells. Elucidation of the primary site for radiation-induced division delay. Radiation research. 1977 Feb;69(2):348-58. PubMed PMID: 841007.

216. M. Tubiana JD, A. Wambersie, . Radiobiologie. eds Science et Pratique Médicale ed Hermann: Paris 1997.

217. Joubert A, Foray N. [Intrinsic radiosensitivity and DNA double-strand breaks in human cells]. Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique. 2007 May;11(3):129-42. PubMed PMID: 17321185. Radiosensibilite intrinseque et cassures double-brin de l'ADN dans les cellules humaines.

218. Cadet TDaJ. Radiation-induced damage to DNA: from model compounds to cell., in Radiation Chemistry. EDP Science. 2008;Chap 12:p. 177-90. .

219. J. R. Signalisation cellulaire et cancer. . Springer-Verlag, Paris 2010.

220. Hennequin C, Quero L, Favaudon V. [Determinants and predictive factors of tumour radiosensitivity]. Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique. 2008 Jan;12(1):3-13. PubMed PMID: 18187356. Determinants et facteurs predictifs pour la radiosensibilite tumorale.

221. Deschavanne PJ, Fertil B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. International journal of radiation oncology, biology, physics. 1996 Jan 1;34(1):251-66. PubMed PMID: 12118559.

222. Shiloh Y, Ziv Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. Nature reviews Molecular cell biology. 2013 Apr;14(4):197-210. PubMed PMID: 23847781.

223. San Filippo J, Sung P, Klein H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. Annual review of biochemistry. 2008;77:229-57. PubMed PMID: 18275380.

224. Mladenov E, Magin S, Soni A, Iliakis G. DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy. Frontiers in oncology. 2013;3:113. PubMed PMID: 23675572. Pubmed Central PMCID: 3650303.

225. Choudhury A, Zhao H, Jalali F, Al Rashid S, Ran J, Supiot S, et al. Targeting homologous recombination using imatinib results in enhanced tumor cell chemosensitivity and radiosensitivity. Molecular cancer therapeutics. 2009 Jan;8(1):203-13. PubMed PMID: 19139130.

226. Huang F, Mazina OM, Zentner IJ, Cocklin S, Mazin AV. Inhibition of homologous recombination in human cells by targeting RAD51 recombinase. Journal of medicinal chemistry. 2012 Apr 12;55(7):3011-20. PubMed PMID: 22380680.

227. Willers H, Dahm-Daphi J, Powell SN. Repair of radiation damage to DNA. British journal of cancer. 2004 Apr 5;90(7):1297-301. PubMed PMID: 15054444. Pubmed Central PMCID: 2409689.

228. Jeggo PA, Geuting V, Lobrich M. The role of homologous recombination in radiation-induced double-strand break repair. Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology. 2011 Oct;101(1):7-12. PubMed PMID: 21737170.

229. Jagtap P, Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. Nature reviews Drug discovery. 2005 May;4(5):421-40. PubMed PMID: 15864271.

230. Albert JM, Cao C, Kim KW, Willey CD, Geng L, Xiao D, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase enhances cell death and improves tumor growth delay in irradiated lung cancer models. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2007 May 15;13(10):3033-42. PubMed PMID: 17505006.

231. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. The New England journal of medicine. 2009 Jul 9;361(2):123-34. PubMed PMID: 19553641.

232. Claybon A, Karia B, Bruce C, Bishop AJ. PARP1 suppresses homologous recombination events in mice in vivo. Nucleic acids research. 2010 Nov;38(21):7538-45. PubMed PMID: 20660013. Pubmed Central PMCID: 2995050.

233. Chow JP, Man WY, Mao M, Chen H, Cheung F, Nicholls J, et al. PARP1 is overexpressed in nasopharyngeal carcinoma and its inhibition enhances radiotherapy. Molecular cancer therapeutics. 2013 Nov;12(11):2517-28. PubMed PMID: 23979918.

234. Lee HJ, Yoon C, Schmidt B, Park DJ, Zhang AY, Erkizan HV, et al. Combining PARP-1 inhibition and radiation in Ewing sarcoma results in lethal DNA damage. Molecular cancer therapeutics. 2013 Nov;12(11):2591-600. PubMed PMID: 23966622. Pubmed Central PMCID: 3823674.

235. Begg AC, Stewart FA, Vens C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. Nature reviews Cancer. 2011 Apr;11(4):239-53. PubMed PMID: 21430696.

236. Brown KD, Lataxes TA, Shangary S, Mannino JL, Giardina JF, Chen J, et al. Ionizing radiation exposure results in up-regulation of Ku70 via a p53/ataxia-telangiectasia-mutated protein-dependent mechanism. The Journal of biological chemistry. 2000 Mar 3;275(9):6651-6. PubMed PMID: 10692474.

237. Lees-Miller SP, Godbout R, Chan DW, Weinfeld M, Day RS, 3rd, Barron GM, et al. Absence of p350 subunit of DNA-activated protein kinase from a radiosensitive human cell line. Science. 1995 Feb 24;267(5201):1183-5. PubMed PMID: 7855602.

238. Pegg AE. Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. Mutation research. 2000 Apr;462(2-3):83-100. PubMed PMID: 10767620.

239. Denny BJ, Wheelhouse RT, Stevens MF, Tsang LL, Slack JA. NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. Biochemistry. 1994 Aug 9;33(31):9045-51. PubMed PMID: 8049205.

240. Brock CS, Newlands ES, Wedge SR, Bower M, Evans H, Colquhoun I, et al. Phase I trial of temozolomide using an extended continuous oral schedule. Cancer research. 1998 Oct 1;58(19):4363-7. PubMed PMID: 9766665.

241. Tomkinson AE, Mackey ZB. Structure and function of mammalian DNA ligases. Mutation research. 1998 Feb;407(1):1-9. PubMed PMID: 9539976.

242. Modrich P. Strand-specific mismatch repair in mammalian cells. The Journal of biological chemistry. 1997 Oct 3;272(40):24727-30. PubMed PMID: 9312062.

243. Kolodner R. Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. Genes & development. 1996 Jun 15;10(12):1433-42. PubMed PMID: 8666228.

244. Kolodner RD, Marsischky GT. Eukaryotic DNA mismatch repair. Current opinion in genetics & development. 1999 Feb;9(1):89-96. PubMed PMID: 10072354.

245. Jiricny J. Replication errors: cha(lle)nging the genome. The EMBO journal. 1998 Nov 16;17(22):6427-36. PubMed PMID: 9822589. Pubmed Central PMCID: 1170991.

246. Jiricny J, Nystrom-Lahti M. Mismatch repair defects in cancer. Current opinion in genetics & development. 2000 Apr;10(2):157-61. PubMed PMID: 10753784.

247. Seeberg E, Eide L, Bjoras M. The base excision repair pathway. Trends in biochemical sciences. 1995 Oct;20(10):391-7. PubMed PMID: 8533150.

248. Yu Z, Chen J, Ford BN, Brackley ME, Glickman BW. Human DNA repair systems: an overview. Environmental and molecular mutagenesis. 1999;33(1):3-20. PubMed PMID: 10037319.

249. Lindahl T. Suppression of spontaneous mutagenesis in human cells by DNA base excision-repair. Mutation research. 2000 Apr;462(2-3):129-35. PubMed PMID: 10767624.

250. Ganguly T, Duker NJ. Reduced 5-hydroxymethyluracil-DNA glycosylase activity in Werner's syndrome cells. Mutation research. 1992 Mar;275(2):87-96. PubMed PMID: 1379342.

251. Hubscher U, Nasheuer HP, Syvaoja JE. Eukaryotic DNA polymerases, a growing family. Trends in biochemical sciences. 2000 Mar;25(3):143-7. PubMed PMID: 10694886.

252. Randahl H, Elliott GC, Linn S. DNA-repair reactions by purified HeLa DNA polymerases and exonucleases. The Journal of biological chemistry. 1988 Sep 5;263(25):12228-34. PubMed PMID: 2842325.

253. Dobashi Y, Kubota Y, Shuin T, Torigoe S, Yao M, Hosaka M. Polymorphisms in the human DNA polymerase beta gene. Human genetics. 1995 Apr;95(4):389-90. PubMed PMID: 7705833.

254. Bork P, Hofmann K, Bucher P, Neuwald AF, Altschul SF, Koonin EV. A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1997 Jan;11(1):68-76. PubMed PMID: 9034168.

255. de Murcia G, Menissier de Murcia J. Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. Trends in biochemical sciences. 1994 Apr;19(4):172-6. PubMed PMID: 8016868.

256. Thompson LH, West MG. XRCC1 keeps DNA from getting stranded. Mutation research. 2000 Feb 16;459(1):1-18. PubMed PMID: 10677679.

257. Sarasin A. [DNA lesions: mechanisms of recognition and repair]. Bulletin du cancer. 1997 May;84(5):467-72. PubMed PMID: 9295859. Lesions sur l'ADN: mecanismes de reconnaissance et de reparation.

258. Hanawalt PC. Heterogeneity of DNA repair at the gene level. Mutation research. 1991 Apr;247(2):203-11. PubMed PMID: 2011138.

259. Leadon SA. Transcription-coupled repair of DNA damage: unanticipated players, unexpected complexities. American journal of human genetics. 1999 May;64(5):1259-63. PubMed PMID: 10205254. Pubmed Central PMCID: 1377859.

260. Schaeffer L, Moncollin V, Roy R, Staub A, Mezzina M, Sarasin A, et al. The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor. The EMBO journal. 1994 May 15;13(10):2388-92. PubMed PMID: 8194528. Pubmed Central PMCID: 395103.

261. de Boer J, Hoeijmakers JH. Nucleotide excision repair and human syndromes. Carcinogenesis. 2000 Mar;21(3):453-60. PubMed PMID: 10688865.

262. Batty DP, Wood RD. Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. Gene. 2000 Jan 11;241(2):193-204. PubMed PMID: 10675030.

263. Yokoi M, Masutani C, Maekawa T, Sugasawa K, Ohkuma Y, Hanaoka F. The xeroderma pigmentosum group C protein complex XPC-HR23B plays an important role in the recruitment of transcription factor IIH to damaged DNA. The Journal of biological chemistry. 2000 Mar 31;275(13):9870-5. PubMed PMID: 10734143.

264. Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. Nature reviews Cancer. 2004 Aug;4(8):592-603. PubMed PMID: 15286739.

265. Kroemer G, Perfettini JL. Entosis, a key player in cancer cell competition. Cell research. 2014 Nov;24(11):1280-1. PubMed PMID: 25342563. Pubmed Central PMCID: 4220158.

266. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. Cell death and differentiation. 2015 Jan;22(1):58-73. PubMed PMID: 25236395. Pubmed Central PMCID: 4262782.

267. Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. Cell death and differentiation. 2008 Jul;15(7):1153-62. PubMed PMID: 18404154.

268. Lapenna S, Giordano A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. Nature reviews Drug discovery. 2009 Jul;8(7):547-66. PubMed PMID: 19568282.

269. Chan KS, Koh CG, Li HY. Mitosis-targeted anti-cancer therapies: where they stand. Cell death & disease. 2012;3:e411. PubMed PMID: 23076219. Pubmed Central PMCID: 3481136.

270. Yoshikawa R, Kusunoki M, Yanagi H, Noda M, Furuyama JI, Yamamura T, et al. Dual antitumor effects of 5-fluorouracil on the cell cycle in colorectal carcinoma cells: a novel target mechanism concept for pharmacokinetic modulating chemotherapy. Cancer research. 2001 Feb 1;61(3):1029-37. PubMed PMID: 11221829.

271. Dvory-Sobol H, Cohen-Noyman E, Kazanov D, Figer A, Birkenfeld S, Madar-Shapiro L, et al. Celecoxib leads to G2/M arrest by induction of p21 and down-regulation of cyclin B1 expression in a p53-independent manner. European journal of cancer. 2006 Feb;42(3):422-6. PubMed PMID: 16426843.

272. Capalbo G, Dittmann K, Weiss C, Reichert S, Hausmann E, Rodel C, et al. Radiation-induced survivin nuclear accumulation is linked to DNA damage repair. International journal of radiation oncology, biology, physics. 2010 May 1;77(1):226-34. PubMed PMID: 20394854.

273. Hehlgans S, Petraki C, Reichert S, Cordes N, Rodel C, Rodel F. Double targeting of Survivin and XIAP radiosensitizes 3D grown human colorectal tumor cells and decreases migration. Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology. 2013 Jul;108(1):32-9. PubMed PMID: 23830189.

274. Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. Nature. 1999 Oct 7;401(6753):616-20. PubMed PMID: 10524633.

275. Qi W, Martinez JD. Reduction of 14-3-3 proteins correlates with increased sensitivity to killing of human lung cancer cells by ionizing radiation. Radiation research. 2003 Aug;160(2):217-23. PubMed PMID: 12859233.

276. Cohen-Jonathan E, Muschel RJ, Gillies McKenna W, Evans SM, Cerniglia G, Mick R, et al. Farnesyltransferase inhibitors potentiate the antitumor effect of radiation on a human tumor xenograft expressing activated HRAS. Radiation research. 2000 Aug;154(2):125-32. PubMed PMID: 10931682.

277. Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, et al. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. Science. 1994 Nov 4;266(5186):807-10. PubMed PMID: 7973635.

278. Moretti L, Li B, Kim KW, Chen H, Lu B. AT-101, a pan-Bcl-2 inhibitor, leads to radiosensitization of non-small cell lung cancer. Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer. 2010 May;5(5):680-7. PubMed PMID: 20354451.

279. Aloy MT, Hadchity E, Bionda C, Diaz-Latoud C, Claude L, Rousson R, et al. Protective role of Hsp27 protein against gamma radiation-induced apoptosis and radiosensitization effects of Hsp27 gene silencing in different human tumor cells. International journal of radiation oncology, biology, physics. 2008 Feb 1;70(2):543-53. PubMed PMID: 17980509.

280. Ogura A, Watanabe Y, Iizuka D, Yasui H, Amitani M, Kobayashi S, et al. Radiation-induced apoptosis of tumor cells is facilitated by inhibition of the interaction between Survivin and Smac/DIABLO. Cancer letters. 2008 Jan 18;259(1):71-81. PubMed PMID: 17967504.

281. Verbrugge I, Wissink EH, Rooswinkel RW, Jongsma J, Beltraminelli N, Dupuis M, et al. Combining radiotherapy with APO010 in cancer treatment. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2009 Mar 15;15(6):2031-8. PubMed PMID: 19276268.

282. Maduro JH, Noordhuis MG, ten Hoor KA, Pras E, Arts HJ, Eijsink JJ, et al. The prognostic value of TRAIL and its death receptors in cervical cancer. International journal of radiation oncology, biology, physics. 2009 Sep 1;75(1):203-11. PubMed PMID: 19695437.

283. Bonner JA, Willey CD, Yang ES, Dobelbower MC, Sanford LL, Bright SJ, et al. Treatment of small cell lung cancer with TRA-8 in combination with cisplatin and radiation. Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology. 2011 Oct;101(1):183-9. PubMed PMID: 21722984.

284. de Almagro MC, Vucic D. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. Experimental oncology. 2012 Oct;34(3):200-11. PubMed PMID: 23070005.

285. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. Nature reviews Molecular cell biology. 2007 Sep;8(9):729-40. PubMed PMID: 17667954.

286. Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. Methods in molecular biology. 2007;371:21-31. PubMed PMID: 17634571.

287. Kurz T, Terman A, Brunk UT. Autophagy, ageing and apoptosis: the role of oxidative stress and lysosomal iron. Archives of biochemistry and biophysics. 2007 Jun 15;462(2):220-30. PubMed PMID: 17306211.

288. Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, Ortiz C, Criollo A, Tasdemir E, et al. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review. Gerontology. 2008;54(2):92-9. PubMed PMID: 18451641.

289. Helmbold H, Deppert W, Bohn W. Regulation of cellular senescence by Rb2/p130. Oncogene. 2006 Aug 28;25(38):5257-62. PubMed PMID: 16936745.

290. Vaziri H, Benchimol S. Alternative pathways for the extension of cellular life span: inactivation of p53/pRb and expression of telomerase. Oncogene. 1999 Dec 13;18(53):7676-80. PubMed PMID: 10618707.

291. Kapic A, Helmbold H, Reimer R, Klotzsche O, Deppert W, Bohn W. Cooperation between p53 and p130(Rb2) in induction of cellular senescence. Cell death and differentiation. 2006 Feb;13(2):324-34. PubMed PMID: 16123778.

292. Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, et al. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy. 2007 Feb-Apr;10(1-2):13-29. PubMed PMID: 17303468.

293. Cuervo AM. Autophagy: many paths to the same end. Molecular and cellular biochemistry. 2004 Aug;263(1-2):55-72. PubMed PMID: 15524167.

294. Galluzzi L, Vicencio JM, Kepp O, Tasdemir E, Maiuri MC, Kroemer G. To die or not to die: that is the autophagic question. Current molecular medicine. 2008 Mar;8(2):78-91. PubMed PMID: 18336289.

295. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. Cell. 2008 Jan 11;132(1):27-42. PubMed PMID: 18191218. Pubmed Central PMCID: 2696814.

296. Farre JC, Subramani S. Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process. Trends in cell biology. 2004 Sep;14(9):515-23. PubMed PMID: 15350980.

297. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell death and differentiation. 2009 Jan;16(1):3-11. PubMed PMID: 18846107. Pubmed Central PMCID: 2744427.

298. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. Nature reviews Cancer. 2012 Dec;12(12):860-75. PubMed PMID: 23151605.

299. Garg AD, Krysko DV, Verfaillie T, Kaczmarek A, Ferreira GB, Marysael T, et al. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. The EMBO journal. 2012 Mar 7;31(5):1062-79. PubMed PMID: 22252128. Pubmed Central PMCID: 3298003.

300. Tubiana MD, J. Wambersie, A. Science et Pratique Médicale. . Radiobiologie Hermann: Paris

1997.

301. Elkind MM, Sutton H. The relationship between division and x-ray sensitivity, ultraviolet sensitivity, and photoreactivation in yeast. Radiation research. 1959 Mar;10(3):283-95. PubMed PMID: 13645935.

302. Veldeman L, Madani I, Hulstaert F, De Meerleer G, Mareel M, De Neve W. Evidence behind use of intensity-modulated radiotherapy: a systematic review of comparative clinical studies. The Lancet Oncology. 2008 Apr;9(4):367-75. PubMed PMID: 18374290.

303. Viani GA, da Silva LG, Stefano EJ. High-dose conformal radiotherapy reduces prostate cancer-specific mortality: results of a meta-analysis. International journal of radiation oncology, biology, physics. 2012 Aug 1;83(5):e619-25. PubMed PMID: 22768991.

304. Minsky BD, Pajak TF, Ginsberg RJ, Pisansky TM, Martenson J, Komaki R, et al. INT 0123 (Radiation Therapy Oncology Group 94-05) phase III trial of combined-modality therapy for esophageal cancer: high-dose versus standard-dose radiation therapy. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2002 Mar 1;20(5):1167-74. PubMed PMID: 11870157.

305. Bradley JD, Paulus R, Komaki R, Masters G, Blumenschein G, Schild S, et al. Standard-dose versus high-dose conformal radiotherapy with concurrent and consolidation carboplatin plus paclitaxel with or without cetuximab for patients with stage IIIA or IIIB non-small-cell lung cancer (RTOG 0617): a randomised, two-by-two factorial phase 3 study. The Lancet Oncology. 2015 Feb;16(2):187-99. PubMed PMID: 25601342. Pubmed Central PMCID: 4419359.

306. Seeber LM, Horree N, Vooijs MA, Heintz AP, van der Wall E, Verheijen RH, et al. The role of hypoxia inducible factor-1alpha in gynecological cancer. Critical reviews in oncology/hematology. 2011 Jun;78(3):173-84. PubMed PMID: 20627616.

307. Chang JY, Senan S, Smit EF, Roth JA. Surgery versus SABR for resectable non-small-cell lung cancer - Authors' reply. The Lancet Oncology. 2015 Aug;16(8):e374-5. PubMed PMID: 26248841.

308. Tree AC, Khoo VS, Eeles RA, Ahmed M, Dearnaley DP, Hawkins MA, et al. Stereotactic body radiotherapy for oligometastases. The Lancet Oncology. 2013 Jan;14(1):e28-37. PubMed PMID: 23276369.

309. Steel GG, Peckham MJ. Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity. International journal of radiation oncology, biology, physics. 1979 Jan;5(1):85-91. PubMed PMID: 422420.

310. Vokes EE, Weichselbaum RR. Concomitant chemoradiotherapy: rationale and clinical experience in patients with solid tumors. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 1990 May;8(5):911-34. PubMed PMID: 2185342.

311. Magne N, Chargari C, Castadot P, Ghalibafian M, Soria JC, Haie-Meder C, et al. The efficacy and toxicity of EGFR in the settings of radiotherapy: Focus on published clinical trials. European journal of cancer. 2008 Oct;44(15):2133-43. PubMed PMID: 18692389.

312. Seiwert TY, Salama JK, Vokes EE. The chemoradiation paradigm in head and neck cancer. Nature clinical practice Oncology. 2007 Mar;4(3):156-71. PubMed PMID: 17327856.

313. Mierzwa ML, Nyati MK, Morgan MA, Lawrence TS. Recent advances in combined modality therapy. The oncologist. 2010;15(4):372-81. PubMed PMID: 20413642. Pubmed Central PMCID: 3227964.

314. Hennequin C, Favaudon V. Biological basis for chemo-radiotherapy interactions. European journal of cancer. 2002 Jan;38(2):223-30. PubMed PMID: 11803139.

315. Sharma RA, Plummer R, Stock JK, Greenhalgh TA, Ataman O, Kelly S, et al. Clinical development of new drug-radiotherapy combinations. Nature reviews Clinical oncology. 2016 Oct;13(10):627-42. PubMed PMID: 27245279.

316. Lawrence YR, Vikram B, Dignam JJ, Chakravarti A, Machtay M, Freidlin B, et al. NCI-RTOG translational program strategic guidelines for the early-stage development of radiosensitizers. Journal of the National Cancer Institute. 2013 Jan 2;105(1):11-24. PubMed PMID: 23231975. Pubmed Central PMCID: 3536642.

317. Hansen E RM. Handbook of evidence-based radiation oncology. Springer; 2nd ed. 2010

318. Ataman OU, Sambrook SJ, Wilks C, Lloyd A, Taylor AE, Wedge SR. The clinical development of molecularly targeted agents in combination with radiation therapy: a pharmaceutical perspective. International journal of radiation oncology, biology, physics. 2012 Nov 15;84(4):e447-54. PubMed PMID: 22819210.

319. Maingon P, Govaerts A-S, Rivera S, Vens C, Shash E, Grégoire V. New challenge of developing combined radio-drug therapy. Chinese Clinical Oncology. 2014;3(2).

320. Zindler JD, Thomas CR, Jr., Hahn SM, Hoffmann AL, Troost EG, Lambin P. Increasing the Therapeutic Ratio of Stereotactic Ablative Radiotherapy by Individualized Isotoxic Dose Prescription. Journal of the National Cancer Institute. 2016 Feb;108(2). PubMed PMID: 26476075.

321. Lartigau E, Dewas S, Gras L. [The Oxygen effect: an old new target?]. Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique. 2008 Jan;12(1):42-9. PubMed PMID: 18261946. L'effet Oxygene, une cible ancienne toujours d'actualite ?

322. Palcic B, Brosing JW, Skarsgard LD. Survival measurements at low doses: oxygen enhancement ratio. British journal of cancer. 1982 Dec;46(6):980-4. PubMed PMID: 7150493. Pubmed Central PMCID: 2011221.

323. Nordsmark M, Overgaard M, Overgaard J. Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology. 1996 Oct;41(1):31-9. PubMed PMID: 8961365.

324. Bush RS. The significance of anemia in clinical radiation therapy. International journal of radiation oncology, biology, physics. 1986 Nov;12(11):2047-50. PubMed PMID: 3771322.

325. Harrison L, Blackwell K. Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy? The oncologist. 2004;9 Suppl 5:31-40. PubMed PMID: 15591420.

326. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. Nature. 1996 Jan 4;379(6560):88-91. PubMed PMID: 8538748.

327. Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. The oncologist. 2004;9 Suppl 5:4-9. PubMed PMID: 15591417.

328. Belozerov VE, Van Meir EG. Hypoxia inducible factor-1: a novel target for cancer therapy. Anti-cancer drugs. 2005 Oct;16(9):901-9. PubMed PMID: 16162966.

329. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. Nature medicine. 2003 Jun;9(6):677-84. PubMed PMID: 12778166.

330. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nature reviews Cancer. 2003 Oct;3(10):721-32. PubMed PMID: 13130303.

331. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. Science. 2001 Apr 20;292(5516):464-8. PubMed PMID: 11292862.

332. Li Z, Bao S, Wu Q, Wang H, Eyler C, Sathornsumetee S, et al. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. Cancer cell. 2009 Jun 2;15(6):501-13. PubMed PMID: 19477429. Pubmed Central PMCID: 2693960.

333. Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. Nature. 2009 Apr 9;458(7239):780-3. PubMed PMID: 19194462. Pubmed Central PMCID: 2778612.

334. Overgaard J. Hypoxic modification of radiotherapy in squamous cell carcinoma of the head and neck--a systematic review and meta-analysis. Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology. 2011 Jul;100(1):22-32. PubMed PMID: 21511351.

335. Henke M, Laszig R, Rube C, Schafer U, Haase KD, Schilcher B, et al. Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet. 2003 Oct 18;362(9392):1255-60. PubMed PMID: 14575968.

336. Bennett M, Feldmeier J, Smee R, Milross C. Hyperbaric oxygenation for tumour sensitisation to radiotherapy. The Cochrane database of systematic reviews. 2005 (4):CD005007. PubMed PMID: 16235387.

337. Rauth AM, Melo T, Misra V. Bioreductive therapies: an overview of drugs and their mechanisms of action. International journal of radiation oncology, biology, physics. 1998 Nov 1;42(4):755-62. PubMed PMID: 9845091.

338. Rischin D, Peters LJ, O'Sullivan B, Giralt J, Fisher R, Yuen K, et al. Tirapazamine, cisplatin, and radiation versus cisplatin and radiation for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (TROG 02.02, HeadSTART): a phase III trial of the Trans-Tasman Radiation Oncology Group. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2010 Jun 20;28(18):2989-95. PubMed PMID: 20479425.

339. Peters LJ, O'Sullivan B, Giralt J, Fitzgerald TJ, Trotti A, Bernier J, et al. Critical impact of radiotherapy protocol compliance and quality in the treatment of advanced head and neck cancer:

results from TROG 02.02. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2010 Jun 20;28(18):2996-3001. PubMed PMID: 20479390.

340. Larue RT, Van De Voorde L, Berbee M, van Elmpt WJ, Dubois LJ, Panth KM, et al. A phase 1 'window-of-opportunity' trial testing evofosfamide (TH-302), a tumour-selective hypoxia-activated cytotoxic prodrug, with preoperative chemoradiotherapy in oesophageal adenocarcinoma patients. BMC cancer. 2016;16:644. PubMed PMID: 27535748. Pubmed Central PMCID: 4989456.

341. Pourmorteza M, Rahman ZU, Young M. Evofosfamide, a new horizon in the treatment of pancreatic cancer. Anti-cancer drugs. 2016 Sep;27(8):723-5. PubMed PMID: 27232101.

342. Zhang Y, Jung M, Dritschilo A, Jung M. Enhancement of radiation sensitivity of human squamous carcinoma cells by histone deacetylase inhibitors. Radiation research. 2004 Jun;161(6):667-74. PubMed PMID: 15161353.

343. Kim JH, Shin JH, Kim IH. Susceptibility and radiosensitization of human glioblastoma cells to trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor. International journal of radiation oncology, biology, physics. 2004 Jul 15;59(4):1174-80. PubMed PMID: 15234053.

344. Camphausen K, Scott T, Sproull M, Tofilon PJ. Enhancement of xenograft tumor radiosensitivity by the histone deacetylase inhibitor MS-275 and correlation with histone hyperacetylation. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2004 Sep 15;10(18 Pt 1):6066-71. PubMed PMID: 15447991.

345. Camphausen K, Cerna D, Scott T, Sproull M, Burgan WE, Cerra MA, et al. Enhancement of in vitro and in vivo tumor cell radiosensitivity by valproic acid. International journal of cancer. 2005 Apr 10;114(3):380-6. PubMed PMID: 15578701.

346. Karagiannis TC, Harikrishnan KN, El-Osta A. The histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A, enhances radiation sensitivity and accumulation of gammaH2A.X. Cancer biology & therapy. 2005 Jul;4(7):787-93. PubMed PMID: 16082178.

347. Nome RV, Bratland A, Harman G, Fodstad O, Andersson Y, Ree AH. Cell cycle checkpoint signaling involved in histone deacetylase inhibition and radiation-induced cell death. Molecular cancer therapeutics. 2005 Aug;4(8):1231-8. PubMed PMID: 16093439.

348. Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. Nature reviews Cancer. 2003 Mar;3(3):155-68. PubMed PMID: 12612651.

349. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. Nature. 2003 Jan 30;421(6922):499-506. PubMed PMID: 12556884.

350. Kim GD, Choi YH, Dimtchev A, Jeong SJ, Dritschilo A, Jung M. Sensing of ionizing radiation-induced DNA damage by ATM through interaction with histone deacetylase. The Journal of biological chemistry. 1999 Oct 29;274(44):31127-30. PubMed PMID: 10531300.

351. Munshi A, Kurland JF, Nishikawa T, Tanaka T, Hobbs ML, Tucker SL, et al. Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2005 Jul 1;11(13):4912-22. PubMed PMID: 16000590.

352. Yaneva M, Li H, Marple T, Hasty P. Non-homologous end joining, but not homologous recombination, enables survival for cells exposed to a histone deacetylase inhibitor. Nucleic acids research. 2005;33(16):5320-30. PubMed PMID: 16177181. Pubmed Central PMCID: 1226312.

353. Subramanian C, Opipari AW, Jr., Bian X, Castle VP, Kwok RP. Ku70 acetylation mediates neuroblastoma cell death induced by histone deacetylase inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005 Mar 29;102(13):4842-7. PubMed PMID: 15778293. Pubmed Central PMCID: 555706.

354. Chung YL, Wang AJ, Yao LF. Antitumor histone deacetylase inhibitors suppress cutaneous radiation syndrome: Implications for increasing therapeutic gain in cancer radiotherapy. Molecular cancer therapeutics. 2004 Mar;3(3):317-25. PubMed PMID: 15026552.

355. C. BJMMN. Radiation Oncology. . Springer Berlin Heidelberg New York 2006.

356. Amorino GP, Freeman ML, Carbone DP, Lebwohl DE, Choy H. Radiopotentiation by the oral platinum agent, JM216: role of repair inhibition. International journal of radiation oncology, biology, physics. 1999 May 1;44(2):399-405. PubMed PMID: 10760436.

357. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. Nature reviews Drug discovery. 2005 Apr;4(4):307-20. PubMed PMID: 15789122.

358. Raaphorst GP, Leblanc M, Li LF. A comparison of response to cisplatin, radiation and combined treatment for cells deficient in recombination repair pathways. Anticancer research. 2005 Jan-Feb;25(1A):53-8. PubMed PMID: 15816518.

359. Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B, Nehme A, et al. The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. Cancer research. 1996 Nov 1;56(21):4881-6. PubMed PMID: 8895738.

360. Driessens G, Harsan L, Browaeys P, Giannakopoulos X, Velu T, Bruyns C. Assessment of in vivo chemotherapy-induced DNA damage in a p53-mutated rat tumor by micronuclei assay. Annals of the New York Academy of Sciences. 2003 Dec;1010:775-9. PubMed PMID: 15033826.

361. Raymond E, Faivre S, Woynarowski JM, Chaney SG. Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. Seminars in oncology. 1998 Apr;25(2 Suppl 5):4-12. PubMed PMID: 9609103.

362. Dolling JA, Boreham DR, Brown DL, Mitchel RE, Raaphorst GP. Modulation of radiation-induced strand break repair by cisplatin in mammalian cells. International journal of radiation biology. 1998 Jul;74(1):61-9. PubMed PMID: 9687976.

363. Skov K, MacPhail S. Interaction of platinum drugs with clinically relevant x-ray doses in mammalian cells: a comparison of cisplatin, carboplatin, iproplatin, and tetraplatin. International journal of radiation oncology, biology, physics. 1991 Feb;20(2):221-5. PubMed PMID: 1991682.

364. Schwachofer JH, Crooijmans RP, Hoogenhout J, Kal HB, Theeuwes AG. Effectiveness in inhibition of recovery of cell survival by cisplatin and carboplatin: influence of treatment sequence. International journal of radiation oncology, biology, physics. 1991 Jun;20(6):1235-41. PubMed PMID: 2045298.

365. Overgaard J, Khan AR. Selective enhancement of radiation response in a C3H mammary carcinoma by cisplatin. Cancer treatment reports. 1981 May-Jun;65(5-6):501-3. PubMed PMID: 7195305.

366. Pekkola-Heino K, Kulmala J, Grenman R. Carboplatin-radiation interaction in squamous cell carcinoma cell lines. Archives of otolaryngology--head & neck surgery. 1992 Dec;118(12):1312-5. PubMed PMID: 1449690.

367. Scalliet P, De Pooter C, Hellemans PW, De Bruijn EA, Van Oosterom AT. [Interactions of carboplatin, cisplatin, and ionizing radiation on a human cell line of ovarian cancer]. Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique. 1999 Jan-Feb;3(1):30-8. PubMed PMID: 10083861. Interactions entre le carboplatine, le cisplatine et les rayonnements ionisants dans une lignee cellulaire humaine de cancer ovarien.

368. Yang LX, Douple EB, Wang HJ. Irradiation enhances cellular uptake of carboplatin. International journal of radiation oncology, biology, physics. 1995 Oct 15;33(3):641-6. PubMed PMID: 7558954.

369. Wu HI, Brown JA, Dorie MJ, Lazzeroni L, Brown JM. Genome-wide identification of genes conferring resistance to the anticancer agents cisplatin, oxaliplatin, and mitomycin C. Cancer research. 2004 Jun 1;64(11):3940-8. PubMed PMID: 15173006.

370. Woynarowski JM, Chapman WG, Napier C, Herzig MC, Juniewicz P. Sequence- and region-specificity of oxaliplatin adducts in naked and cellular DNA. Molecular pharmacology. 1998 Nov;54(5):770-7. PubMed PMID: 9804612.

371. Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. Molecular cancer therapeutics. 2002 Jan;1(3):227-35. PubMed PMID: 12467217.

372. Kjellstrom J, Kjellen E, Johnsson A. In vitro radiosensitization by oxaliplatin and 5-fluorouracil in a human colon cancer cell line. Acta oncologica. 2005;44(7):687-93. PubMed PMID: 16227158.

373. Magne N, Fischel JL, Formento P, Etienne MC, Dubreuil A, Marcie S, et al. Oxaliplatin-5-fluorouracil and ionizing radiation. Importance of the sequence and influence of p53 status. Oncology. 2003;64(3):280-7. PubMed PMID: 12697970.

374. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. CA: a cancer journal for clinicians. 2009 Jul-Aug;59(4):225-49. PubMed PMID: 19474385.

375. Bossard N, Velten M, Remontet L, Belot A, Maarouf N, Bouvier AM, et al. Survival of cancer patients in France: a population-based study from The Association of the French Cancer Registries (FRANCIM). European journal of cancer. 2007 Jan;43(1):149-60. PubMed PMID: 17084622.

376. Rami-Porta R, Crowley JJ, Goldstraw P. The revised TNM staging system for lung cancer. Annals of thoracic and cardiovascular surgery : official journal of the Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia. 2009 Feb;15(1):4-9. PubMed PMID: 19262443.

377. Okawara G, Mackay JA, Evans WK, Ung YC, Lung Cancer Disease Site Group of Cancer Care Ontario's Program in Evidence-based C. Management of unresected stage III non-small cell lung cancer: a systematic review. Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer. 2006 May;1(4):377-93. PubMed PMID: 17409887.

378. O'Rourke N, Roque IFM, Farre Bernado N, Macbeth F. Concurrent chemoradiotherapy in non-small cell lung cancer. The Cochrane database of systematic reviews. 2010 (6):CD002140. PubMed PMID: 20556756.

379. Auperin A, Le Pechoux C, Rolland E, Curran WJ, Furuse K, Fournel P, et al. Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2010 May 1;28(13):2181-90. PubMed PMID: 20351327.

380. Nakagawa M, Oda Y, Eguchi T, Aishima S, Yao T, Hosoi F, et al. Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues. Oncology reports. 2007 Oct;18(4):769-74. PubMed PMID: 17786334.

381. Wagner JM, Hackanson B, Lubbert M, Jung M. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors in recent clinical trials for cancer therapy. Clinical epigenetics. 2010 Dec;1(3-4):117-36. PubMed PMID: 21258646. Pubmed Central PMCID: 3020651.

382. Groselj B, Sharma NL, Hamdy FC, Kerr M, Kiltie AE. Histone deacetylase inhibitors as radiosensitisers: effects on DNA damage signalling and repair. British journal of cancer. 2013 Mar 5;108(4):748-54. PubMed PMID: 23361058. Pubmed Central PMCID: 3590661.

383. Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. Annual review of biochemistry. 2001;70:81-120. PubMed PMID: 11395403.

384. Thiagalingam S, Cheng KH, Lee HJ, Mineva N, Thiagalingam A, Ponte JF. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. Annals of the New York Academy of Sciences. 2003 Mar;983:84-100. PubMed PMID: 12724214.

385. Lawlor ER, Thiele CJ. Epigenetic changes in pediatric solid tumors: promising new targets. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2012 May 15;18(10):2768-79. PubMed PMID: 22589485. Pubmed Central PMCID: 3691809.

386. Falkenberg KJ, Johnstone RW. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. Nature reviews Drug discovery. 2014 Sep;13(9):673-91. PubMed PMID: 25131830.

387. Lane AA, Chabner BA. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2009 Nov 10;27(32):5459-68. PubMed PMID: 19826124.

388. Bantscheff M, Hopf C, Savitski MM, Dittmann A, Grandi P, Michon AM, et al. Chemoproteomics profiling of HDAC inhibitors reveals selective targeting of HDAC complexes. Nature biotechnology. 2011 Mar;29(3):255-65. PubMed PMID: 21258344.

389. Nolan L, Johnson PW, Ganesan A, Packham G, Crabb SJ. Will histone deacetylase inhibitors require combination with other agents to fulfil their therapeutic potential? British journal of cancer. 2008 Sep 2;99(5):689-94. PubMed PMID: 18728657. Pubmed Central PMCID: 2528143.

390. Sharma A, Singh K, Almasan A. Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. Methods in molecular biology. 2012;920:613-26. PubMed PMID: 22941631.

391. Adimoolam S, Sirisawad M, Chen J, Thiemann P, Ford JM, Buggy JJ. HDAC inhibitor PCI-24781 decreases RAD51 expression and inhibits homologous recombination. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007 Dec 4;104(49):19482-7. PubMed PMID: 18042714. Pubmed Central PMCID: 2148315.

392. Geng L, Cuneo KC, Fu A, Tu T, Atadja PW, Hallahan DE. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor LBH589 increases duration of gamma-H2AX foci and confines HDAC4 to the cytoplasm in irradiated non-small cell lung cancer. Cancer research. 2006 Dec 1;66(23):11298-304. PubMed PMID: 17145876.

393. Hehlgans S, Storch K, Lange I, Cordes N. The novel HDAC inhibitor NDACI054 sensitizes human cancer cells to radiotherapy. Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology. 2013 Oct;109(1):126-32. PubMed PMID: 24060178.

394. Sholler GS, Currier EA, Dutta A, Slavik MA, Illenye SA, Mendonca MC, et al. PCI-24781 (abexinostat), a novel histone deacetylase inhibitor, induces reactive oxygen species-dependent apoptosis and is synergistic with bortezomib in neuroblastoma. Journal of cancer therapeutics & research. 2013 Dec 28;2:21. PubMed PMID: 25520806. Pubmed Central PMCID: 4266584.

395. Lopez G, Liu J, Ren W, Wei W, Wang S, Lahat G, et al. Combining PCI-24781, a novel histone deacetylase inhibitor, with chemotherapy for the treatment of soft tissue sarcoma. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2009 May 15;15(10):3472-83. PubMed PMID: 19417021.

396. Rivera-Del Valle N, Gao S, Miller CP, Fulbright J, Gonzales C, Sirisawad M, et al. PCI-24781, a Novel Hydroxamic Acid HDAC Inhibitor, Exerts Cytotoxicity and Histone Alterations via Caspase-8 and FADD in Leukemia Cells. International journal of cell biology. 2010;2010:207420. PubMed PMID: 20145726. Pubmed Central PMCID: 2817379.

397. Butler LM, Agus DB, Scher HI, Higgins B, Rose A, Cordon-Cardo C, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo. Cancer research. 2000 Sep 15;60(18):5165-70. PubMed PMID: 11016644.

398. Ha K, Fiskus W, Choi DS, Bhaskara S, Cerchietti L, Devaraj SG, et al. Histone deacetylase inhibitor treatment induces 'BRCAness' and synergistic lethality with PARP inhibitor and cisplatin against human triple negative breast cancer cells. Oncotarget. 2014 Jul 30;5(14):5637-50. PubMed PMID: 25026298. Pubmed Central PMCID: 4170637.

399. Baschnagel A, Russo A, Burgan WE, Carter D, Beam K, Palmieri D, et al. Vorinostat enhances the radiosensitivity of a breast cancer brain metastatic cell line grown in vitro and as intracranial xenografts. Molecular cancer therapeutics. 2009 Jun;8(6):1589-95. PubMed PMID: 19509253. Pubmed Central PMCID: 3393105.

400. Wang LT, Liou JP, Li YH, Liu YM, Pan SL, Teng CM. A novel class I HDAC inhibitor, MPT0G030, induces cell apoptosis and differentiation in human colorectal cancer cells via HDAC1/PKCdelta and E-cadherin. Oncotarget. 2014 Jul 30;5(14):5651-62. PubMed PMID: 25015091. Pubmed Central PMCID: 4170623.

401. Folkvord S, Ree AH, Furre T, Halvorsen T, Flatmark K. Radiosensitization by SAHA in experimental colorectal carcinoma models-in vivo effects and relevance of histone acetylation status. International journal of radiation oncology, biology, physics. 2009 Jun 1;74(2):546-52. PubMed PMID: 19427556.

402. Saelen MG, Ree AH, Kristian A, Fleten KG, Furre T, Hektoen HH, et al. Radiosensitization by the histone deacetylase inhibitor vorinostat under hypoxia and with capecitabine in experimental colorectal carcinoma. Radiation oncology. 2012;7:165. PubMed PMID: 23017053. Pubmed Central PMCID: 3488009.

403. Kano M, Yamada S, Hoshino I, Murakami K, Akutsu Y, Sakata H, et al. Effects of carbon-ion radiotherapy combined with a novel histone deacetylase inhibitor, cyclic hydroxamic-acid-containing peptide 31 in human esophageal squamous cell carcinoma. Anticancer research. 2009 Nov;29(11):4433-8. PubMed PMID: 20032389.

404. Zhang Y, Adachi M, Zhao X, Kawamura R, Imai K. Histone deacetylase inhibitors FK228, N-(2-aminophenyl)-4-[N-(pyridin-3-yl-methoxycarbonyl)amino- methyl]benzamide and m-carboxycinnamic acid bis-hydroxamide augment radiation-induced cell death in gastrointestinal adenocarcinoma cells. International journal of cancer. 2004 Jun 10;110(2):301-8. PubMed PMID: 15069698.

405. Konsoula Z, Cao H, Velena A, Jung M. Adamantanyl-histone deacetylase inhibitor H6CAHA exhibits favorable pharmacokinetics and augments prostate cancer radiation sensitivity. International journal of radiation oncology, biology, physics. 2011 Apr 1;79(5):1541-8. PubMed PMID: 21277099.

406. Cuneo KC, Fu A, Osusky K, Huamani J, Hallahan DE, Geng L. Histone deacetylase inhibitor NVP-LAQ824 sensitizes human nonsmall cell lung cancer to the cytotoxic effects of ionizing radiation. Anti-cancer drugs. 2007 Aug;18(7):793-800. PubMed PMID: 17581301.

407. Mueller S, Yang X, Sottero TL, Gragg A, Prasad G, Polley MY, et al. Cooperation of the HDAC inhibitor vorinostat and radiation in metastatic neuroblastoma: efficacy and underlying mechanisms. Cancer letters. 2011 Jul 28;306(2):223-9. PubMed PMID: 21497989. Pubmed Central PMCID: 3244077.

408. Camphausen K, Burgan W, Cerra M, Oswald KA, Trepel JB, Lee MJ, et al. Enhanced radiation-induced cell killing and prolongation of gammaH2AX foci expression by the histone deacetylase inhibitor MS-275. Cancer research. 2004 Jan 1;64(1):316-21. PubMed PMID: 14729640.

409. Entin-Meer M, Rephaeli A, Yang X, Nudelman A, VandenBerg SR, Haas-Kogan DA. Butyric acid prodrugs are histone deacetylase inhibitors that show antineoplastic activity and radiosensitizing capacity in the treatment of malignant gliomas. Molecular cancer therapeutics. 2005 Dec;4(12):1952-61. PubMed PMID: 16373710.

410. Entin-Meer M, Yang X, VandenBerg SR, Lamborn KR, Nudelman A, Rephaeli A, et al. In vivo efficacy of a novel histone deacetylase inhibitor in combination with radiation for the treatment of gliomas. Neuro-oncology. 2007 Apr;9(2):82-8. PubMed PMID: 17347490. Pubmed Central PMCID: 1871664.

411. Thiemann M, Oertel S, Ehemann V, Weichert W, Stenzinger A, Bischof M, et al. In vivo efficacy of the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid in combination with radiotherapy in a malignant rhabdoid tumor mouse model. Radiation oncology. 2012;7:52. PubMed PMID: 22458853. Pubmed Central PMCID: 3342162.

412. Gueugnon F, Cartron PF, Charrier C, Bertrand P, Fonteneau JF, Gregoire M, et al. New histone deacetylase inhibitors improve cisplatin antitumor properties against thoracic cancer cells. Oncotarget. 2014 Jun 30;5(12):4504-15. PubMed PMID: 24980825. Pubmed Central PMCID: 4147341.

413. Zhang F, Zhang T, Teng ZH, Zhang R, Wang JB, Mei QB. Sensitization to gamma-irradiation-induced cell cycle arrest and apoptosis by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. Cancer biology & therapy. 2009 May;8(9):823-31. PubMed PMID: 19270532.

414. Camphausen K, Tofilon PJ. Inhibition of histone deacetylation: a strategy for tumor radiosensitization. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2007 Sep 10;25(26):4051-6. PubMed PMID: 17827453.

415. Ozgen U, Savasan S, Buck S, Ravindranath Y. Comparison of DiOC(6)(3) uptake and annexin V labeling for quantification of apoptosis in leukemia cells and non-malignant T lymphocytes from children. Cytometry. 2000 Feb 15;42(1):74-8. PubMed PMID: 10679746.

416. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. Nature genetics. 2001 Mar;27(3):247-54. PubMed PMID: 11242102.

417. van Veelen LR, Cervelli T, van de Rakt MW, Theil AF, Essers J, Kanaar R. Analysis of ionizing radiation-induced foci of DNA damage repair proteins. Mutation research. 2005 Jul 1;574(1-2):22-33. PubMed PMID: 15914204.

418. Munshi A, Tanaka T, Hobbs ML, Tucker SL, Richon VM, Meyn RE. Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, enhances the response of human tumor cells to ionizing radiation through prolongation of gamma-H2AX foci. Molecular cancer therapeutics. 2006 Aug;5(8):1967-74. PubMed PMID: 16928817.

419. Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. Radiation research. 2002 Oct;158(4):486-92. PubMed PMID: 12236816.

420. Smits KM, Melotte V, Niessen HE, Dubois L, Oberije C, Troost EG, et al. Epigenetics in radiotherapy: where are we heading? Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology. 2014 May;111(2):168-77. PubMed PMID: 24861629.

421. Edwards A, Li J, Atadja P, Bhalla K, Haura EB. Effect of the histone deacetylase inhibitor LBH589 against epidermal growth factor receptor-dependent human lung cancer cells. Molecular cancer therapeutics. 2007 Sep;6(9):2515-24. PubMed PMID: 17876048.

422. Gressette M, Verillaud B, Jimenez-Pailhes AS, Lelievre H, Lo KW, Ferrand FR, et al. Treatment of nasopharyngeal carcinoma cells with the histone-deacetylase inhibitor abexinostat: cooperative effects with cis-platin and radiotherapy on patient-derived xenografts. PloS one. 2014;9(3):e91325. PubMed PMID: 24618637. Pubmed Central PMCID: 3949989.

423. Zhang X, Jiang SJ, Shang B, Jiang HJ. Effects of histone deacetylase inhibitor trichostatin A combined with cisplatin on apoptosis of A549 cell line. Thoracic cancer. 2015 Mar;6(2):202-8. PubMed PMID: 26273359. Pubmed Central PMCID: 4448485.

424. Vokes EE, Senan S, Treat JA, Iscoe NA. PROCLAIM: A phase III study of pemetrexed, cisplatin, and radiation therapy followed by consolidation pemetrexed versus etoposide, cisplatin, and radiation therapy followed by consolidation cytotoxic chemotherapy of choice in locally advanced stage III non-small-cell lung cancer of other than predominantly squamous cell histology. Clinical lung cancer. 2009 May;10(3):193-8. PubMed PMID: 19443340.

425. Harrington KJ, Karapanagiotou EM, Roulstone V, Twigger KR, White CL, Vidal L, et al. Two-stage phase I dose-escalation study of intratumoral reovirus type 3 dearing and palliative radiotherapy in patients with advanced cancers. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2010 Jun 1;16(11):3067-77. PubMed PMID: 20484020. Pubmed Central PMCID: 3907942.

426. Fouliard S, Robert R, Jacquet-Bescond A, du Rieu QC, Balasubramanian S, Loury D, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling-based optimisation of administration schedule for the histone deacetylase inhibitor abexinostat (S78454/PCI-24781) in phase I. European journal of cancer. 2013 Sep;49(13):2791-7. PubMed PMID: 23790467.

427. Ribrag V. Safety and efficacy of abexinostat, a pan- histone deacetylase inhibitor, in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia: results of an ongoing phase 2 study. Program and abstracts of the 57th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. 2015;Abstract 256.

.

428. Gryder BE, Sodji QH, Oyelere AK. Targeted cancer therapy: giving histone deacetylase inhibitors all they need to succeed. Future medicinal chemistry. 2012 Mar;4(4):505-24. PubMed PMID: 22416777. Pubmed Central PMCID: 3341130.

429. West AC, Johnstone RW. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. The Journal of clinical investigation. 2014 Jan;124(1):30-9. PubMed PMID: 24382387. Pubmed Central PMCID: 3871231.

430. Galanis E, Jaeckle KA, Maurer MJ, Reid JM, Ames MM, Hardwick JS, et al. Phase II trial of vorinostat in recurrent glioblastoma multiforme: a north central cancer treatment group study. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2009 Apr 20;27(12):2052-8. PubMed PMID: 19307505. Pubmed Central PMCID: 2669764.

431. Lee EQ, Puduvalli VK, Reid JM, Kuhn JG, Lamborn KR, Cloughesy TF, et al. Phase I study of vorinostat in combination with temozolomide in patients with high-grade gliomas: North American Brain Tumor Consortium Study 04-03. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2012 Nov 1;18(21):6032-9. PubMed PMID: 22923449. Pubmed Central PMCID: 3947570.

432. Friday BB, Anderson SK, Buckner J, Yu C, Giannini C, Geoffroy F, et al. Phase II trial of vorinostat in combination with bortezomib in recurrent glioblastoma: a north central cancer treatment group study. Neuro-oncology. 2012 Feb;14(2):215-21. PubMed PMID: 22090453. Pubmed Central PMCID: 3266383.

433. Iwamoto FM, Lamborn KR, Kuhn JG, Wen PY, Yung WK, Gilbert MR, et al. A phase I/II trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin for adults with recurrent malignant glioma: North American Brain Tumor Consortium Study 03-03. Neuro-oncology. 2011 May;13(5):509-16. PubMed PMID: 21377994. Pubmed Central PMCID: 3093337.

434. Formenti SC, Demaria S. Systemic effects of local radiotherapy. The Lancet Oncology. 2009 Jul;10(7):718-26. PubMed PMID: 19573801. Pubmed Central PMCID: 2782943.

435. West AC, Smyth MJ, Johnstone RW. The anticancer effects of HDAC inhibitors require the immune system. Oncoimmunology. 2014 Jan 1;3(1):e27414. PubMed PMID: 24701376. Pubmed Central PMCID: 3962507.

436. Khan AN, Magner WJ, Tomasi TB. An epigenetic vaccine model active in the prevention and treatment of melanoma. Journal of translational medicine. 2007;5:64. PubMed PMID: 18070359. Pubmed Central PMCID: 2231344.

437. Demaria S, Ng B, Devitt ML, Babb JS, Kawashima N, Liebes L, et al. Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. International journal of radiation oncology, biology, physics. 2004 Mar 1;58(3):862-70. PubMed PMID: 14967443.

438. Liauw SL, Connell PP, Weichselbaum RR. New paradigms and future challenges in radiation oncology: an update of biological targets and technology. Science translational medicine. 2013 Feb 20;5(173):173sr2. PubMed PMID: 23427246. Pubmed Central PMCID: 3769139.

439. Seetharam S, Staba MJ, Schumm LP, Schreiber K, Schreiber H, Kufe DW, et al. Enhanced eradication of local and distant tumors by genetically produced interleukin-12 and radiation. International journal of oncology. 1999 Oct;15(4):769-73. PubMed PMID: 10493960.

440. Arrowsmith CH, Bountra C, Fish PV, Lee K, Schapira M. Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. Nature reviews Drug discovery. 2012 Apr 13;11(5):384-400. PubMed PMID: 22498752.

441. French CA. Small-Molecule Targeting of BET Proteins in Cancer. Advances in cancer research. 2016;131:21-58. PubMed PMID: 27451123.

442. Wadhwa E, Nicolaides T. Bromodomain Inhibitor Review: Bromodomain and Extra-terminal Family Protein Inhibitors as a Potential New Therapy in Central Nervous System Tumors. Cureus. 2016 May 21;8(5):e620. PubMed PMID: 27382528. Pubmed Central PMCID: 4917374.

443. Borbely G, Haldosen LA, Dahlman-Wright K, Zhao C. Induction of USP17 by combining BET and HDAC inhibitors in breast cancer cells. Oncotarget. 2015 Oct 20;6(32):33623-35. PubMed PMID: 26378038. Pubmed Central PMCID: 4741790.

444. Fiskus W, Sharma S, Qi J, Valenta JA, Schaub LJ, Shah B, et al. Highly active combination of BRD4 antagonist and histone deacetylase inhibitor against human acute myelogenous leukemia cells. Molecular cancer therapeutics. 2014 May;13(5):1142-54. PubMed PMID: 24435446.

445. Heinemann A, Cullinane C, De Paoli-Iseppi R, Wilmott JS, Gunatilake D, Madore J, et al. Combining BET and HDAC inhibitors synergistically induces apoptosis of melanoma and suppresses AKT and YAP signaling. Oncotarget. 2015 Aug 28;6(25):21507-21. PubMed PMID: 26087189. Pubmed Central PMCID: 4673282.

446. Mazur PK, Herner A, Mello SS, Wirth M, Hausmann S, Sanchez-Rivera FJ, et al. Combined inhibition of BET family proteins and histone deacetylases as a potential epigenetics-based therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma. Nature medicine. 2015 Oct;21(10):1163-71. PubMed PMID: 26390243. Pubmed Central PMCID: 4959788.

447. Shahbazi J, Liu PY, Atmadibrata B, Bradner JE, Marshall GM, Lock RB, et al. The Bromodomain Inhibitor JQ1 and the Histone Deacetylase Inhibitor Panobinostat Synergistically Reduce N-Myc Expression and Induce Anticancer Effects. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2016 May 15;22(10):2534-44. PubMed PMID: 26733615.

448. Abedin SM, Boddy CS, Munshi HG. BET inhibitors in the treatment of hematologic malignancies: current insights and future prospects. OncoTargets and therapy. 2016;9:5943-53. PubMed PMID: 27729803.

449. Mander AP, Sweeting MJ. A product of independent beta probabilities dose escalation design for dual-agent phase I trials. Statistics in medicine. 2015 Apr 15;34(8):1261-76. PubMed PMID: 25630638. Pubmed Central PMCID: 4409822.

450. Harrington KJ, Billingham LJ, Brunner TB, Burnet NG, Chan CS, Hoskin P, et al. Guidelines for preclinical and early phase clinical assessment of novel radiosensitisers. British journal of cancer. 2011 Aug 23;105(5):628-39. PubMed PMID: 21772330. Pubmed Central PMCID: 3188925.

451. Yap TA, Sandhu SK, Workman P, de Bono JS. Envisioning the future of early anticancer drug development. Nature reviews Cancer. 2010 Jul;10(7):514-23. PubMed PMID: 20535131.

452. Mangoni M, Vozenin MC, Biti G, Deutsch E. Normal tissues toxicities triggered by combined anti-angiogenic and radiation therapies: hurdles might be ahead. British journal of cancer. 2012 Jul 10;107(2):308-14. PubMed PMID: 22691970. Pubmed Central PMCID: 3394974.

453. Haston CK, Travis EL. Murine susceptibility to radiation-induced pulmonary fibrosis is influenced by a genetic factor implicated in susceptibility to bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Cancer research. 1997 Dec 1;57(23):5286-91. PubMed PMID: 9393751.

454. Monceau V, Pasinetti N, Schupp C, Pouzoulet F, Opolon P, Vozenin MC. Modulation of the Rho/ROCK pathway in heart and lung after thorax irradiation reveals targets to improve normal tissue toxicity. Current drug targets. 2010 Nov;11(11):1395-404. PubMed PMID: 20583978.

455. http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/docs/ctcaev3.pdf.

456. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). European journal of cancer. 2009 Jan;45(2):228-47. PubMed PMID: 19097774.

ANNEXE 1 - MATERIELS ET METHODES

REACTIFS, LIGNEES CELLULAIRES ET ANTICORPS

L'abexinostat (également nommé S78454-1 et PCI-24781-HCl par Pharmacyclics®), fourni par Technologie Servier® (Orléans, France), a été testé dans deux lignées de CBNPC au statut p53 sauvage : H460 et A549, de l'ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA). L'abexinostat a été dissout à 10mM dans du DMSO, aliquoté et stocké à -20°C pour ne congeler qu'une seule fois chaque aliquot. Les dilutions intermédiaires et finales ont été préparées extemporanément dans du milieu de culture complet pour les expérimentations in vitro et dans de la 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HβCD) 30 % à l'abri de la lumière pour les expérimentations in vivo. Les cellules ont été traitées par abexinostat aux concentrations indiquées, pour les durées indiquées et 24 h avant irradiation sauf mention contraire.

Le cisplatine (Cis-diammine-platinum (II) dichloride or CDDP) a été acheté chez Sigma Aldrich® (St. Quentin Fallavier, France). Le CDDP a été dilué dans du HβCD 30 % aliquoté et stocké à -20°C.

La Z-Val-Ala-Dl-Asp- fluoromethylketone (Z-VAD-FMK) a été achetée chez Bachem® et le 2-Hydroxypropyl-β- cyclodextrin (HβCD) chez Sigma®. Le solvant DMSO et les milieux de culture ont été utilisés comme contrôle.

Les anticorps primaires pour la détection de l'histone H3 acétylé (Lys9), de la caspase 3 clivée (Asp175), HIF1alpha, MRE11 et p95/NBS1 ont été achetés chez Cell Signaling Technology®. Les anticorps primaires dirigés contre les phospho H2AX et GAPDH ont été achetés chez Millipore®. Les anticorps primaires dirigés contre le cytochrome C, 53BP1, Rad51 et la β-actin ont été respectivement achetés chez BD pharmingen®, Bethyl Laboratories®, Calbiochem® and Sigma®.

Les anticorps secondaires conjugués anti-souri ou anti-lapin ont été achetés chez Southern Biotechnology®.

MILIEUX, CONDITIONS DE CULTURE ET IRRADIATION

Les cellules H460 ont été maintenues dans du milieu RPMI-1640 (Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (PAA laboratories®) et 100 unités/ml de pénicilline G sodium, 1% Hepes et 1% Sodium/pyruvate (Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA).

Les cellules A549 ont été maintenues dans du milieu F12-K media (ATCC, Manassas, USA) contenant 10 % de SVF (PAA laboratories®) et 100 unités/ml de pénicilline G sodium, 1 % Hepes et 1 % Sodium/pyruvate (Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA).

Toutes les cellules ont été maintenues en sous atmosphère contenant 5 % de CO2 à 37°C soit en normoxie (21 % O^2) soit en hypoxie (0.1 % O^2). En condition hypoxique, les cellules préalablement ensemencées ont été incubées avec 0.1 % d'O^2 durant 24 h puis traitées par abexinostat et l'hypoxie a été maintenue selon les durées indiquées pour chaque expérimentation. L'irradiation a été délivrée à température ambiante avec une dose unique de 2 à 6 Gy pour les expérimentations *in vitro* et selon un mode fraction à raison d'une fraction par jour pour les expérimentations *in vivo* et l'essai de phase I chez l'homme. Les irradiations des expérimentations in vitro et in vivo ont été réalisées sur un irradiateur IBL-687 (CIS-Bio International) avec un débit de dose de 1 Gy/min. Les irradiations pour l'essai de phase I ont été réalisées sur des accélérateurs linéaires, en photons d'une énergie minimale de 6 Mv.

SENSIBILITE AUX AGENTS PHARMACOLOGIQUES

La sensibilité des différentes lignées cellulaires aux différents agents (abexinostat, LBH, cetuximab, olaparib, cisplatine) a été évaluée par analyse du taux de prolifération cellulaire en réalisant des tests WST-1 avec analyse colorimétrique. Seuls les résultats pour l'abexinostat sur les 2 lignées de CBNPC sont présentés ici. Un jour après l'ensemencent en plaques de 96 puits, les cellules ont été exposées à des doses croissantes d'agents ou de solvant seul (DMSO) utilisé comme contrôle. Après 2 jours d'incubation, les tests WST-1 ont été réalisés selon les instructions du constructeur (Roche, Basel, Suisse). L'absorbance à 450 nm a été mesurée en utilisant un lecteur de plaques de type Biorad (Biorad Model 680 system, avec logiciel microplate Manger 5.2). Les valeurs ont été normalisées par rapport aux contrôles. Les IC50 représentent les concentrations pour lesquelles l'agent étudié réduit de 50 % le nombre de cellules viables.

TESTS CLONOGENIQUES

Pour les agents pharmacologiques testés, nous avons calculé le pourcentage de clones cellulaires survivants après exposition à la drogue +/- irradiation. Les cellules ont été ensemencées à différentes densités cellulaires (dépendant de la concentration de l'agent testé et de la dose d'irradiation) en boîtes T-25 dans 4 ml de milieu de culture pour atteindre entre 10 et 200 colonies par boîte. Puis, les cellules ont été exposées à l'agent pharmacologique à différentes concentrations 4h après ensemencement et irradiées à doses croissantes (de 0 à 6 Gy, Césium = Cs^{137}, 1 Gy par minute, irradiateur gamma IBL-637 de CIS-Bio International, IBA, Saclay, France) selon différentes séquences dépendant de l'agent testé. Après un changement de milieu de culture 24 h après irradiation, les cellules ont été mises en incubation durant 10-14 jours à 37°C, 5 % CO^2,

21 % ou 0.1 % O^2 et les clones cellulaires ont été colorés par Cristal Violet, lavés et comptés. Seules les colonies de plus de 50 cellules ont été prises en compte.

L'efficacité d'ensemencement (PE : Plating Efficiency) a été calculée en divisant le nombre de colonies formées par le nombre de cellules ensemencées. Chaque fraction survivante (SF : Surviving fraction) a été calculée en divisant la PE des cellules traitées par la PE des cellules non irradiées (contrôle). La fraction survivante à 10 Gy (SF10) a été calculée en appliquant l'équation linéaire quadratique : $SF = \exp[-\alpha xD-\beta D^2]$. Le facteur d'augmentation de la sensibilité (SER : Sensitization enhancement ratio) a été calculé en divisant la dose d'irradiation correspondant à 10 % de survie des cellules contrôle (incubées dans le milieu de culture sans l'agent pharmacologique testé) par la dose d'irradiation correspondant à 10 % de survie des cellules traitées par l'agent pharmacologique étudié. Chaque point sur les courbes de survie représente la moyenne des fractions survivantes d'au moins 3 expériences indépendantes.

Des tests clonogéniques ont été réalisés en situation d'hypoxie (0.1% d'O^2). Quatre heures après ensemencement, les cellules ont été placées en situation d'hypoxie en chambre à hypoxie (0,1 % d'O^2), puis traitées par irradiation (0-6 Gy) +/- l'agent pharmacologique testé selon les différentes séquences étudiées. Les cellules étaient sorties de l'hypoxie 24h après irradiation et replacées en conditions de culture sous atmosphère contenant 5% de CO^2 à 37°C et 21% d'O^2.

ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE

Les cellules ont été exposées aux drogues à différentes concentrations quatre heures après l'ensemencement et irradiées 24 h plus tard. A différents temps, les cellules ont été arrêtées et lavées avec du PBS 1X (Phosphate Buffering Sodium), puis trypsinées et centrifugées. Les cellules ont été conservées dans éthanol à 70 % et à -20°C. Les culots cellulaires ont été lavés dans du PBS et suspendus dans 200 µl de solution de iodure de propidium (PI) contenant 0.1 mg/ml de PI, 1 mg/ml de RNase et 20 mM d'EDTA dans du PBS 1X (pH 7.8). Après une heure d'incubation à 37°C, une analyse en cytométrie de flux a été réalisée sur un système BD LSR II (BD Biosciences, Stockholm, Suède). Pour l'étude de la mort cellulaire les cellules ont été analysées pour le marquage Annexine V de surface en utilisant le kit de marquage Annexine V/FITC (fluorescein-5-isothiocyanate) +/- Z-VAD-FMK selon les recommandations du producteur (MACS, Miltenyi Biothech, Bergisch Gladbach, Allemagne) ainsi que pour le marquage au 3.3 dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6 (3) de chez Molecular Probes) et au PI. Les données ont été analysées à l'aide des logiciels BD FACSDiva (Becton Dickinson) et FlowJo (Verity software House, Topsham, ME, USA). Le milieu de culture sans l'agent pharmacologique étudié a été utilisé comme contrôle.

WESTERN BLOTS

L'étude de l'impact des drogues sur l'expression protéique a été réalisée par Western Blot. Les cellules ont été traitées par l'agent et irradiées à différents temps et différentes doses. Aux temps indiqués, les cellules ont été lavées (PBS 1X), puis lysées avec un tampon contenant 20 mM Hepes, 10 mM KCl, 1mM EDTA, 0.1 % NP40, 10 % glycérol, un cocktail inhibiteur de protéase (EDTA-free protease inhibitor tablets, Roche®) et un inhibiteur de phospatase (phosphoSTOP tablets, Roche®). Après extraction des protéines dans la glace, le dosage protéique a été réalisé en utilisant le kit Biorad® (Hercules, USA), selon les instructions du constructeur. Puis la concentration protéique a été mesurée en utilisant le système Biorad Model 680, avec un microplate Manager 5.2. Après dénaturation des protéines à 95°C pendant 5 minutes, 30 µg de protéines ont été déposées dans un gel dénaturant d'acrylamide à 4–12 % (NuPaAGE® Bis-tris Gel, Invitrogen, San Diego, USA). Après la migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF (polyvinylidene fluoride, Amersham) par électro transfert à 40 V durant une heure. La membrane a été lavée avec du TBX 1X/Tween-20 à 0.1 % puis saturée pendant une heure dans du TBS1X/Tween à 0.1 % contenant 5 % d'albumine de sérum de bœuf ou lait 5 %.

Les membranes ont été incubées durant la nuit à 4°C avec les anticorps primaires suivants : GAPDH, actine, Acétyl Histone H3 (Lys9) (H3-Ac), HIF1 alpha, caspase 3 clivée (Asp175), phospho H2AX (pH2AX), MRE11, p95/NBS1 et Rad51 indiqués ci-dessus.

Un anticorps secondaire marqué à la peroxydase dirigé contre les anticorps de lapin ou de souris correspondants de GE Healthcare (Buckinghamshire, UK) a été utilisé pour détecter l'anticorps primaire puis révélé par un système de détection Dura (Thermo Fisher Scientific) sur une G-Box Chemi XL 1.4 (Syngene) permettant l'enregistrement des images.

Un contrôle de dépôt a été réalisé en utilisant un anticorps spécifique de la β-actine ou de la GAPDH.

Pour les westerns blots réalisés à partir de broyat de tumeurs ex vivo, les protéines totales ont été extraites dans le tampon de lyse et l'Acétyl Histone H3 (Lys9) (H3-Ac) détecté selon la même procédure.

IMMUNOFLUORESCENCE

Les cellules étudiées ont été cultivées sur lames en plaques de 6 puits et traitées avec l'agent pharmacologique étudié à différentes concentrations ou du milieu de culture sans agent pharmacologique utilisé comme contrôle. Les cellules ont été irradiées aux doses et temps indiqués. Puis, aux temps indiqués, les cellules ont été fixées dans du para formaldéhyde 4 % pendant 20 minutes et perméabilisées dans du SDS à 0.1 % pendant 10 minutes. Les sites de fixation non spécifiques ont été bloqués par saturation à la BSA pendant 30 minutes puis les lames ont été incubées avec les anticorps primaires de caspase 3, cytochrome C, ɣH2AX, 53BP1 ou

Rad51 (1/200). Les lames ont été lavées 3 fois au PBS 1X et incubées avec les anticorps secondaires conjugués Alexa Fluor 488 ou Alexa Fluor 568 (Molecular Probes) pendant 1 h (1/500). Les cellules ont été marquées au Hoescht 33342 (Life technologies) et analysées par microscopie confocale sur un Leica SP8 avec un objectif 63x.

XENOGREFFES TUMORALES

Afin d'évaluer si les effets *in vitro* des agents testés pouvaient être étendus aux modèles *in vivo*, les cellules tumorales ($2.5.10^6$ cellules A549 ou H460 par injection) ont été inoculées en sous-cutané dans le flanc droit de souris nude femelles âgées de 6 à 8 semaines (Janvier CERT, Le Genest St.Isle, France). Les animaux porteurs de tumeurs d'environ 60 à 100 mm^3 de volume (estimé par la formule suivante : largeur x longueur x hauteur / 2) ont été traités par injection intrapéritonéale (IP) pour les agents testés *in vivo* (abexinostat, LBH589, olaparib, cetuximab, cisplatine). Les souris (6 à 10 par groupe selon les expérimentations) ont été allouées aux différents groupes de traitement par tirage au sort.

Les souris ont été hébergées en conditions protégées, sans agent pathogène, en respectant un rythme veille/sommeil avec 12 h avec éclairage et 12 h sans éclairage à 21~23 °C et 60~85% d'humidité avec accès ad libitum à la nourriture et à l'eau stérilisés. Les expériences ont été faites dans le respect des recommandations de la fédération européenne des laboratoires scientifiques animaliers (Federation of European Laboratory Animal Science Association : FELASA). Les expérimentations animales ont été approuvées par le comité d'éthique (CEEA IRCIV / IGR, avec l'enregistrement du ministère français de la recherche) et réalisées en accord avec la directive européenne EU 63/2010. Les expériences in vivo étaient réalisées sous la licence n°D94-076-11 (Ministère de l'Agriculture).

L'abexinostat dissout dans du HβCD 30% a été utilisé à différentes concentrations et selon différents schéma d'administration comme indiqué dans les travaux présentés. Pour l'étude soumise à publication sous la référence #018532 : 4 groupes de 10 souris ont été traités par injection IP du véhicule (HβCD 30%), d'abexinostat à 25 mg/kg deux fois par jour (avec 4 jours de traitement, 3 jours d'interruption, 4 jours de traitement, 3 jours d'interruption, 4 jours de traitement), le véhicule et l'irradiation (avec une fraction quotidienne de 2 Gy/J à J2, J3 et J4), ou la combinaison d'abexinostat et irradiation selon les mêmes modalités avec chaque fraction délivrée 1 h après la deuxième injection d'abexinostat du jour.

L'irradiation sélective des tumeurs de souris a été délivrée au moyen de rayons X de 200 kV générés par un Tube Varian NDI 226 (200 kV, 15 mA, filtre de 0.2 mm en Cuivre) avec une distance source-peau de 21 cm. Le débit de dose utilisé a été de 0,87 Gy/min.

La croissance tumorale et le poids des souris ont été mesurés deux fois par semaine. Le volume a été évalué à partir des mesures faites au pied à coulisse et suivant la forme suivante : (longueur x largeur^2)/2. Les souris ont été sacrifiées lorsque le volume tumoral a dépassé 1800 mm^3 ou lorsque leur perte de poids a dépassé 20 % du poids du corps.

Dans deux expérimentations indépendantes, des broyats de tumeurs ont été préparées ex vivo à partir de xénogreffes de cellules H460 prélevées 1 h, 4 h ou 17 h après l'irradiation (c'est-à-dire 4 h, 7 h, 20 h après la seconde injection d'abexinostat du jour) sur 4 jours consécutifs de traitement par abexinostat à 25 mg/kg 2 fois par jour avec ou sans irradiation à 2 Gy/J à J2, J3 et J4. Les tumeurs prélevées ont été immédiatement congelées en azote liquide après mesure de leur poids sec. Les broyats de tumeurs ont été stockés à -80°C avant analyse. La concentration finale d'abexinostat a été déterminée dans la tumeur par normalisation sur le poids de la tumeur prélevée.

Dans une expérience indépendante selon le même protocole qu'initialement décrit dans la section xénogreffes tumorales, lorsque les greffes de cellules A549 ont atteint un volume de 65 à 100 mm3, les souris ont été allouées par tirage au sort à 8 groupes (n=10 souris par groupe) et traitées avec +/- abexinostat IP 25 mg/kg X 2/J (5 jours de traitement, 4 jours sans traitement, 3 jours de traitement, 3 jours sans traitement, 5 jours de traitement) +/- cisplatine IP 1mg/kg 1 h avant l'irradiation au J2, et au J16 +/- irradiation à 2 Gy/J à J2, J3 et J4, 1 h après la deuxième injection d'abexinostat du jour de traitement correspondant. Le véhicule (HβCD 30%) a été utilisé comme contrôle.

ETUDE HISTOLOGIQUE ET IMMUNOHISTOCHIMIQUE

Des analyses histologiques et immunohistochimiques ont été réalisées dans le cadre de l'évaluation de l'abexinostat. Après sacrifice des souris, les xénogreffes tumorales ont été prélevées et divisées en 2. Une partie a été fixée dans du FineFix l'autre congelée en azote liquide puis conservée à -80°C. Des blocs ont été inclus dans la paraffine après fixation.

MODELES DE FIBROSE PULMONAIRE RADIO INDUITE

Afin d'évaluer la toxicité potentielle de l'abexinostat sur le tissu pulmonaire sain et en particulier le risque de fibrose pulmonaire induite par l'abexinostat seul ou de majoration de la fibrose pulmonaire radio induite lors de l'association abexinostat-irradiation nous avons utilisé un modèle mis en place dans l'unité INSERM 1030 adapté des protocoles publiés par Mangoni *et al.*, Haston *et al.*, Monceau *et al.* (452-454). Les souris irradiées ont été anesthésiées à l'isofluoran (Forane, Abbott, Abbott Park, IL, USA) à 2–4 % en O^2 administré au masque. Une fois anesthésiées les souris ont été placées dans leur système de contention en plastique en position

ventrale et irradiées 3 par 3. L'anesthésie induisant une baisse de la température corporelle des souris celles-ci ont été placées sous lampe chauffante permettant le maintien de leur température corporelle pendant la procédure d'irradiation. L'irradiation é été délivrées à l'aide d'un tube à rayons X de type Varian NDI 226 (200 kV, 15 mA, filtre de 0.2 mm en Cuivre) avec une distance source-peau de 21 cm. Le débit de dose utilisé a été de 0,87 Gy/min. L'ensemble du corps des souris à l'exclusion de la région pulmonaire a été protégé par un cache plombé de 1cm d'épaisseur. Dans ce modèle nous avons évalué une irradiation délivrant 9 x 3.5 Gy en combinaison avec de l'abexinostat selon un schéma d'administration intensifié d'abexinostat représenté figure…. L'abexinostat a été donné 5j/7 sur 2 semaines aux doses de 100 ou 50mg/kg/j en une seule injection IP/j. L'abexinostat a été débuté 48h avant l'irradiation et les jours d'irradiation l'abexinostat a été administré 1h avant l'irradiation. Les souris ont été sacrifiées à 10 semaines et 22 semaines du début du traitement. Les poumons ont immédiatement été prélevés, lavés au sérum physiologique isotonique et fixés dans du Finefix (Milestone, Torre Baldone (BG), Italy) pendant 24h pour analyse histologique. Selon notre protocole standard, les prélèvements ont ensuite été inclus en paraffine et des coupes de 5-6µm d'épaisseur ont été préparées et colorées à l'hématoxyline éosine.

ETUDE DE PHASE I

Cette étude a été conduite dans le respect des standards d'éthique, conformément à la déclaration d'Helsinki et selon les recommandations nationales et internationales après approbation par les investigateurs, les commissions d'essais thérapeutiques des établissements participants, le comité d'éthique, le comité pour la protection des patients (CPP) et l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM). Un consentement éclairé écrit et signé a été obtenu de chaque patient avant toute participation à l'étude.

Nous avons conduit cette étude exploratoire de phase I, d'escalade de dose, ouverte, de manière multicentrique internationale dans 6 centres en Italie et en France. Les patients éligibles ont tous présentés une tumeur solide, mesurable, confirmée histologiquement relevant d'une indication de radiothérapie palliative, hypo fractionnée. Cette étude a inclus des patients présentant des tumeurs solides métastatiques avec des maladies localement avancées dont le primitif a nécessité une irradiation avant traitement systémique, des tumeurs non irradiées préalablement, des primitifs en rechute ainsi que des tumeurs nécessitant une irradiation hypo fractionnée, des localisations secondaires nécessitant une irradiation hypo fractionnée et des patients dans un état ne permettant pas de recevoir la radio chimiothérapie conventionnelle. On note également dans les critères d'éligibilité un « Eastern Cooperative Oncology Group » ou ECOG ≤2, une espérance de vie > 20 semaines, une fonction rénale, cardiaque, hépatique et hématologique adéquate. Les critères de non inclusion comprennent les greffes allogéniques de moelle osseuse, une chirurgie lourde dans les 4 semaines avant le premier jour de traitement, une chimiothérapie dans les 3 semaines (6 semaines en cas de nitrosourés) avant le début du

traitement à l'étude, un antécédent de radiothérapie sur la zone traitée dans le cadre du protocole, une immunothérapie ou une hormonothérapie dans les 2 semaines avant le début du traitement protocolaire sauf pour les cancers de prostate stables sous agonistes de la LHRH, les insuffisances surrénaliennes stables sous glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes, carcinome surrénaliens stables sous mitotane ou contraceptifs oraux avec d'autres traitements antinéoplasiques dans les 3 semaine, sont également non éligibles les patients sous anticoagulants par anti vitamine K, les patients sous traitements connus pour prolonger l'intervalle QT corrigé, les patients sous acide valproïque dans les 5 jours avant le début de l'étude et les patients sous facteurs de croissance hématopoïétiques prophylactiques.

L'abexinostat associé à une radiothérapie fixe à la dose de 30 Gy en 10 fractions quotidiennes de 3 Gy/j, 5 jours par semaine sur 2 semaines a été administré selon 2 schémas. Le premier schéma de traitement a délivré l'abexinostat une semaine avant de débuter la radiothérapie hypo fractionnée pour permettre la survenue des modifications intracellulaires liées au traitement, puis l'abexinostat a été continué de manière concomitante avec la radiothérapie hypo fractionnée sur 2 semaines. L'abexinostat a été administré 2 fois par jour oralement du premier au 5ème jour puis pendant la radiothérapie du 8ème au 12ème jour et du 15ème au 19ème jour (figure…). Ce schéma avec une alternance de 5 jours de traitement et 2 jours sans traitement (schéma 1) a été choisi en se basant sur la tolérance et l'activité de l'abexinostat observées dans l'étude clinique PCYC-0402 (426). Pour assurer des marges de sécurités dans notre évaluation de l'abexinostat en combinaison avec la radiothérapie, nous avons débuté l'administration d'abexinostat à la dose de 15 mg/m² 2 fois par jour ce qui correspond à 25% de la dose recommandée de 60mg/m² 2 fois par jour obtenue dans l'étude PCYC-0402 et un niveau de dose au-dessous de la dose initiale utilisée dans l'étude PCYC-0402 (426). Pour le schéma 2, l'abexinostat et l'irradiation ont été administrés de manière concomitante du premier au 4ème jour et du 8ème au 11ème jour de traitement (figure…). Le schéma alternant 4 jours de traitements, 3 jours sans traitement (schéma 2) a été choisi d'après la tolérance de l'abexinostat observée dans l'étude clinique CL1-78454-002 (426). Ce schéma est associé au plus faible risque de thrombopénie dans les schémas testés et les doses de 75 mg/m² x 2/j, 90 mg/m² x 2/j et 105 mg/m² x 2/j ont été testées (426).

Pour les schémas 1 et 2, la radiothérapie a été administrée selon une technique conformationnelle 3D standard. Les patients ont reçu une radiothérapie externe hypo fractionnée délivrée par un accélérateur linéaire de particules à l'aide de photons d'énergie ≥4mégavolts. Les patients des 2 schémas ont été classés en 2 groupes selon la localisation du site à irradier (sous diaphragmatique ou sus diaphragmatique) de façon à évaluer séparément les possibles toxicités spécifiques à la région irradiée.

Notre étude a suivi une escalade de dose selon un schéma classique 3 + 3 jusqu'à atteindre la dose maximum tolérée (MTD) basée sur la définition des toxicités doses-limitantes préétablie dans le protocole (DLT) et correspondant à la survenue au cycle 1 d'au moins une des toxicités suivantes : effet secondaire (AE) non hématologique de grade 3, prolongation de

l'intervalle QTc de grade 3, neutropénie de grade 4 persistant plus de 5 jours sous facteur de croissance, thrombopénie de grade 4, impossibilité de reprise du traitement par abexinostat dans un délais de 2 semaines. L'escalade de dose au niveau de dose suivant s'est fait après évaluation des DLT sur une période de traitement de 3 semaines pour le schéma 1, sur une période de traitement de 2 semaines pour le schéma 2, et après 3 semaines sans traitement. L'évaluation de la réponse tumorale a été réalisée 3 semaines après la fin du traitement et après 2 mois de suivi. Les effets secondaires ont été gradés à chaque visite selon classification internationale «Common Toxicity Criteria for Adverse Events » (CTCAE) v3.0 (455). Les évènements indésirables considérés comme grave (« serious adverse events» (SAE)) sont ceux létaux, menaçant la vie du patient, nécessitant une hospitalisation, handicapant ou jugé médicalement significatifs.

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer la toxicité et la tolérance du traitement par abexinostat oral en combinaison avec la radiothérapie hypo fractionnée chez des patients présentant des tumeurs solides de stade avancé afin de déterminer la MTD et d'établir des recommandations de dose pour une éventuelle future étude clinique de phase II. Les objectifs secondaires de cette étude sont d'évaluer la réponse tumorale à la combinaison abexinostat et radiothérapie et d'analyser les profils pharmacocinétiques de l'abexinostat et de ses métabolites. La réponse tumorale définie par le taux de réponse locorégionale et le taux de réponse globale a été évaluée selon les critères internationaux « revised Response Evaluation Criteria in Solid Tumors » (RECIST) version 1.1 (456).

Le taux de réponse globale a été définit comme la proportion de patient présentant soit une réponse complète (CR) soit une réponse partielle (PR) selon les critères RECIST (version 1.1). Le taux de réponse locorégionale a été définit comme la proportion de patients présentant une CR, une PR des lésions comprises dans les champs d'irradiation selon les critères RECIST (version 1.1). Les lésions ont été évalués cliniquement et par imagerie scanner. Un électrocardiogramme a été réalisé lors de l'inclusion du patient dans l'étude, une heure avant , une heure après et 1.5 heures après la première administration d'abexinostat le 1^{er}, $3^{ème}$, $8^{ème}$, $15^{ème}$ et $19^{ème}$ jours ainsi qu'à la visite de fin de traitement pour le schéma 1 et au 1^{er}, $4^{ème}$, $8^{ème}$ et $11^{ème}$ jours ainsi qu'à la visite de fin de traitement pour le schéma 2.

METHODE STATISTIQUE

Les analyses statistiques ont été réalisées sur Graph Pad Prism 6.0 software (Graph Pad, San Diego CA) et Biostat TGV. Sauf si spécifié, les données ont été exprimées comme des moyennes +/- déviations standard (SD) ou erreurs standard de la moyenne (SEM), en fonction des expérimentations. Pour les expériences in vitro, la significativité statistique a été déterminée par t-test de Student. Une analyse ANOVA a été utilisée pour déterminer la significativité des différences de volume tumoral *in vivo*. Les valeurs de p inférieures à 0.05 ont été considérées comme significatives. Les courbes modélisées de survie cellulaire après irradiation ont été

construites en appliquant un modèle linéaire quadratique. Les expériences ont été conduites en triplicats sauf mention contraire.

Pour l'étude de phase I, les analyses d'efficacité ont été réalisées sur l'ensemble des données, incluant les patients ayant reçu au moins une dose d'abexinostat et qui ont eu au moins une évaluation tumorale de départ et une évaluation tumorale par la suite. La meilleure réponse clinique a été évaluée par les investigateurs pour chaque niveau de dose sur l'ensemble de la population étudiée par schéma de traitement et par groupe sus ou sous diaphragmatique. Les taux de réponse (réponse locorégionale et réponse globale) ainsi que leurs intervalles de confiance à 95% sont présentés. Les analyses de toxicité ont été menées avec une description des DLT sur la population évaluable pour les DLT comprenant :

- les patients ayant complété la période totale de traitement de 3 semaines dans le schéma 1 ou de 2 semaines dans le schéma 2 ainsi qu'une période de 3 semaines après traitement (période d'évaluation)

-les patients ayant interrompu leur traitement du fait d'une DLT en cours de traitement ou dans les 3 semaines suivant le traitement.

Une analyse statistique descriptive a été utilisée pour évaluer les toxicités selon la CTCAE v3.0, les effets secondaires, l'état général, les signes vitaux, l'examen clinique et les paramètres biologiques.

ANNEXE 2 - ARTICLES

ARTICLES ACCEPTES POUR PUBLICATION (ONCOTARGET)

- **"Time dependent modulation of tumor radiosensitivity by a pan HDAC inhibitor : abexinostat"**

Time dependent modulation of tumor radiosensitivity by a pan HDAC inhibitor: abexinostat

Sofia Rivera[1,2], Céline Leteur[1,2], Frédérique Mégnin[3], Frédéric Law[1,2], Isabelle Martins[1,2], Ioana Kloos[4], Stéphane Depil[4], Nazanine Modjtahedi[1,2], Jean Luc Perfettini[1,2], Christophe Hennequin[5], Eric Deutsch[1,2]

[1]Department of Radiotherapy, Gustave-Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

[2]2INSERM 1030 Molecular Radiotherapy, Villejuif, France, 3Faculté de Medecine, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France

[3]INSERM U1196/UMR9187 CMIB, Institut Curie-Recherche, Université Paris Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France

[4]IRIS: Institut de Recherches Internationales Servier, Suresnes, France

[5]Department of Radiation Oncology, Hôpital Saint Louis, APHP, Paris, France

Correspondence to: *Eric Deutsch,* ***email:*** *eric.deutsch@gustaveroussy.fr*

Keywords: *epigenetics, radiosensitivity modulation, HDAC inhibitors, non-small cell lung cancer, radiotherapy*

Received: *July 22, 2016* ***Accepted:*** *November 30, 2016* ***Published:*** *January 25, 2017*

ABSTRACT

Despite prominent role of radiotherapy in lung cancer management, there is an urgent need for strategies increasing therapeutic efficacy. Reversible epigenetic changes are promising targets for combination strategies using HDAC inhibitors (HDACi).

Here we evaluated on two NSCLC cell lines, the antitumor effect of abexinostat, a novel pan HDACi combined with irradiation *in vitro* in normoxia and hypoxia, by clonogenic assays, demonstrating that abexinostat enhances radiosensitivity in a time dependent way with mean SER10 between 1.6 and 2.5 for A549 and H460. We found, by immunofluorescence staining, flow cytometry assays and western blotting, in abexinostat treated cells, increasing radio-induced caspase dependent apoptosis and persistent DNA double-strand breaks associated with decreased DNA damage signalling and repair. Interestingly, we demonstrated on nude mice xenografts that abexinostat potentiates tumor growth delay in combined modality treatments associating not only abexinostat and irradiation but also when adding cisplatin.

Altogether, our data demonstrate *in vitro* and *in vivo* anti-tumor effect potentiation by abexinostat combined with irradiation in NSCLC. Moreover, our work suggests for the first time to our knowledge promising triple combination opportunities with HDACi, irradiation and cisplatin which deserves further investigations and could be of major interest in the treatment of NSCLC.

INTRODUCTION

Epigenetics is a promising field of research with growing preclinical and clinical data providing new avenues for cancer treatment. In the absence of DNA sequence alteration, gene expression driven by epigenetic changes is crucial to tumor onset and progression [1-3]. Epigenetic changes such as acetylation, methylation, phosphorylation, ubiquitination and sumoylation lead to modifications of the structure of nucleosomes impacting chromatin condensation and transcription [1, 4, 5]. Histone deacetylases (HDACs) remove acetyl groups from histones, leading to a more compact form of chromatin, favoring gene expression patterns that promote tumor development. In contrast to genetic alterations, epigenetic changes are dynamic and can be reversed and therefore can be good therapeutic targets [6].

Small molecules inhibiting HDACs activity called HDAC inhibitors (HDACi) are considered of high anti-tumor potential. Some are either already approved in clinic as vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, Zolinza; Merck), romidepsin (Istodax; Celegene) and belinostat (Beleodaq; Spectrum Pharmaceuticals) for T-cell lymphomas treatment or under clinical trials

alone or in combination in various hematological and solid malignancies [7, 8]. More than 28 HDACi are under development [8]. Most of them target multiple HDACs which makes it difficult to identify the biological mechanisms responsible for HDACi anti-tumor effect. Eighteen HDACS grouped in 4 classes have been described in humans. Bantscheff *et al* have developed a chemoproteomic method to test the affinity of various HDACi. They have shown that HDACi activity is dependent on the macromolecular complexes in which various HDACs can reside [9]. They provided evidence in favor of a strong binding and histone hyperacetylation with pan HDACi. This suggests using pan HDAC inhibitors like vorinostat., panobinostat or the here studied abexinostat rather than more specific HDACi [9]. Selective class IIa specific HDACi have recently been developed and failed to induce significant apoptosis or gene expression changes [10]. New class I selective HDACi such as mocetinostat are under development and have shown promising apoptosis induction and broad antitumor activity spectrum [11-14]. Other selective HDACi and polypharmacological HDACi are currently under evaluation [8].

In solid tumors, HDACi used as monotherapy in early phase clinical trials have been rather disappointing [15]. More encouraging results have been reported from preclinical combination trials associating HDACi with other anti-tumor agents. *In vitro* and *in vivo*, data suggest that the anti-tumor effect of HDACi might be due to the induction of cell cycle arrest, differentiation, cell death through various mechanisms (apoptosis, autophagy) and induced alteration in DNA repair capacity [2, 3, 16, 17]. Irradiation exposure causes DNA damage either by direct effect or indirect effect through reactive oxygen species production creating DNA single and double strand breaks (SSBs, DSBs). DSBs, more substantial and potentially lethal DNA damage, can be repaired through non-homologous end joining (NHEJ) or homologous recombination (HR) mechanisms. HDACi have been reported to repress HR-related gene expression providing a strong rationale for radiosensitization using these compounds even though mechanisms of radiosensitization seem to be multiple and deserve further investigation [3, 18].

With a median 5 year survival rate about 18%, lung cancer remains the leading cause of cancer death [19]. Non-small cell lung carcinomas (NSCLC) represent 85% of lung cancers. In most cases patients are diagnosed with unresectable disease. The standard of care for locally advanced unresectable NSCLC patients relies on the combination of a platinum based doublet of chemotherapy and concomitant radiotherapy [20]. Despite improvement in radiotherapy techniques and systemic treatment, very little progress has been made over the last decades regarding the combination of drugs and radiotherapy in this setting even though there is a major room for improvement and public health issue. There is no survival advantage to date in randomized phase III trials combining targeted agents with radiotherapy or chemoradiotherapy in locally advanced NSCLC. Most attention has been focused on epidermal growth factor (EGFR) inhibitors with either monoclonal antibodies, such as cetuximab, or tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs), such as gefitinib or erlotinib [21]. After disappointing results in unselected patient populations, investigations are ongoing to combine EGFR-TKI with radiotherapy in EGFR mutated tumors [ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01391260; NCT01091376; NCT01822496]. In non-mutated tumors, radiotherapy and targeted agents combination options under clinical investigation are limited.

The present study investigates the effect of abexinostat, a pan HDACi, on 2 EGFR wild type NSCLC cell lines *in vitro* and *in vivo*. Our findings here demonstrate that abexinostat induces a radiosensitizing effect, and yields to an increased tumor response *in vivo*. The increase of tumor cell kill through increased apoptosis arises from an impairment of DNA repair protein levels. DNA repair impairment accounts for a marked time and schedule dependency of the combination observed *in vivo*. Moreover, our work suggest, for the first time to our knowledge, promising triple combination opportunities with HDACi, irradiation and cisplatin which deserves further investigations and could be of major interest in the treatment of NSCLC.

RESULTS

Abexinostat radiosensitizes NSCLC cells *in vitro* in normoxia and hypoxia

A dose-dependent cell proliferation inhibition effect of abexinostat was observed in both A549 and H460 NSCLC cells (Figure 1A-1B respectively). IC50 value at 48h for A549 and H460 were 1.75µmol/L and 2µmol/L respectively, suggesting that A549 are more sensitive to abexinostat alone than H460. We tested the effect of abexinostat on clonogenic survival after irradiation in A549 and H460 cells. Exposure to abexinostat 24h before irradiation significantly decreased surviving fractions at 6Gy (SF6), for both A549 and H460, in a concentration-dependent manner, in normoxic (O^2=21%) (Figure 1C-1D) and hypoxic conditions (O^2=0.1% 24h before treatment as described under material and methods) (Figure 1E-1F). Corresponding surviving fractions were plotted versus dose and fit to a linear quadratic model (Supplementary Figure 1C-1F). Interestingly, SF6 was not decreased when abexinostat was given immediately before irradiation (data not shown). Calculation of α/β ratios and sensitization enhancement ratios at 10% cell survival (SER10, ratio of doses to achieve 10% cell survival without abexinostat to those with abexinostat), in normoxia and hypoxia, showed increased radiosensitivity with abexinostat, even in hypoxic condition, for both A549 and H460 cell lines (Supplementary Figure 1A-1H, Supplementary Table 1). As expected, controls with culture medium alone were

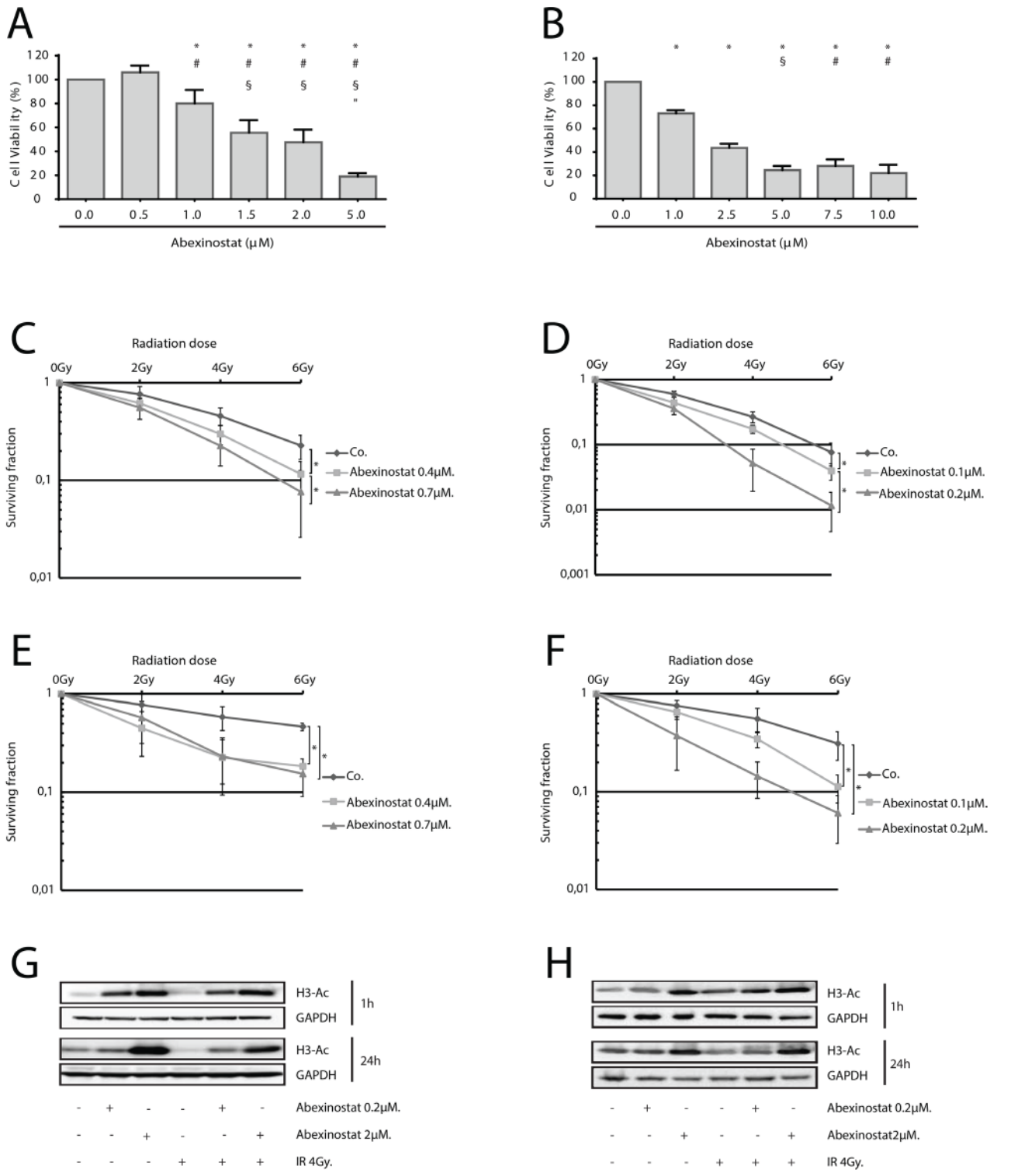


Figure 1: Radiosensitization of NSCLC cells by HDAC inhibition by abexinostat *in vitro* in normoxic and hypoxic conditions. IC50 determined at 48h by WST-1 assay were 1.75µmol/L and 2µmol/L for A549 **A.** and H460 **B.** respectively. Results represent means ± SD (n=3; t-test; for A549 (A) $^{+,\#,\S,"}P < 0.05$ versus control, abexinostat 0.5µM, 1µM, 1.5µM respectively; for H460 (B) $^{+,\#,\S}P < 0.05$ versus control, abexinostat 1µM, 2.5µM respectively). A549 cells **C, E, G.** and H460 cells **D, F, H.** were treated with indicated increasing concentrations of abexinostat (culture medium as control) for 24 hours then irradiated or not at indicated doses. Clonogenic radiation survival of abexinostat treated A549 (C, E) and H460 (D, F) cells in normoxic (C, D) or hypoxic (0.1% O^2) (E, F) conditions were measured as described under materials and methods. Culture medium was used as control. Results represent means ± SD (n=3; t-test; *P < 0.05). Error bars represent standard deviations. Acetylation of histone H3 was evaluated by Western blotting 1h and 24h after irradiation in A549 (G) and H460 (H) cells. GAPDH served as loading control. Representative Western blots are shown (n=3).

less radiosensitive in hypoxia than in normoxia for both A549 and H460 cell lines (Figure 1C-1F, Supplementary Table 1). Using A549 cells, exposed to abexinostat 0.7μM starting from 24 hours before irradiation, mean SER10 varied between 1.41 in normoxia and 2.33 in hypoxia. Using H460 cells, exposed to abexinostat 0.2μM in similar conditions, mean SER varied between 1.85 in normoxia and 3.16 in hypoxia. Corresponding D10 are shown in Supplementary Figure 1A-S1B with lower D10 when cells are exposed to abexinostat in normoxia and hypoxia in both cell lines. An isobologram analysis was performed as described under material and methods, for both A549 and H460 cell lines in normoxie and hypoxia (Supplementary Figure 1G-1J). In normoxia, data points for combination fell into the area of additivity for A549 cells (G) and into the supra-additivity zone for H460 cells (H). However, for this latter, the statistical test was not significant (p value = 0.25). In hypoxia, the dose-survival curves are exponential for both abexinostat alone and radiation alone as expected. In this case, the isobologram lines for Mode I and Mode II are combined and all the experimental data points for combination fell into the supra-additive zone (I,J).

Using acetyl histone H3 as a marker of HDACi inhibitory activity, we assessed Histone de-acetylation inhibitory effect of abexinostat on A549 and H460 cells in normoxia (O^2 21%) [22, 23]. Cells were treated with abexinostat at increasing doses for 24h then exposed to 4Gy irradiation. Expression of acetylated histone H3 was tested 1h and 24h after irradiation by western blot. We found a time and concentration-dependent increased acetylated histone H3 in both investigated cell lines (Figure 1G-1H). Effective histone H3 acetylation could be observed as off 1h of exposure to abexinostat with a remaining effect after a prolonged exposure of 24h (Figure 1G-1H).

Abexinostat increases apoptosis and irradiation-induced apoptosis

We found a concentration and time-dependent increased percentage of subG1 population when treating H460 cells with abexinostat, either alone or in combination with irradiation 4Gy. We observed enhanced cell death after exposure to abexinostat 0.2μM for 24 hours before irradiation in H460 cells (Figure 2A-2B). Similar combination yielded to a significant depletion of S-phase populations when H460 cells were exposed to abexinostat 2μM for 24 hours prior irradiation (Figure 2B). In contrast, there was no increased subG1 population nor enhanced cell death observed when starting abexinostat concomitantly with irradiation compared to irradiation alone (data not shown).

To assess whether the observed increase in subG1 population was due to increased apoptosis we used a staining by propidium iodide (PI) and 3.3' dihexyloxacarbocyanine iodide (DIOC6) which labels mitochondria and correlates to the reduction of mitochondrial trans-membrane potential. Cells were stained with DIOC6 and PI to determine the mitochondrial transmembrane potential and viability, respectively. We monitored the frequency of dying and dead cells by co-staining with the mitochondrial transmembrane potential sensitive dye DiOC6 and the vital dye PI, considering that dying cells have a reduced transmembrane potential but still intact plasma membranes (DiOC6 low/PI-) while dead cells have permeabilized plasma membranes (DiOC6 low/PI+) as described by Zamzami et al [24, 25]. H460 cells were treated with abexinostat at 0.2μM or 2μM for 24h before expose to 4Gy irradiation. PI and DIOC6 staining were performed 24h or 48h after irradiation. Abexinostat significantly increased both basal and post irradiation cell death as shown by increased DIOC6-/PI+ population in H460 cells relative to culture medium controls in a dose dependent manner (Figure 2C-2D). Abexinostat significantly increased both basal and post irradiation DIOC6-/PI- population 48h after irradiation suggesting apoptosis induction with mitochondrial depolarization in H460 cells (Figure 2C-2D).

Apoptosis induced by abexinostat is caspase-dependent

To investigate whether observed apoptosis was caspase-dependent, we assessed AnnexinV and PI staining with or without Z-vad used as an apoptosis caspase-dependent inhibitor. H460 cells were treated with indicated increasing concentrations of abexinostat for 24h then irradiated or not at 4Gy. Assessment was performed 24h and 48h after time of irradiation (Figure 3A-3B). Z-vad significantly decreased AnnexinV+/PI- population in H460 cells treated with abexinostat 0.2 and 2μM (Figure 3A-3B). We equally showed that caspase-dependent apoptosis was significantly increased by the abexinostat-IR combination compared to irradiation alone (Figure 3A-3B). Cells treated with abexinostat 0.2μM only showed a moderate increased cell death, whereas cells treated with combined irradiation and abexinostat 0.2μM showed a significant increase in caspase-dependent apoptosis (Figure 3A-3B). In contrast, exposure to higher doses of abexinostat (2μM) alone was associated with a higher proportion of cell death (Annexin V+/PI+). At this dose (2μM) combined irradiation and abexinostat treatment did not showed any significant difference in caspase-dependent apoptosis between abexinostat alone and the combined treatment possibly due to a high cytotoxicity of abexinostat alone as shown by a mean cell death rate of 20.9% and 34.2% at 24h and 48h respectively (Figure 3A-3B). To confirm these results we assessed caspase 3 activation by assessing caspase 3 cleavage and cytochrome C release in H460 cells by immunostaining and found abexinostat 0.2μM significantly increased both basal and post irradiation caspase 3 cleavage and cytochrome C

release 1h and 24h after irradiation (Figure 3C-3E). These findings were further supported by increased cleaved caspase 3 expression after abexinostat 2μM either alone or in combination with irradiation as shown by western blotting 24h after irradiation (Figure 3F).

Abexinostat increases radiation-induced persistent DNA double strand breaks (DSBs)

We decided to assess ϒH2AX and p53BP1 foci by immunostaining as indicators of DNA DSBs (Figure 4A-4B). H460 cells were treated with indicated increasing concentrations of abexinostat for 24h, then irradiated at 4Gy. We observed, 1h after irradiation alone, an increase in ϒH2AX and p53BP1 foci number which returns to basal control levels 24h after irradiation (Figure 4A-4B). We found that pretreatment with abexinostat significantly increases ϒH2AX and p53BP1 foci post irradiation in H460 cells 24h after irradiation (Figure 4A-4B). These results indicate that DNA DSBs persist longer after abexinostat and irradiation combination than after irradiation alone in H460 cells. Interestingly an increased rate of persistent DNA DSBs induced by abexinostat and irradiation combination remains 24h after irradiation suggesting a prolonged impairment in the DNA repair capacity (Figure 4A-4B).

The induction of prolonged DNA DSBs by abexinostat was further supported by increased expression of phospho-H2AX induced by abexinostat 2μM in H460 cells as shown by western blotting at 1h after irradiation at 4Gy (Figure 4C). In addition, we observed an increased expression of phospho-H2AX induced by abexinostat 2μM

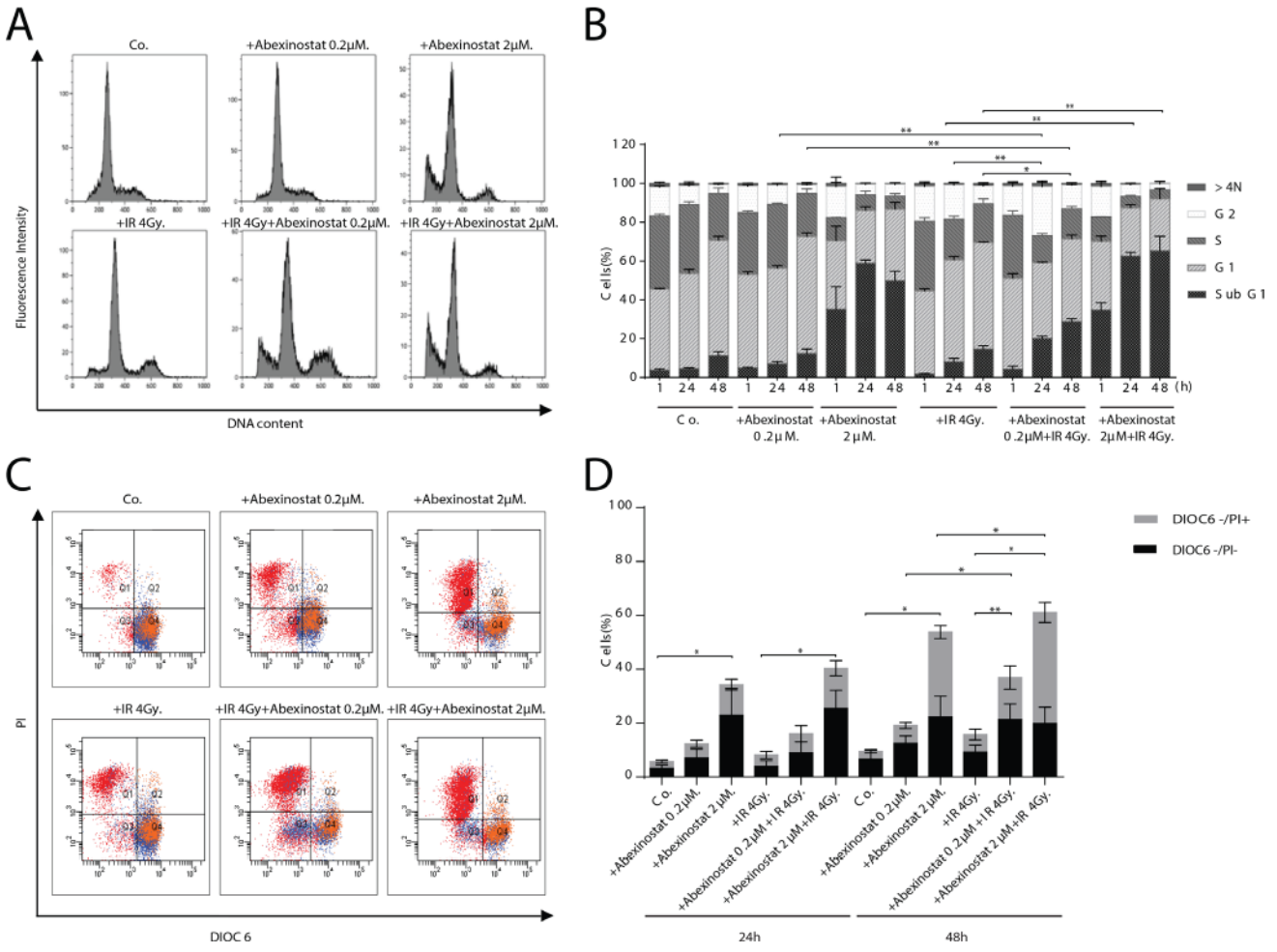


Figure 2: Abexinostat induces H460 apoptosis in a concentration and time-dependent manner. H460 cells were treated with indicated increasing concentrations of abexinostat (culture medium as control) for 24h then irradiated or not at 4Gy. Cells distribution in cell cycle phases was counted by flow cytometry assay 1h (B), 24h (B), and 48h after irradiation **A, B.** Apoptosis was assessed at 24h **C, D.** and 48h (C) after irradiation by 3.3' dihexyloxacarbocyanine iodide (Dioc6) and propidium iodide (PI) staining and flow cytometric analysis (C, D). DIOC6- stands for DIOC6 low staining. Combination of abexinostat and irradiation 4Gy significantly induced subG1 population (A, B) and apoptosis (C, D) ($p < 0.05$) compared to abexinostat single drug treatment or irradiation alone at 48h.Flow cytometry results (A, C) represent one of three independent experiments. Histograms (B, D) represent means ± SD (n = 3; t-test; *P < 0.05; **P < 0.01). Error bars represent standard deviations.

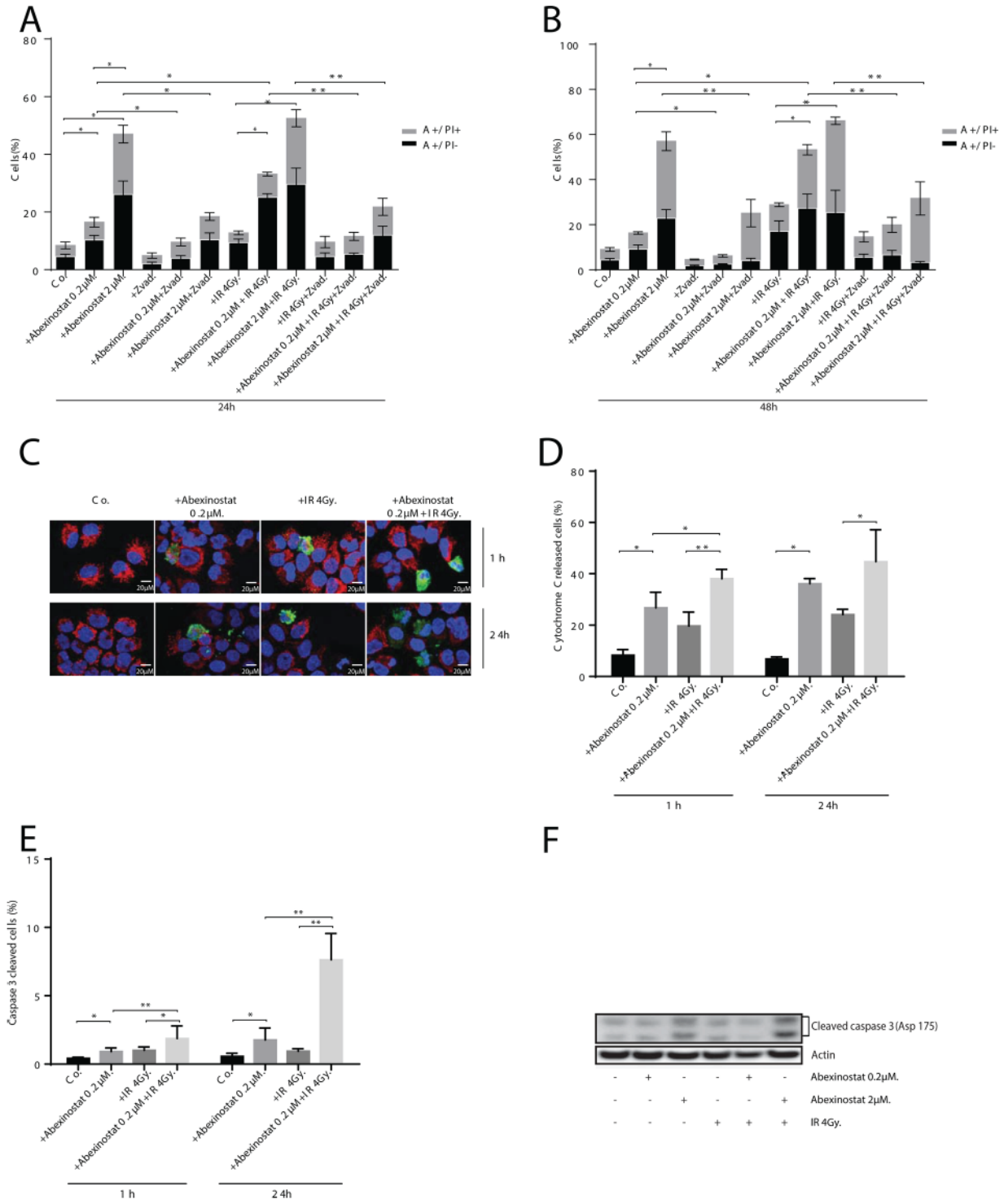


Figure 3: Abexinostat induced apoptosis is mediated by mitochondrial depolarization and caspases activation. H460 cells were treated with indicated increasing concentrations of abexinostat (culture medium as control) for 24h then irradiated or not at 4Gy. Apoptosis was assessed 24h **A.** and 48h **B.** after time of irradiation by AnnexineV (A+/-) and propidium iodide (PI+/-) staining with or without Z-Vad used as an apoptosis caspase dependent inhibitor by flow cytometric analysis. Histograms represent means of flow cytometry results ± SD of three independent experiments (n = 3; t-test; *P < 0.05; **P < 0.01). Error bars represent standard deviations. Cytochrome C release and caspase 3 activation were assessed 1h and 24h after time of irradiation by cytochrome C immunostaining used as a mitochondrial depolarization marker **C, D.** and caspase 3 immunostaining used as an apoptosis marker (C) **E.** Positive caspase 3 cells (in green) and cytochrome C released cells (in blurred red) (C) were counted microscopically from 300 cells per condition (D-E). Results represent means ± SD (n = 3; t-test; *P < 0.05; **P < 0.01). Error bars represent standard deviations. Expression of activated caspase 3 in H460 cells treated with indicated increasing concentrations of abexinostat was evaluated by Western blotting 24h after irradiation or not at 4Gy **F.**

24h after irradiation at 4Gy which was stronger than at 1h after irradiation corroborating the persistence of DNA DSBs induced by abexinostat and irradiation combination more profoundly than by abexinostat alone (Figure 4C).

Abexinostat decreases DNA damage signaling and repair

As persistent increased DSBs might be due to a decreased DNA repair, we tested the hypothesis that abexinostat impairs DNA repair. We therefore evaluated the MRE11/Rad50/NBS1 (MRN) complex which initiates irradiation induced DSBs repair. H460 cells were treated with indicated increasing concentrations of abexinostat for 24h then irradiated at 4Gy. We evaluated the levels of MRE11 and NBS1 proteins by western blotting. We showed a dose-dependent decrease in both protein expression levels, slight at 1h and more marked at 24h after irradiation, as shown by quantification of MRE11/Actin blots normalized to the control (Figure 5A-5B). At 24h abexinostat and irradiation combination markedly decreased levels of MRE11 and NBS1 proteins compared

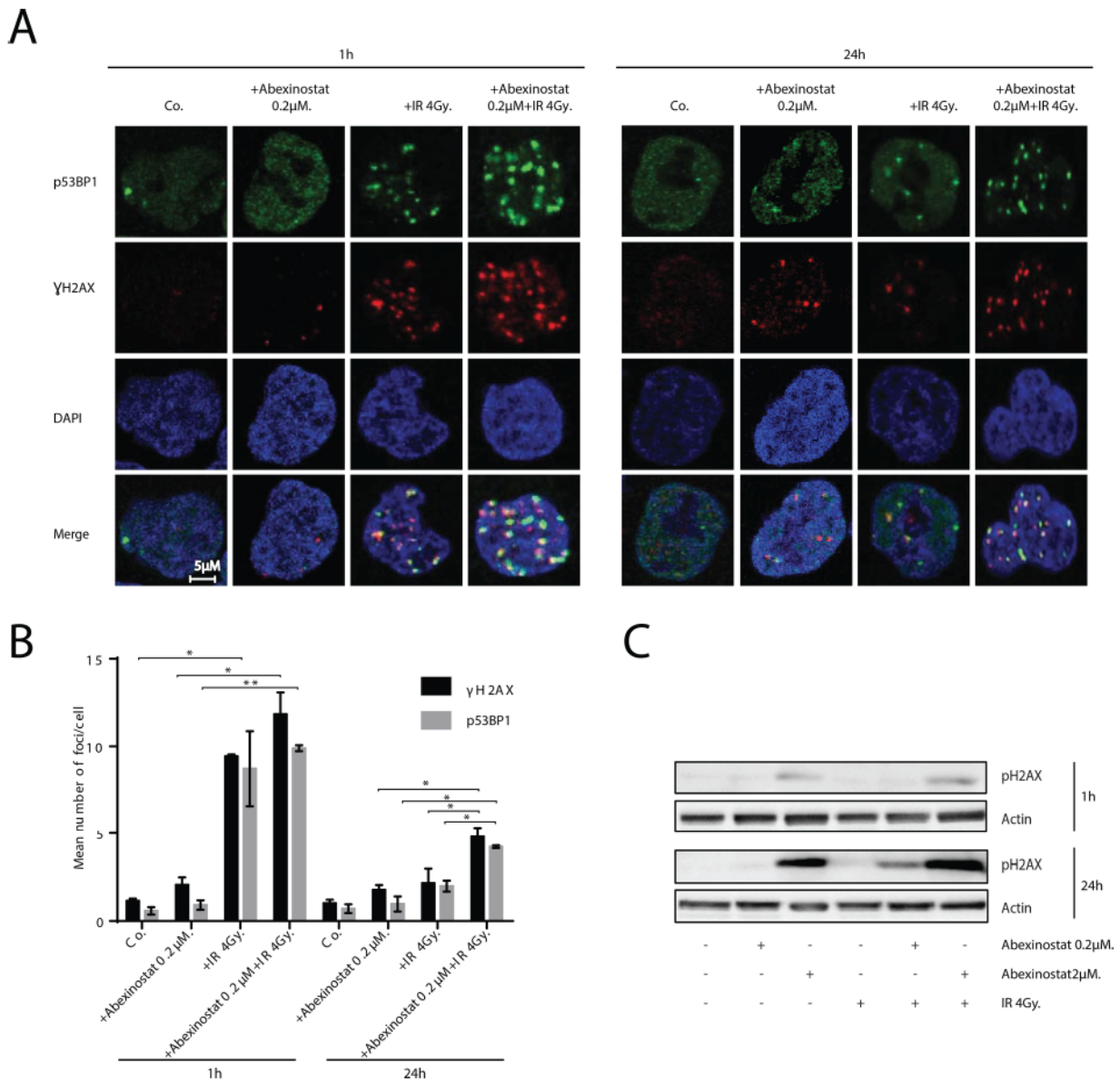


Figure 4: Abexinostat induces DNA-DSBs and prolongs radiation-induced residual DNA damage. Immunofluorescence images show representative γH2AX/p53BP1-positive nuclear foci (red/green respectively) representing residual DNA-DSBs of 4Gy irradiated H460 cell cultures treated with indicated concentrations of abexinostat **A.** After fixation, cells were stained against γH2AX, p53BP1 plus DAPI for nuclei. γH2AX/p53BP1-positive foci were counted microscopically from 300 cells per condition **B.** Histograms (B) represent means ± SD (n = 3; t-test; *P < 0.05; **P < 0.01). Error bars represent standard deviations. H460 cells were treated with indicated increasing concentrations of abexinostat (culture medium as control) for 24h prior to irradiation 4Gy **C.** Expression of pH2AX (C) was assessed 1h and 24h after irradiation by Western blotting. Actin served as loading control. Representative Western blots are shown (n=3).

to abexinostat alone (Figure 5B). These results suggest an impaired initial processing of DSBs repair byHR and/ orNHEJ which are the two major DNA repair pathway involved in DSBs repair after irradiation. Since Rad51 is one of the key DSBs repair protein in the HR pathway, we decided to further examine its involvement in the observed DNA DSBs persistence. H460 cells were treated with increasing concentrations of abexinostat prior to irradiation. We observed, by western blotting, 1h after irradiation, a moderate decreased level of Rad51 after abexinostat treatment alone. When combining abexinostat with irradiation 4Gy similar results were observed 1h after irradiation (Figure 5A). Interestingly, this decrease was more pronounced 24h after irradiation when cells were treated with abexinostat in combination (Figure 5B). Reduction in Rad51 level was not only time dependent but dose dependent as well (Figure 5B). Exposure to abexinostat 0.2μM combined to irradiation potentiated Rad51 reduction compared to abexinostat alone (Figure 5B). These findings were further supported by an immunofluorescence staining for Rad51 foci (Figure 5C-5D). In contrast after irradiation alone, we observed an increase in Rad51 foci 1h after 4Gy and a return to control level 24h after irradiation. When combining abexinostat with irradiation the increase in RAD51 foci 1h after irradiation was significantly lower than with irradiation alone (Figure 5C-5D). Moreover we observed a prolonged reduction in the number of Rad51 foci 24h after irradiation compared to irradiation alone (Figure 5C-5D).

Abexinostat potentiates tumor growth delay in combined modality treatments with acceptable toxicity *in vivo*

We next further evaluated the effects of abexinostat on response to irradiation *in vivo*. We assessed tumor growth of A549 or H460 mice xenografts treated with abexinostat and/or irradiation as described under material and methods and in Supplementary Figure 2A. Body weight was used as an indicator of mice health status (Figure 6A-6B for mice with A549 and H460 xenografts respectively). As shown in Figure 6A and 6B, we observed a maximum mean body weight loss in treated groups of 12.4% and 8.7% on day 11 in abexinostat combined with irradiation and abexinostat alone treated groups respectively. This weight loss did completely recover after treatment (on day 24) for all treated groups and therefore was considered acceptable. Abexinostat treatment alone resulted in significant inhibition of tumor growth in both A549 (p=0.005) (Figure 6C) and H460 (p=0.0009) (Figure 6D) xenografts in the same range as irradiation alone. Interestingly, tumor growth, in both models, was significantly delayed by the combination of abexinostat and irradiation compared to a single treatment modality by abexinostat or irradiation alone. For A549, we observed a mean tumor volume of 464.54 mm^3 (SEM= 28.02) versus 283.78 mm^3 (SEM= 19.71) at day 46 after starting treatment in abexinostat alone and combination treated groups respectively (p=0.006) (Figure 6C). For H460, tumor growth was much faster than A549 with a mean tumor volume of 688.13 mm^3 (SEM= 52.98) versus 331.77 mm^3 (SEM= 31.24) at day 18 after starting treatment in the abexinostat alone and in the combination treated groups respectively (p=0.034) (Figure 6D). To confirm drug diffusion in the tumor, abexinostat concentration was measured *ex vivo* from tumor homogenates after 4 consecutive days of abexinostat (25 mg/kg BID) treatment. Mean abexinostat concentrations in the tumor were 477ng/mL, 428ng/mL and 73.4ng/mL at 4h, 7h and 20h respectively after the second IP of the day in the abexinostat alone group. To assess HDAC inhibitory efficiency *in vivo* of abexinostat we evaluated the acetylation of histone H3 by western blot using *ex vivo* homogenates from H460 tumors extracted after exposure to abexinostat. In agreement with *in vitro* studies, we observed increased acetylated histone H3 in abexinostat treated group compared to control after 4 consecutive days of abexinostat (Figure 6D). Increased acetylated histone H3 correlated with the antitumor effect of abexinostat as shown by the observed tumor growth delay in Figure 6D. Data have been expressed in Kaplan Meier survival curves (Supplementary Figure 2B-2C). It is of note that mice have been sacrificed after a statistically significant volume difference was reached. Therefore a number of data were sensored and we couldn't observe a statistically significant difference in overall survival.

As the standard of care for locally advanced NSCLC in clinic is based on concomitant radio chemotherapy with a platinum based drug doublet, we decided to investigate the triple combination of abexinostat with irradiation and cisplatin (CDDP). We hypothesized that the limited toxicity of abexinostat and irradiation combination might leave room for adding CDDP and that this addition might potentiate the effect of CDDP combined to irradiation. We assessed tumor growth of A549 xenografts treated with abexinostat and/or CDDP and/or irradiation as described under material and methods and in Supplementary Figure 2D. Body weight was measured twice weekly. Treatment schedule was adapted to tolerance and toxicity profile. As shown in Figure 6E we observed a maximum mean body weight loss in treated groups of 10.7% and 6.9% on day 17 for abexinostat alone and abexinostat combined with irradiation respectively and 9.43% on day 6 for the triple combination of abexinostat, irradiation and CDDP with a marked effect after each CDDP injection delivered on days 2 and 16. This weight loss did completely recover after treatment for all groups on day 25. Abexinostat combined with irradiation exhibited significant tumor growth delay as compared to the abexinostat alone group (p= 0.046). Interestingly the triple combination of abexinostat, CDDP and irradiation exhibited a border line significant tumor growth delay as compared to the double combination of

abexinostat and irradiation (p= 0.05). Significant growth delay was observed as well with the triple combination compared to the combination of CDDP and irradiation (p= 0.03) or compared to abexinostat alone (p= 0.004) (Figure 6F). Survival data have been expressed in Kaplan Meier survival curves (Supplementary Figure 2E). It is of note that in the triple combination with CDDP, mice have been sacrificed after a statistically significant volume difference was reached between above indicated groups on day 51 and 65. Therefore a number of data were sensored and we couldn't observe a statistically significant difference in overall survival. Nevertheless a Logrank test for trend was performed and showed a p= 0.0096 suggesting that with a longer follow up we could see a difference in survival.

DISCUSSION

Abundant pre-clinical studies and early clinical trials have shown a promising anti-tumor effect of HDACi alone or in combination with chemotherapy agents linked with an induced alteration in DNA repair capacity [26-28]. More recently, rapidly expanding pre-clinical *in vitro* and *in vivo* data have shown a radiosensitizing effect of various HDACi in different tumor cells explained by

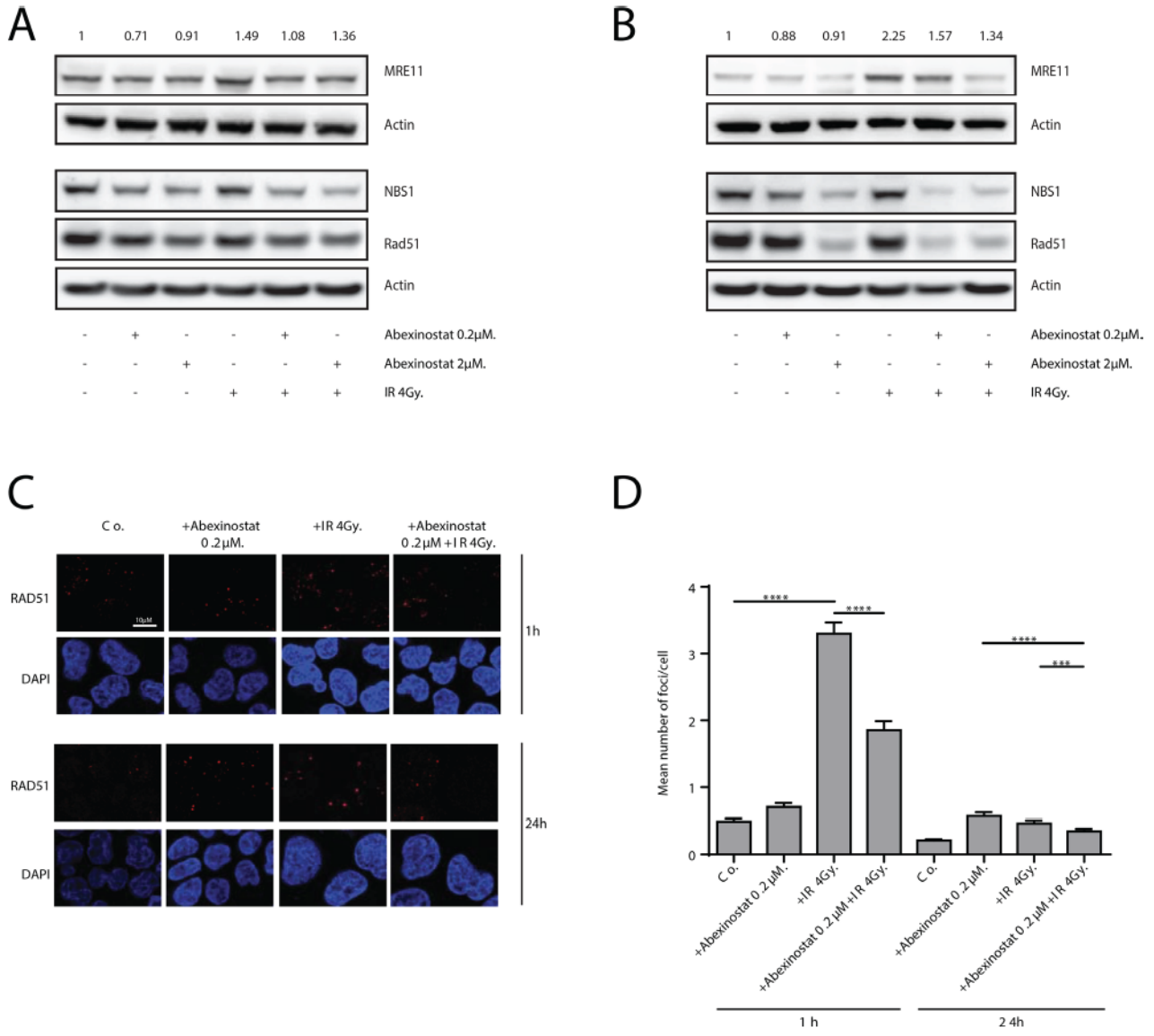


Figure 5: Abexinostat impairs radiation-induced DNA damage repair. H460 cells were treated with indicated increasing concentrations of abexinostat (culture medium as control) for 24h prior to irradiation 4Gy. MRE11, NBS1 and Rad51 expression were assessed 1h **A.** and 24h **B.** after irradiation by Western blotting. Actin served as loading control. Representative Western blots are shown (n=3). MRE11 blots were quantified using Image J software and normalized to the control. Immunofluorescence images show representative Rad51-positive nuclear foci (red) representing residual DNA-DSBs of 4Gy irradiated H460 cell cultures **C.** After fixation, cells were stained against Rad51 plus DAPI for nuclei. Rad51-positive foci were counted microscopically from 300 cells per condition **D.** Histograms represent the mean number of foci per cell ± SD (n = 3; t-test; ***P < 0.005; ****P < 0.001). Error bars represent standard deviations.

changes is chromatin conformation or reduced DNA repair capacity when combined with irradiation [3]. *In vivo* studies have suggested such radiosensitizing effect in various tumor types [22, 28, 29, 30-32, 33, 34, 35, 36, 28, 37, 38-42, 43]. Since HDACi effects seem to be dependent on both the type of tumor cell and the specific HDACi used [44, 45] further preclinical studies are needed to identify the best combinations to increase chances of

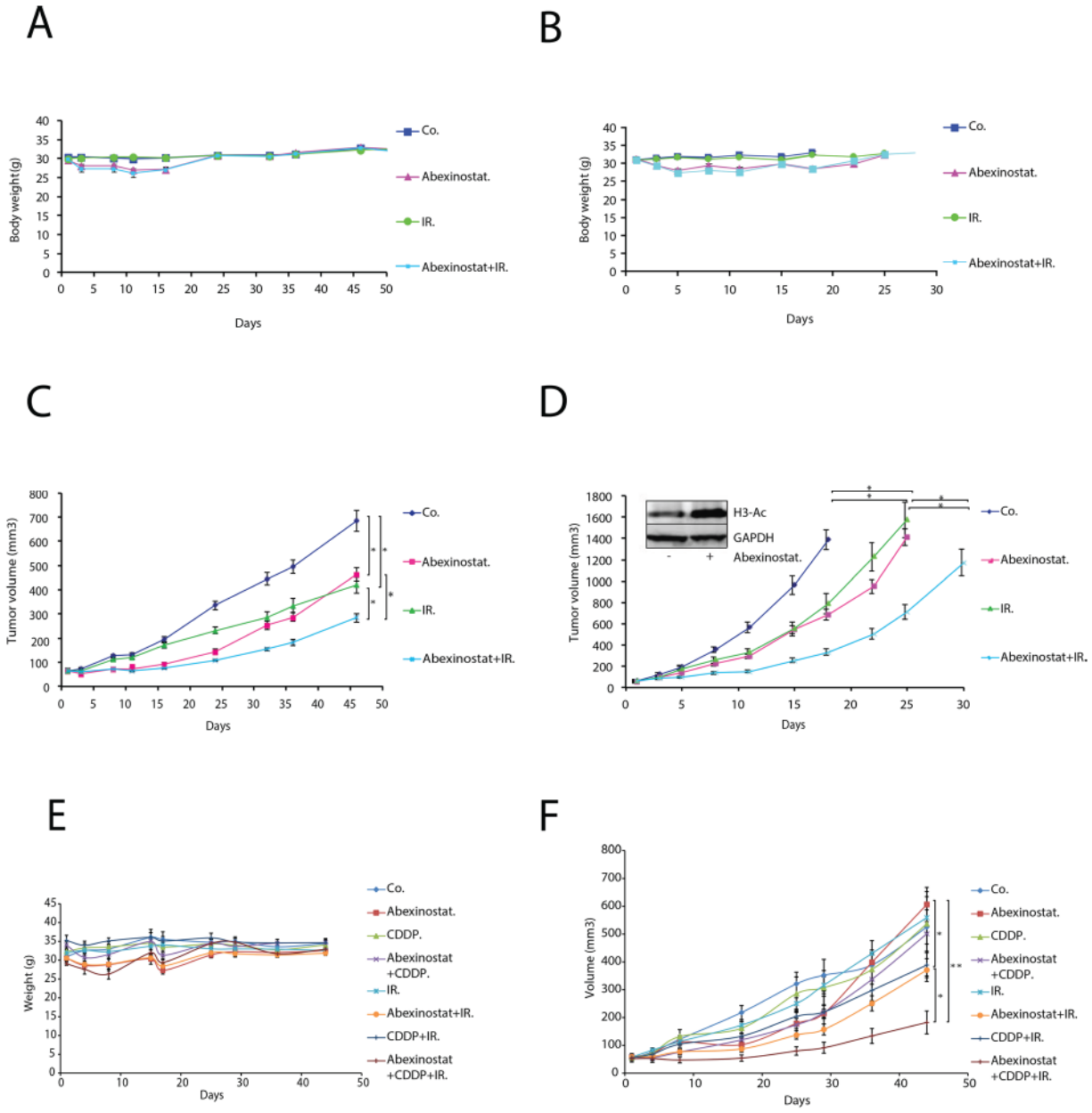


Figure 6: Abexinostat significantly potentiates radio-induced tumor growth delay with acceptable toxicity in A549 and H460 NSCLC xenograft mouse models. Mice bearing A549 or H460 xenografts were treated with +/- abexinostat IP 25mg/kg X 2/d (4 days on, 3 days off, 4 days on, 3 days off, 4 days on) and +/- irradiation at 2Gy/d on day 2, 3 and 4. Vehicle (HβCD 30%) was used as control. Body weight was measured twice weekly for mice bearing A549 or H460 xenografted tumors (**A, B.** respectively). Growth delay of abexinostat treated mice bearing A549 **C.** or H460 **D.** xenografts were measured as described under materials and methods. Results represent means ± SD (n = 2; 10 mice per group; t-test; *P < 0.05; **P < 0.01). Acetylation of histone H3 was evaluated after 4 consecutive days of abexinostat IP 25mg/kg X 2/d by Western blotting in *ex vivo* H460 tumors 4h after the second IP (D). GAPDH served as loading control. Representative Western blots are shown (n=3). Mice bearing A549 xenografted tumors were treated with +/- abexinostat IP 25mg/kg X 2/d (5 days on, 4 days off, 3 days on, 3 days off, 5 days on) +/- Cisplatin IP 1mg/kg 1h before time of irradiation on day 2 and day 16 and +/- irradiation at 2Gy/d on day 2, 3 and 4. DMSO was used as control. Body weight was measured twice weekly for mice bearing A549 xenografted tumors **E.** Growth delay of mice bearing A549 xenografts were measured **F.** as described under materials and methods. Results represent means ± SD (10 mice per group; t-test; *P < 0.05).

success in clinical trials, particularly if HDACi are used in combination with radiotherapy. By testing *in vitro* and *in vivo* abexinostat, a recently developed hydroxamic acid–based pan-HDACi currently being evaluated in combination with radiotherapy in a phase I clinical trial in metastatic patients, we add further data supporting the rational for the combination of HDACi and radiotherapy namely in NSCLC in future clinical trials.

Our results underscore for the first time the importance of the administration schedule when combining abexinostat and irradiation. We demonstrated with abexinostat that administration 24 hours before irradiation induces a radiosensitizing effect *in vitro* and potentiates tumor growth delay *in vivo*. This effect, which was not observed when abexinostat was started concomitantly with irradiation (data not shown), show consistency with a mechanism that does require time for epigenetic changes as suggested with some HDACi so far including LBH589, vorinostat, TSA and NDACI054 [23, 28, 29, 46]. These results are of importance for clinical translation and justify starting abexinostat before irradiation in the ongoing and future combination trials.

Abexinostat schedule given BID based on days on and off treatment instead off a continuous treatment was chosen for this study based on pharmacokinetic and pharmacodynamic data, tolerability and activity of abexinostat observed in the clinical study PCYC-0402 and in our phase I study combining abexinostat and radiotherapy currently under publication [47, 48]. Starting from the dose of 12.5mg/Kg BID we have tested increasing doses following the published schedule [48]. We have shown that 25mg/Kg BID was still well tolerated and therefore have chosen this dose and schedule.

For *in vivo* experiments, we have selected a fractionated schedule with 2Gy per fraction to keep the dose per fraction similar to what is used in normofractionated schedules in the clinic for the treatment of non-operable locally advanced NSCLC. The total dose was kept relatively low (6Gy) to better see the effect of the combination and show a proof of concept.

Hypoxic tumor cells present a more aggressive phenotype often associated with lower radio and chemo-sensitivity. It is of high importance to evaluate the efficacy of potential radiosensitizers under normoxia and hypoxia since human tumors including NSCLC often contain a substantial fraction of hypoxic cells. Saelen *et al* have shown *in vitro* and *in vivo* that vorinostat enhances radiosentivity of colon cancer cells almost counter-balancing hypoxia-induced radioresistance [32]. The ability of HDACi to overcome hypoxia-related radioresistance would be a major advantage for the treatment of hypoxic tumors such as NSCLC.

Although most HDACi have showed some cytotoxic effect and cell death induction capacities through apoptosis, necrosis or autophagy, the precise molecular mechanism underlying the balance between the different cell death mechanisms according to tumor types and HDACi specificities remains unknown [1]. Many questions still remain regarding the molecular mechanisms of radiosensitization by abexinostat and HDACi. However, it is possible that the capacity of abexinostat to induce double strand breaks, while reducing the capacity to repair damaged DNA, might not only have an important role per se but also by increasing irradiation-induced apoptosis. This provides a molecular rationale for the synergistic activities of HDACi and irradiation. Even though the main cell death mechanism induced by irradiation is mitotic cell death, potentiating other cell death pathways such as apoptosis might end in an increased antitumor efficacy supporting the clinical interest of the combination. [1, 28] Previous studies have shown either a pro-apoptotic effect or no impact on apoptosis depending on the type of HDACi used and the type of cell [23, 28, 49]. In our study, we investigated the effects of abexinostat on cell proliferation, cell cycle progression and apoptosis in both A549 and H460 NSCLCC (data partially shown, Figures 1-3). In H460 cells, treatment with abexinostat induced an increased sub G1 population corresponding to increased apoptosis, as shown by AnnexinV/propidium iodide flow cytometry, without significant changes in cell-cycle profile (Figure 3A-3B). The apoptotic response induced by abexinostat is caspase dependent as shown by the increased level of cleaved caspase 3 and a significant reduction of induced apoptosis when using Z-VAD, a pan-caspase inhibitor (Figure 3A-3B, 3F) [1, 50]. We have additionally found that abexinostat apoptotic response involves and potentiates the "intrinsic" mitochondrial apoptosis pathway as shown by reduced DIOC6 uptake upon the drop of mitochondrial transmembrane potential and increased cytochrome C release (Figures 2-3) [1, 51]. Our findings suggest that abexinostat renders H460 cells more susceptible to apoptosis after irradiation and that the "intrinsic" apoptosis pathway is one mechanism through which abexinostat and irradiation interacts.

Response to irradiation is recognized to be driven by the repair efficiency of radiation induced DNA damage in which double strand breaks play a major role [52]. Mounting reports suggest that HDACi exert a radiosensitizing effect by down regulating DNA repair pathways in various tumor types with different HDACi [9]. It has previously been shown, *in vitro*, that abexinostat (also known as PCI-24781 or S78454) can down regulate HR in HCT116 cells by repressing transcription and consequently expression of Rad51 which might explain radiosensitization induced by abexinostat [18]. Our results confirm in H460 cells, which are less radiosensitive than HCT116 cells, that the radiosentizing effect of abexinostat is correlated with a decreased level of RAD51 protein and RAD51 foci (Figure 5). This work provides contributive evidence that HDACi can play an important role in HR modulation by regulating not only effectors level but formation of DNA repair complexes as well considered

to represent the "repairosome" [10]. A second approach has been used to asses DNA repair by evaluating the expression of phosphorylated H2AX, γH2AX and 53BP1 foci formation. H2AX is rapidly phosphorylated at sites of DNA double strand breaks and acts with 53BP1 as a damage signaling protein forming nuclear foci visible by immunostaining on fluorescence microscopy [9, 53]. The exact mechanism of action of these proteins remain unclear, but the variation in the number of such foci is thought to be representative of the induction and repair of DNA double strand brakes [10]. Our findings suggest not only a decreased repair with prolonged expression of γH2AX and 53BP1 foci (Figure 4) in great similarity with most previously published data on radiosensitization by HDACi, but also an associated increased DNA damage induction with increased double strand brakes, as shown by the increased number of γH2AX and 53BP1 foci as early as 1 hour after irradiation.

Lung cancer is still the leading cause of cancer death. Radio-chemotherapy remains the standard of care for locoregional unresectable lung tumors [20]. Despite strong rational and promising results from *in vitro* and *in vivo* studies, the use of targeted therapeutic agents combined with radiotherapy in NSCLC is still limited. Several attempts have been made to overcome the drug-radiotherapy combination challenge in early clinical trials. Recently, most of these studies have been focusing on the use of anti-EGFR and other signal transduction inhibitors. Due to their role in diverse oncogenic pathways a lack of success of these agents in unselected patients in the clinic was observed. Fearing possible toxicities of a triple combination the RTOG 1306 phase II randomized trial is currently assessing the impact on progression free survival of these targeted agents (either erlotinib for EGFR mutated tumors or crizotinib for ALK translocated tumors) before concurrent chemoradiotherapy in patients with stage III Non-small Cell Lung Cancer (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01822496) but the question of concomitant triple combination deserves cautious assessment and could open the way for new improvements. Evidence linking radiosensitivity and epigenetics are still scarce and mostly based on *in vitro* data [54]. Synergistic effects of anti-EGRF and HDACi have been reported in NSCLC by Edwards *et al* who showed that the HDACi LBH589 induces apoptosis only in EGFR mutated NSCLC [55]. Controversially in our findings, we demonstrate that the potentiating effect of abexinostat and irradiation with apoptosis induction is observed in H460, an EGFR wild type cell line.

Few *in vitro* and *in vivo* studies have shown synergistic anti-tumor effect between CDDP and HDACi [48, 56]. The standard of care for locally advanced unresectable NSCLC patients is based on concomitant radio chemotherapy with a platinum based drug doublet [20]. Various platinum based doublets have been tested with concomitant radiotherapy over the last years with limited improvement in overall survival when comparing one doublet to another [57]. Our findings show for the first time an *in vivo* potentiation of the anti-tumor effect of the CDDP-radiotherapy combination by an HDACi. Abexinostat increases tumor growth delay when used in triple combination in a borderline significant way ($p=0.05$) with a clear trend to improved survival (logrank test for trend $p= 0.0096$) (Figure 6F, Supplementary Figure 2E). Given that Abexinostat can induce DNA double strand breaks and lower the capacity to repair damaged DNA and that cisplatin and irradiation cause DNA damage, combining abexinostat, irradiation and cisplatin might end up in an increased tumor cell apoptosis. Abexinostat might therefore potentiate the antitumor effect of cisplatin and irradiation. This should serve as the basis for further investigations and potential clinical translation to address the crucial need for improvement in NSCLC treatment.

Concerns about toxicities and feasibility of the triple combination of abexinostat, irradiation and cisplatin might be raised due to the risk of hematologic toxicity of both cisplatin and abexinostat (thrombocytopenia and leukopenia). Hematologic toxicity of irradiation is limited and mostly due to the irradiated bone marrow volume. Given that abexinostat can be administered clinically with minimal toxicity at recommended dose and that the risk of induced thrombocytopenia is reduced by using clinically optimized treatment schedule, even in combination with radiotherapy as shown in our phase I trial under publication, concerns regarding the triple combination are limited but will justify a careful hematologic follow up [47, 48]. Other cisplatin toxicities such as.nephro- and neurotoxicity should not be at increased risk given that neither abexinostat nor other HDACi seem to increase this risk. Nevertheless the toxicity profile of each treatment of this combination suggest a possible risk of increased nausea specially if the irradiated volume includes part of the gastrointestinal track which should be carefully assessed in the clinic even though no such toxicity was observed *in vivo*.

Altogether, our data demonstrate *in vitro* and *in vivo* a potentiation of anti-tumor effect of irradiation by abexinostat in NSCLC models. Moreover, our work suggest for the first time to our knowledge promising triple combination opportunities with HDACi, irradiation and CDDP which deserves further investigations and could be of major interest in the treatment of NSCLC where improvement in efficacy is crucially needed but limited by the toxicity of current combined treatments.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines, cell culture, and irradiation

A549 and H460 human non-small cell lung carcinoma (NSCLC) cell lines were obtained from ATCC (Manassas, VA, USA). A549 cells were cultured in F-12K

Medium (ATCC, Manassas, VA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (PAA laboratories) and 100 units/mL penicillin G sodium, 1% Hepes and 1% Sodium/pyruvate (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). H460 cells were cultured in RPMI Medium (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented as previously described for F-12K Medium. All cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO2 either in normoxia (21% O^2) or in hypoxia (0.1% O^2). For hypoxia conditions pre-plated cells were incubated with 0.1% O^2 for 24h then treated with abexinostat at indicated dose for 24h and irradiated at indicated dose in hypoxia. Treatment by abexinostat in hypoxia (0.1% O^2) was maintained according to indicated time. Irradiation was delivered at room temperature using single doses (2–6Gy) on an IBL-687 irradiator (CIS-Bio International) with a dose rate of 1Gy/min.

Chemicals and antibodies

Abexinostat (Code: S78454-1; also coded PCI-24781-HCI by Pharmacyclics) provided by Technologie Servier (Orléans, France) was solubilized at 10mM in DMSO aliquoted and stored at -20°C. The frozen stock was thawed only once. Intermediate and final dilutions were prepared extemporaneously in complete culture medium for *in vitro* experiments and 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HβCD) 30% for *in vivo* experiments protected from daylight. Cisplatin (Cis-diammine-platinum (II) dichloride or CDDP) was purchased from Sigma Aldrich St. Quentin Fallavier, France). CDDP was diluted in HβCD 30% aliquoted and stored at -20°C. Primary antibodies for detection of Acetyl Histone H3 (Lys9), Cleaved caspase 3 (Asp175), MRE11, p95/NBS1 were purchased from Cell Signaling Technology. Primary antibodies against phospho H2AX and GAPDH were obtained from Millipore. Primary antibodies against cytochrome C, 53BP1, Rad51 and β-actin were respectively purchased from BD pharmingen, Bethyl Laboratories, Calbiochem and Sigma. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti mouse or anti rabbit secondary antibodies were from Southern Biotechnology. Z-Val-Ala-Dl-Asp-fluoromethylketone (Z-VAD-FMK) was purchased from Bachem and 2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HβCD) from Sigma. The solvent DMSO or culture medium was used as control. Cells were treated with abexinostat at indicated concentrations for indicated time period and 24h prior to irradiation unless specified otherwise.

WST-1 assay

Cells were seeded in 96-well plates in growth medium overnight. Cells were treated with vehicle (DMSO) or different concentrations of abexinostat for 48h, then incubated with WST-1 reagent at 37°C for 3h. After incubation, superoxide produced by living cells reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan**.** The absorbance was measured by fluorimetry at 450nm. Values were normalized to a non-treated control. IC50 values represent abexinostat concentration reducing by 50% the number of viable cells.

Total protein extracts and western blotting

Western blotting was performed to detect Acetyl Histone H3 (Lys9) (H3-Ac), Cleaved caspase 3 (Asp175), phospho H2AX (pH2AX), MRE11, p95/NBS1 and Rad51. Cells were treated 16 hours after plating in complete medium (containing FBS) at indicated doses and time period with +/- abexinostat +/- irradiation. Total cellular proteins were extracted in lysis buffer: 20mM Hepes, 10mM KCl, 1mM EDTA, 0.1% NP40, 10% glycerol, protease inhibitor cocktail (EDTA-free protease inhibitor tablets, Roche) and phospatase inhibitor (phosphoSTOP tablets, Roche). Protein content was evaluated using a Bio-Rad® kit, and 10µg of protein sample were loaded on a denaturing acryl-amide NuPage Bis-Tris gel (Invitrogen). Following denaturing at 35°C for 5min, 30µg of proteins were loaded on NuPAGE Novex Bis-TRis 4-12% pre-cast gels (Life technologies) and electrotransferred to PDVF membranes (Amersham). Red Ponceau dye was used for protein detection during western blotting and confirmed the quality of protein transfer. After blocking unspecific binding sites in 0.1% Tween -20 (v/v in TBS) with 5% bovine serum albumin, membranes were incubated overnight with primary antibody at room temperature. Primary antibodies were detected with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies and were revealed with enhanced Dura detection system (Thermo Fisher Scientific) on a G-Box Chemi XL 1.4 (Syngene) for image recording. Equal lane loading was verified by probing membranes with antibodies specific for β-actin or GAPDH. For *ex vivo* tumor homogenates total cellular proteins were extracted in lysis buffer and western blotting was performed to detect Acetyl Histone H3 (Lys9) (H3-Ac) following the same procedure.

Our blots were quantified using ImageJ software.

Clonogenic survival assay

A549 and H460 cells were seeded in 4mL culture medium/T-25 flasks with 100 to 3000 cells/flask, so as to yield 10-200 colonies/flask. After 4 hours, cells were treated with indicated concentrations of abexinostat or vehicle as control for 24h followed by irradiation at indicated dose. Medium was changed 24h after irradiation and cells were incubated for 10-14 days in a 37°C, 5% CO2, 21% or 0.1% O^2 incubator. Cells were then stained with a solution containing crystal violet and ethanol for 15min and individual colonies (>50 cells) were counted. Data from treated cells were

normalized against the unirradiated cells (scored as 100% colony forming ability). Plating efficiencies (PE) were calculated as follows: numbers of colonies formed/ numbers of cells plated. Surviving fractions (SF) were calculated by dividing the PE of the treated cells by the PE of the controls (unirradiated cells). The radiation dose at 10% survival was calculated by transforming the linear quadratic equation ($SF = \exp[-\alpha xD-\beta D^2]$). Sensitization enhancement ratios (SER) were calculated by dividing the radiation dose at 10% cell survival treated with culture medium by the radiation dose at 10% cell survival treated with indicated concentration of abexinostat. Each point on survival curves represents the mean surviving fraction from at least three independent experiments. Experimental data were fitted to the classical linear-quadratic equation ($Ln(S) = -\alpha D-\beta D^2$) through nonlinear least-square regression using Kaleidagraph software (Synergy Software, Reading, PA). We used: $Ln(S) = -\alpha D-\beta D^2$ where S is the survival fraction, D the dose, α and β adjustable parameters depending on the cell line and the treatment used. For each experiment, the mean D10 dose (dose to achieve 10% survival) was recalculated using the mean values of α and β determined from the curves drawn for best fit to the experimental data. In each case, the correlation coefficient was more than 0.99.

Isobolograms

The cytotoxic interactions of abexinostat and radiation at 10% survival iso-effect (IC90) were evaluated using the isobologram method of Steel and Peckham [58] The isobologram analysis for A549 (G,I) and H460 (H,J) were shown in modified Supplementary Figure 1 in normoxic (G,H) and hypoxic (I,J) conditions. The envelope of additivity, surrounded by Mode I (circles) and Mode II (squares) isobologram lines was constructed from the doses-response curves of abexinostat alone and radiation alone. For each condition the experimental data giving 10% survival was plotted on the graph. A non-parametric Wilcoxon signed rank statistical test was done between experimental data and the predicted minimum data.

Flow cytometric assay: cell cycle analysis and cell death assay

For analysis of cell cycle sham control and 4Gy-irradiated cells with indicated concentration of abexinostat exposure 24h prior to irradiation were harvested at different time points after irradiation (1- 24- 48 h) and fixed in 70% ethanol. DNA content was stained in propidium iodide (PI) solution (0.1mg/ml PI, 1mg/ml RNase and 20mM EDTA in PBS (pH7.8)). To study cell death, cells were harvested without fixation. H460 cells were stained 24 and 48h after irradiation with 3.3 dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6 (3) Molecular Probes) and PI. H460 cells were equally stained at same time points with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated AnnexinV (MACS, Myltenyi Biotec) +/- Z-VAD-FMK as per instructions of the manufacter. Flow cytometry analysis was performed on a BD LSR II system (BD Biosciences, Stockholm, Sweden). Data were analyzed using BD FACSDiva Software (Becton Dickinson) and FlowJo Software (Verity software House, Topsham, ME, USA). Culture medium was used as a control.

Immunofluorescence staining

H460 cells were grown on 6-well chamber slides and treated with vehicle (culture medium as a control) or different concentrations of abexinostat for 24h prior to irradiation 4Gy. At the indicated time (1 - 24h) after +/- 4Gy, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 minutes and permeabilized in 0.1% SDS for 10 minutes. Unspecific binding sites were blocked with 10% BSA for 30 minutes then slides were incubated with specific caspase 3, cytochrome C, ϒH2AX, 53BP1 or Rad51 primary antibodies (1/200). The slides were washed 3 times in 1X PBS and incubated with Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 568-conjugated species-specific secondary antibodies (Molecular Probes) for 1h (1/500). Cells were counterstained with Hoescht 33342 (Life technologies) and analyzed by fluorescent confocal microscopy on a Leica SP8 using a 63x objective.

In vivo xenograft studies

Animals were maintained in appropriate pathogen-free conditions and experiments followed the Federation of European Laboratory Animal Science Association (FELASA) guidelines. Animal experiments were approved by the local Ethics Committee (CEEA IRCIV / IGR, registered with the French Ministry of research) and were in compliance with the EU 63/2010 directive. Mice were housed under standard conditions (12h light/12h dark at 21~23°C and 60~85% humidity) with ad libitum access to sterilized food and water. Female athymic nude mice (Janvier, Le Genest-Gaint-Isle, France) 6-8 weeks of age were inoculated subcutaneously with $2.5.10^6$ A549 or H460 cells newly purchased from ATCC. Cells were tested for mycoplasma contamination and presented none. When tumor size reached 65-100 mm^3, mice were randomly allocated to four groups (n=10 per group) and treated by intraperitoneal injection (IP) with vehicle (HβCD 30%), abexinostat 25 mg/kg BID (twice daily) (4days on, 3days off, 4days on, 3days off, 4 days on), vehicle (HβCD 30%) and irradiation at 2Gy/d on day 2, 3 and 4, or combined treatment with irradiation delivered 1h after the second injection of the corresponding day of treatment (Figure 6A-6D, Supplementary Figure 2A). In two independent

experiments H460 tumor homogenates were prepared *ex vivo* collecting mice tumors 4h, 7h, 20h after the second abexinostat injection of the day after 4 consecutive days of abexinostat IP 25mg/kg X 2/d. Tumors were immediately frozen with liquid nitrogen after wet weight was recorded. Tumor tissue homogenates were stored at -80°C prior to sample analysis. The final concentration of abexinostat was determined in the tumor by normalization based upon the weight of mouse tumor tissue collected. In an independent experiment following the same procedure, when A549 tumor size reached 65-100 mm^3, mice were randomly allocated to 8 groups (n=10 per group) and treated with +/- abexinostat IP 25mg/kg X 2/d (5 days on, 4 days off, 3 days on, 3 days off, 5 days on) +/- cisplatin IP 1mg/kg 1h before time of irradiation on day 2 and day 16 and +/- irradiation at 2Gy/d on day 2, 3 and 4, 1h after the second injection of abexinostat of the corresponding day of treatment (Figure 6E-6F, Supplementary Figure 2D). Vehicle (HβCD 30%) was used as control. In all experiments, tumor volumes were calculated using caliper measurements twice a week as follows: volume (mm3) = (length × $width^2$)/2. Body weights were measured twice a week. Selective tumor irradiation was delivered using an X-ray tube (Tube Varian NDI 226, 0.87 Gy/min) under a tension of 200KV at 15mA, with a 0.2mm cooper filter and a skin source distance of 21cm. Mice with weight losses greater than 20% or tumor over 1800mm^3 were sacrificed.

Statistical analysis

Unless stated differently statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad, San Diego CA). Data are expressed as mean plus or minus standard deviation (SD) or standard error of the mean (SEM) of at least 3 independent experiments. For *in vitro* experiments statistical comparisons were made using an unpaired t test. A two way ANOVA analysis was used to determine significant differences in mean tumor volumes *in vivo*. P values less than 0.05 were assigned significance. Irradiation survival curves were fitted according to the linear-quadratic model.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by a grant from Institut de Recherches Internationales Servier to Pr Eric Deutsch. We thank Pierre Maroun and Jean Menard (from Gustave Roussy, Villejuif, France) for their technical help and support.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no competing interest.

REFERENCES

1. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. Nature reviews Drug discovery. 2006; 5:769-784.
2. Wagner JM, Hackanson B, Lubbert M, Jung M. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors in recent clinical trials for cancer therapy. Clinical epigenetics. 2010; 1:117-136.
3. Groselj B, Sharma NL, Hamdy FC, Kerr M, Kiltie AE. Histone deacetylase inhibitors as radiosensitisers: effects on DNA damage signalling and repair. British journal of cancer. 2013; 108:748-754.
4. Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. Annual review of biochemistry. 2001; 70:81-120.
5. Thiagalingam S, Cheng KH, Lee HJ, Mineva N, Thiagalingam A, Ponte JF. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. Annals of the New York Academy of Sciences. 2003; 983:84-100.
6. Lawlor ER, Thiele CJ. Epigenetic changes in pediatric solid tumors: promising new targets. Clinical cancer research. 2012; 18:2768-2779.
7. Lane AA, Chabner BA. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. Journal of clinical oncology. 2009; 27:5459-5468.
8. Falkenberg KJ, Johnstone RW. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. Nature reviews Drug discovery. 2014; 13:673-691.
9. Munshi A, Tanaka T, Hobbs ML, Tucker SL, Richon VM, Meyn RE. Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, enhances the response of human tumor cells to ionizing radiation through prolongation of gamma-H2AX foci. Molecular cancer therapeutics. 2006; 5:1967-1974.
10. van Veelen LR, Cervelli T, van de Rakt MW, Theil AF, Essers J, Kanaar R. Analysis of ionizing radiation-induced foci of DNA damage repair proteins. Mutation research. 2005; 574:22-33.
11. Fournel M, Bonfils C, Hou Y, Yan PT, Trachy-Bourget MC, Kalita A, Liu J, Lu AH, Zhou NZ, Robert MF, Gillespie J, Wang JJ, Ste-Croix H, Rahil J, Lefebvre S, Moradei O, et al. MGCD0103, a novel isotype-selective histone deacetylase inhibitor, has broad spectrum antitumor activity *in vitro* and *in vivo*. Molecular cancer therapeutics. 2008; 7:759-768.
12. Bonfils C, Kalita A, Dubay M, Siu LL, Carducci MA, Reid G, Martell RE, Besterman JM, Li Z. Evaluation of the pharmacodynamic effects of MGCD0103 from preclinical models to human using a novel HDAC enzyme assay. Clinical cancer research. 2008; 14:3441-3449.
13. Sikandar S, Dizon D, Shen X, Li Z, Besterman J, Lipkin SM. The class I HDAC inhibitor MGCD0103 induces cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer initiating cells by upregulating Dickkopf-1 and non-canonical Wnt signaling. Oncotarget. 2010; 1:596-605. doi: 10.18632/oncotarget.101001.

14. Zhang Q, Sun M, Zhou S, Guo B. Class I HDAC inhibitor mocetinostat induces apoptosis by activation of miR-31 expression and suppression of E2F6. Cell death discovery. 2016; 2:16036.

15. Bradley D, Rathkopf D, Dunn R, Stadler WM, Liu G, Smith DC, Pili R, Zwiebel J, Scher H, Hussain M. Vorinostat in advanced prostate cancer patients progressing on prior chemotherapy (National Cancer Institute Trial 6862): trial results and interleukin-6 analysis: a study by the Department of Defense Prostate Cancer Clinical Trial Consortium and University of Chicago Phase 2 Consortium. Cancer. 2009; 115:5541-5549.

16. Nolan L, Johnson PW, Ganesan A, Packham G, Crabb SJ. Will histone deacetylase inhibitors require combination with other agents to fulfil their therapeutic potential? British journal of cancer. 2008; 99:689-694.

17. Sharma A, Singh K, Almasan A. Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. Methods in molecular biology. 2012; 920:613-626.

18. Adimoolam S, Sirisawad M, Chen J, Thiemann P, Ford JM, Buggy JJ. HDAC inhibitor PCI-24781 decreases RAD51 expression and inhibits homologous recombination. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007; 104:19482-19487.

19. Coleman MP, Forman D, Bryant H, Butler J, Rachet B, Maringe C, Nur U, Tracey E, Coory M, Hatcher J, McGahan CE, Turner D, Marrett L, Gjerstorff ML, Johannesen TB, Adolfsson J, et al. Cancer survival in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden, and the UK, 1995-2007 (the International Cancer Benchmarking Partnership): an analysis of population-based cancer registry data. Lancet. 2011; 377:127-138.

20. Auperin A, Le Pechoux C, Rolland E, Curran WJ, Furuse K, Fournel P, Belderbos J, Clamon G, Ulutin HC, Paulus R, Yamanaka T, Bozonnat MC, Uitterhoeve A, Wang X, Stewart L, Arriagada R, et al. Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer. Journal of clinical oncology. 2010; 28:2181-2190.

21. Cardenal F, Nadal E, Jove M, Faivre-Finn C. Concurrent systemic therapy with radiotherapy for the treatment of poor-risk patients with unresectable stage III non-small-cell lung cancer: a review of the literature. Annals of oncology. 2015; 26:278-288.

22. Ha K, Fiskus W, Choi DS, Bhaskara S, Cerchietti L, Devaraj SG, Shah B, Sharma S, Chang JC, Melnick AM, Hiebert S, Bhalla KN. Histone deacetylase inhibitor treatment induces 'BRCAness' and synergistic lethality with PARP inhibitor and cisplatin against human triple negative breast cancer cells. Oncotarget. 2014; 5:5637-5650. doi: 10.18632/oncotarget.2154.

23. Hehlgans S, Storch K, Lange I, Cordes N. The novel HDAC inhibitor NDACI054 sensitizes human cancer cells to radiotherapy. Radiotherapy and oncology. 2013; 109:126-132.

24. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, Susin SA, Petit PX, Mignotte B, Kroemer G. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. The Journal of experimental medicine. 1995; 182:367-377.

25. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Zanin C, Vayssiere JL, Petit PX, Kroemer G. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death *in vivo*. The Journal of experimental medicine. 1995; 181:1661-1672.

26. Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. Nature reviews Cancer. 2006; 6:38-51.

27. Butler LM, Agus DB, Scher HI, Higgins B, Rose A, Cordon-Cardo C, Thaler HT, Rifkind RA, Marks PA, Richon VM. Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Cancer research. 2000; 60:5165-5170.

28. Geng L, Cuneo KC, Fu A, Tu T, Atadja PW, Hallahan DE. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor LBH589 increases duration of gamma-H2AX foci and confines HDAC4 to the cytoplasm in irradiated non-small cell lung cancer. Cancer research. 2006; 66:11298-11304.

29. Baschnagel A, Russo A, Burgan WE, Carter D, Beam K, Palmieri D, Steeg PS, Tofilon P, Camphausen K. Vorinostat enhances the radiosensitivity of a breast cancer brain metastatic cell line grown *in vitro* and as intracranial xenografts. Molecular cancer therapeutics. 2009; 8:1589-1595.

30. Wang LT, Liou JP, Li YH, Liu YM, Pan SL, Teng CM. A novel class I HDAC inhibitor, MPT0G030, induces cell apoptosis and differentiation in human colorectal cancer cells via HDAC1/PKCdelta and E-cadherin. Oncotarget. 2014; 5:5651-5662. doi: 10.18632/oncotarget.2155.

31. Folkvord S, Ree AH, Furre T, Halvorsen T, Flatmark K. Radiosensitization by SAHA in experimental colorectal carcinoma models-*in vivo* effects and relevance of histone acetylation status. International journal of radiation oncology, biology, physics. 2009; 74:546-552.

32. Saelen MG, Ree AH, Kristian A, Fleten KG, Furre T, Hektoen HH, Flatmark K. Radiosensitization by the histone deacetylase inhibitor vorinostat under hypoxia and with capecitabine in experimental colorectal carcinoma. Radiation oncology. 2012; 7:165.

33. Kano M, Yamada S, Hoshino I, Murakami K, Akutsu Y, Sakata H, Nishimori T, Usui A, Miyazawa Y, Kamada T, Tsujii H, Matsubara H. Effects of carbon-ion radiotherapy combined with a novel histone deacetylase inhibitor, cyclic hydroxamic-acid-containing peptide 31 in human

esophageal squamous cell carcinoma. Anticancer research. 2009; 29:4433-4438.

34. Zhang Y, Adachi M, Zhao X, Kawamura R, Imai K. Histone deacetylase inhibitors FK228, N-(2-aminophenyl)-4-[N-(pyridin-3-yl-methoxycarbonyl)amino-methyl] benzamide and m-carboxycinnamic acid bis-hydroxamide augment radiation-induced cell death in gastrointestinal adenocarcinoma cells. International journal of cancer. 2004; 110:301-308.
35. Camphausen K, Scott T, Sproull M, Tofilon PJ. Enhancement of xenograft tumor radiosensitivity by the histone deacetylase inhibitor MS-275 and correlation with histone hyperacetylation. Clinical cancer research. 2004; 10:6066-6071.
36. Konsoula Z, Cao H, Velena A, Jung M. Adamantanyl-histone deacetylase inhibitor H6CAHA exhibits favorable pharmacokinetics and augments prostate cancer radiation sensitivity. International journal of radiation oncology, biology, physics. 2011; 79:1541-1548.
37. Cuneo KC, Fu A, Osusky K, Huamani J, Hallahan DE, Geng L. Histone deacetylase inhibitor NVP-LAQ824 sensitizes human nonsmall cell lung cancer to the cytotoxic effects of ionizing radiation. Anti-cancer drugs. 2007; 18:793-800.
38. Mueller S, Yang X, Sottero TL, Gragg A, Prasad G, Polley MY, Weiss WA, Matthay KK, Davidoff AM, DuBois SG, Haas-Kogan DA. Cooperation of the HDAC inhibitor vorinostat and radiation in metastatic neuroblastoma: efficacy and underlying mechanisms. Cancer letters. 2011; 306:223-229.
39. Entin-Meer M, Yang X, VandenBerg SR, Lamborn KR, Nudelman A, Rephaeli A, Haas-Kogan DA. *In vivo* efficacy of a novel histone deacetylase inhibitor in combination with radiation for the treatment of gliomas. Neuro-oncology. 2007; 9:82-88.
40. Entin-Meer M, Rephaeli A, Yang X, Nudelman A, VandenBerg SR, Haas-Kogan DA. Butyric acid prodrugs are histone deacetylase inhibitors that show antineoplastic activity and radiosensitizing capacity in the treatment of malignant gliomas. Molecular cancer therapeutics. 2005; 4:1952-1961.
41. Camphausen K, Cerna D, Scott T, Sproull M, Burgan WE, Cerra MA, Fine H, Tofilon PJ. Enhancement of *in vitro* and *in vivo* tumor cell radiosensitivity by valproic acid. International journal of cancer. 2005; 114:380-386.
42. Camphausen K, Burgan W, Cerra M, Oswald KA, Trepel JB, Lee MJ, Tofilon PJ. Enhanced radiation-induced cell killing and prolongation of gammaH2AX foci expression by the histone deacetylase inhibitor MS-275. Cancer research. 2004; 64:316-321.
43. Thiemann M, Oertel S, Ehemann V, Weichert W, Stenzinger A, Bischof M, Weber KJ, Perez RL, Haberkorn U, Kulozik AE, Debus J, Huber PE, Battmann C. *In vivo* efficacy of the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid in combination with radiotherapy in a malignant rhabdoid tumor mouse model. Radiation oncology. 2012; 7:52.
44. Bhalla K, List A. Histone deacetylase inhibitors in myelodysplastic syndrome. Best practice & research Clinical haematology. 2004; 17:595-611.
45. Gueugnon F, Cartron PF, Charrier C, Bertrand P, Fonteneau JF, Gregoire M, Blanquart C. New histone deacetylase inhibitors improve cisplatin antitumor properties against thoracic cancer cells. Oncotarget. 2014; 5:4504-4515. doi: 10.18632/oncotarget.2056.
46. Munshi A, Kurland JF, Nishikawa T, Tanaka T, Hobbs ML, Tucker SL, Ismail S, Stevens C, Meyn RE. Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity. Clinical cancer research. 2005; 11:4912-4922.
47. Fouliard S, Robert R, Jacquet-Bescond A, du Rieu QC, Balasubramanian S, Loury D, Loriot Y, Hollebecque A, Kloos I, Soria JC, Chenel M, Depil S. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling-based optimisation of administration schedule for the histone deacetylase inhibitor abexinostat (S78454/PCI-24781) in phase I. European journal of cancer. 2013; 49:2791-2797.
48. Gressette M, Verillaud B, Jimenez-Pailhes AS, Lelievre H, Lo KW, Ferrand FR, Gattolliat CH, Jacquet-Bescond A, Kraus-Berthier L, Depil S, Busson P. Treatment of nasopharyngeal carcinoma cells with the histone-deacetylase inhibitor abexinostat: cooperative effects with cis-platin and radiotherapy on patient-derived xenografts. PloS one. 2014; 9:e91325.
49. Zhang F, Zhang T, Teng ZH, Zhang R, Wang JB, Mei QB. Sensitization to gamma-irradiation-induced cell cycle arrest and apoptosis by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. Cancer biology & therapy. 2009; 8:823-831.
50. Camphausen K, Tofilon PJ. Inhibition of histone deacetylation: a strategy for tumor radiosensitization. Journal of clinical oncology. 2007; 25:4051-4056.
51. Ozgen U, Savasan S, Buck S, Ravindranath Y. Comparison of DiOC(6)(3) uptake and annexin V labeling for quantification of apoptosis in leukemia cells and non-malignant T lymphocytes from children. Cytometry. 2000; 42:74-78.
52. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. Nature genetics. 2001; 27:247-254.
53. Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. Radiation research. 2002; 158:486-492.
54. Smits KM, Melotte V, Niessen HE, Dubois L, Oberije C, Troost EG, Starmans MH, Boutros PC, Vooijs M, van Engeland M, Lambin P. Epigenetics in radiotherapy: where are we heading? Radiotherapy and oncology. 2014; 111:168-177.

55. Evans RG, Edwards A, Evans S, Elwyn B, Elwyn G. Assessing the practising physician using patient surveys: a systematic review of instruments and feedback methods. Family practice. 2007; 24:117-127.

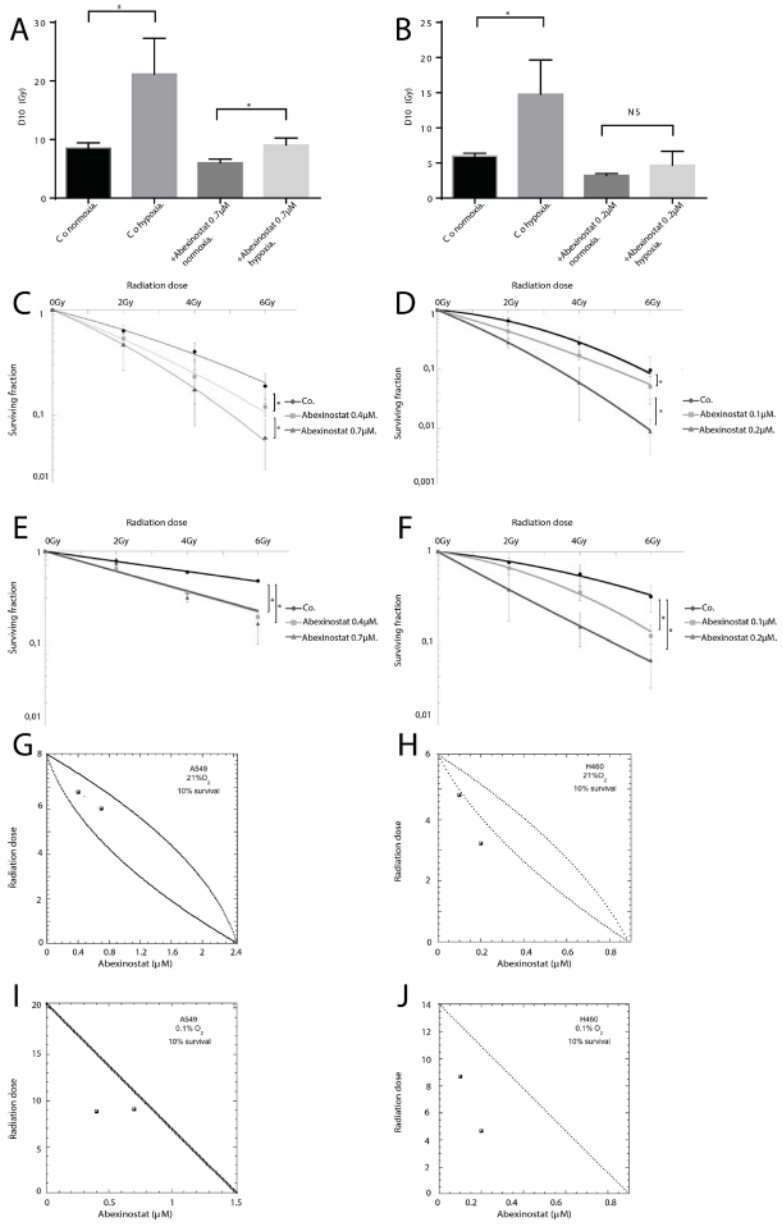
56. Zhang X, Jiang SJ, Shang B, Jiang HJ. Effects of histone deacetylase inhibitor trichostatin A combined with cisplatin on apoptosis of A549 cell line. Thoracic cancer. 2015; 6:202-208.

57. Vokes EE, Senan S, Treat JA, Iscoe NA. PROCLAIM: A phase III study of pemetrexed, cisplatin, and radiation therapy followed by consolidation pemetrexed versus etoposide, cisplatin, and radiation therapy followed by consolidation cytotoxic chemotherapy of choice in locally advanced stage III non-small-cell lung cancer of other than predominantly squamous cell histology. Clinical lung cancer. 2009; 10:193-198.

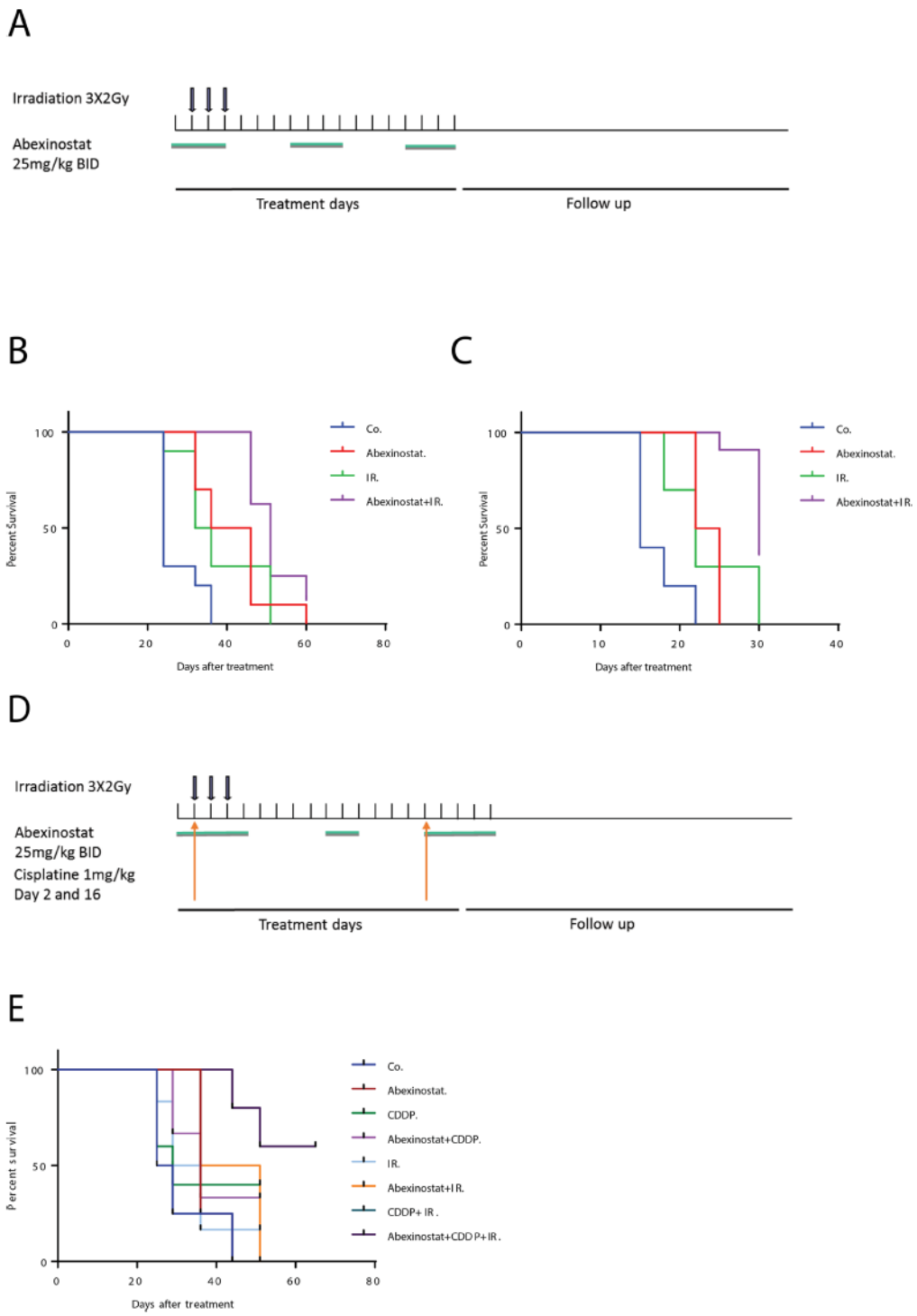
58. Steel GG, Peckham MJ. Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity. International journal of radiation oncology, biology, physics. 1979; 5:85-91.

Time dependent modulation of tumor radiosensitivity by a pan HDAC inhibitor: abexinostat

SUPPLEMENTARY FIGURES AND TABLE



Supplementary Figure 1: Additive and supra-additive effect of irradiation combined with abexinostat *in vitro* in normoxic and hypoxic conditions in NSCLC cells. Doses of radiotherapy in gray (Gy) to achieve 10% cell survival (D10) determined by clonogenic survival assay were lower when adding abexinostat for both A549 **A.** and H460 **B.** respectively at indicated doses. Results represent means ± SD (n=3; t-test; *P < 0.05, **P < 0.01, NS: non-significant). A549 cells **C, E, G, I.** and H460 cells **D, F, H, J.** were treated with indicated increasing concentrations of abexinostat (culture medium as control) for 24 hours then irradiated or not at indicated doses. Clonogenic radiation survival of abexinostat treated A549 (C, E) and H460 (D, F) cells in normoxic (C, D) or hypoxic (0.1% O^2) (E, F) conditions were measured as described under materials and methods and fit to a linear quadratic model (C-F). Culture medium was used as control. Results represent means ± SD (n=3; t-test; *P < 0.05). Error bars represent standard deviations. A supra-additive effect was confirmed by an isobologram analysis for both A549 and H460 cell lines in hypoxia (I-J).



Supplementary Figure 2: *In vivo* treatment schedules and corresponding Kaplan Meier survival curves. Mice bearing A549 or H460 xenografts were treated with +/- abexinostat IP 25mg/kg X 2/d (4 days on, 3 days off, 4 days on, 3 days off, 4 days on) and +/- irradiation at 2Gy/d on day 2, 3 and 4 **A.** Vehicle (HβCD 30%) was used as control. Corresponding Kaplan Meier survival curves for A549 and H460 are represented in **B** and **C.** respectively. Mice bearing A549 xenografted tumors were treated with +/- abexinostat IP 25mg/kg X 2/d (5 days on, 4 days off, 3 days on, 3 days off, 5 days on) +/- Cisplatin IP 1mg/kg 1h before time of irradiation on day 2 and day 16 and +/- irradiation at 2Gy/d on day 2, 3 and 4 **D.** Vehicle (HβCD 30%) was used as control. Corresponding Kaplan Meier survival curve for A549 is represented **E.** Mice were sacrificed after a statistically significant volume difference was reached between groups on day 51 and 65. Therefore a number of data were sensored and we couldn't observe a statistically significant difference in overall survival. A Logrank test for trend was performed and showed a p= 0.0096.

Supplementary Table 1: Abexinostat enhances A549 and H460 cells radiosensitivity in normoxia and hypoxia

	A549 normoxia (21% O_2)				A549 hypoxia (0.1% O_2)			
Conditions	α (Gy^{-1})	β (Gy^{-2})	Mean D_{37} (Gy)	Mean D_{10} (Gy)	α (Gy^{-1})	β (Gy^{-2})	Mean D_{37} (Gy)	Mean D_{10} (Gy)
Control	0.082 ± 0.016 (n=4)	0.022 ± 0.004 (n=4)	5.107 ± 0.33 (n=4)	8.507 ± 0.93 (n=4)	0.113 ± 0.012 (n=2)	-	9.187 ± 2.665 (n=2)	21.15 ± 6.14 (n=2)
Abexinostat 0.4 µM	0.179 ± 0.04 (n=3)	0.022 ± 0.01 (n=3)	3.621 ± 0.29 (n=3)	6.767 ± 0.69 (n=3)	0.2604 ± 0.00 (n=1)	-	3.84 ± 0.00 (n=1)	8.843 ± 0.00 (n=1)
Abexinostat 0.7 µM	0.292 ± 0.04 (n=3)	0.013 ± 0.01 (n=3)	3.078 ± 0.51 (n=3)	6.039 ± 0.62 (n=3)	0.2554 ± 0.025 (n=2)	-	3.938 ± 0.52 (n=2)	9.07 ± 1.19 (n=2)

	H460 normoxia (21% O_2)				H460 hypoxia (0.1% O_2)			
Conditions	α (Gy^{-1})	β (Gy^{-2})	Mean D_{37} (Gy)	Mean D_{10} (Gy)	α (Gy^{-1})	β (Gy^{-2})	Mean D_{37} (Gy)	Mean D_{10} (Gy)
Control	0.199 ± 0.024 (n=4)	0.031 ± 0.007 (n=4)	3.287 ± 0.15 (n=4)	5.976 ± 0.42 (n=4)	0.164 ± 0.014 (n=3)	-	6.416 ± 2.12 (n=3)	14.77 ± 4.87 (n=3)
Abexinostat 0.1 µM	0.359 ± 0.058 (n=2)	0.023 ± 0.018 (n=2)	2.391 ± 0.538 (n=2)	4.812 ± 0.326 (n=2)	0.263 ± 0.02 (n=2)	-	3.78 ± 0.51 (n=2)	8.7 ± 1.17 (n=2)
Abexinostat 0.2 µM	0.312 ± 0.066 (n=3)	0.129 ± 0.03 (n=3)	1.977 ± 0.26 (n=3)	3.227 ± 0.25 (n=3)	0.485 ± 0.05 (n=3)	-	2.03 ± 0.86 (n=3)	4.675 ± 1.98 (n=3)

Alpha and beta values for A549 and H460 cell lines in normoxia and hypoxia and corresponding mean irradiation doses in gray (Gy) to achieve 37% and 10% survival (respectively mean D37 and mean D10) were calculated based on clonogenic survival assays performed as described under materials and methods. For each experiment, the mean D10 dose was calculated using the mean values of alpha and beta determined from the curves drawn for best fit to the experimental data. In each case, the correlation coefficient was more than 0.99 Results represent means ± SD (n= 2 to 5 as indicated in the table).

- **“A phase I dose-escalation study of the oral histone deacetylase inhibitor abexinostat in combination with standard hypofractionated radiotherapy in advanced solid tumors”**

A phase 1 dose-escalation study of the oral histone deacetylase inhibitor abexinostat in combination with standard hypofractionated radiotherapy in advanced solid tumors

Eric Deutsch[1,2,3], Elizabeth Cohen-Jonathan Moyal[4], Vanesa Gregorc[5], Paolo Andrea Zucali[6], Jean Menard[7], Jean-Charles Soria[8], Ioana Kloos[9], Jeff Hsu[10], Ying Luan[10], Emily Liu[10], Remus Vezan[10], Thorsten Graef[10], Sofia Rivera[1,2,3]

[1]Department of Radiation Oncology, Gustave-Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

[2]INSERM 1030 Molecular Radiotherapy, Villejuif, France

[3]Faculté de Médecine, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France

[4]Department of Radiation Oncology, Institut Claudius Regaud, Toulouse, France

[5]Department of Medical Oncology, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico, Ospedale San Raffaele, Milan, Italy

[6]Department of Medical Oncology and Haematology, Humanitas Cancer Center, IRCCS, Rozzano, Italy

[7]Department of Radiation Oncology, Hopital Saint-Louis, Paris, France

[8]DITEP (Département d'Innovations Thérapeutiques et Essais Précoces), Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

[9]Institut de Recherches Internationales Servier, Clinical Pharmacokinetics, Suresnes, France

[10]Pharmacyclics LLC, an AbbVie Company, Sunnyvale, CA, USA

Correspondence to: *Eric Deutsch,* ***email:*** *eric.deutsch@gustaveroussy.fr*

Keywords: *abexinostat, histone deacetylase inhibitor, radiotherapy, solid tumors, brain lesions*

Received: *July 28, 2016* ***Accepted:*** *November 14, 2016* ***Published:*** *December 24, 2016*

ABSTRACT

Current treatments for advanced solid tumors tend to be only palliative. Although radiotherapy is administered with a curative intent, radioresistance and dose-limiting toxicities pose limitations to treatment. Abexinostat, an oral pan-histone deacetylase inhibitor, demonstrated enhanced sensitivity to radiation in various solid tumor cell lines. We conducted an exploratory, phase 1, dose-escalation study of abexinostat in combination with standard hypofractionated radiotherapy in patients with advanced solid tumors treated in a palliative setting. Among 58 treated patients, the median age was 61.5 years (range, 20-82); 47% of the patients had M1 stage disease, and 95% had received previous chemotherapy alone or chemotherapy in combination with surgery and/or radiotherapy. The recommended phase 2 dose was determined to be 90 mg/m² (140 mg). Of the 51 patients evaluable for response, best overall response was 8% (1 complete response [CR], 3 partial responses [PRs]), and best loco-regional response was 12% (1 CR and 5 PRs) at a median follow-up of 16 weeks. Of note, patients with target or non-target brain lesions showed encouraging responses, with 1 patient achieving a best loco-regional response of CR. Treatment-emergent grade ≥3 adverse events (AEs) were few, with most common being thrombocytopenia (17%), lymphopenia (12%), and hypokalemia (7%). Six patients (10%) discontinued treatment due to AEs. No grade ≥3 prolongation of the QTc interval was observed, with no treatment discontinuations due to this AE. Oral abexinostat combined with radiotherapy was well tolerated in patients with advanced solid tumors. The combination may have potential for treatment of patients with brain lesions.

INTRODUCTION

Epigenetic changes such as DNA methylation and post-translational histone acetylation play a critical role in the development of cancer due to their ability to alter the accessibility of transcription factors to DNA and chromatin structure [1]. Histone deacetylases (HDACs) enzymatically remove acetyl groups from histones and thus serve as key

regulators of gene expression. Tumorigenesis is linked to aberrant activity of HDACs such as deacetylation of the tumor suppressor gene *p53*, leading to its decreased transcription [2], and HDAC-mediated upregulation of oncogenes such as *BCL2* [3]. The US Food and Drug Administration has approved the HDAC inhibitors (HDACIs) vorinostat and romidepsin for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma, and romidepsin and belinostat are approved for the treatment of peripheral T-cell lymphoma. Panobinostat in combination with bortezomib and dexamethasone has been approved for the treatment of multiple myeloma. These agents have also been evaluated as single agents in a variety of solid tumors but have shown limited or no activity [4–11]. Due to the broad specificity and moderate activity of the existing HDACIs observed in these studies, a combinatorial approach has been suggested.

Abexinostat is an oral, broad-spectrum, phenyl hydroxamic acid-based pan-HDAC inhibitor that has demonstrated antitumor activity as a single agent in neuroblastoma cell lines [12], as well as in combination with bortezomib in mouse xenograft models [12]. Additionally, abexinostat as a single agent and in combination with chemotherapy has demonstrated significant antiproliferative activity in human soft tissue sarcoma models [13]. Abexinostat-induced apoptosis is known to occur through caspase-8 and the Fas-associated death domain and is associated with a prominent increase in reactive oxygen species [14].

In recent years, HDACIs are emerging as promising radiosensitizing agents that play a critical role in cellular processes, such as cell growth and differentiation, apoptosis, and DNA repair [15]. Pre-treatment with abexinostat enhanced sensitivity to radiation in prostate, colon, lung, and cervical tumor cell lines [16, 17], supporting the clinical role for HDACIs in radiosensitization. HDAC inhibition by abexinostat led to a decrease in the number of cells able to form colonies after irradiation compared with radiation alone. Pre-treatment of colon tumor cells with abexinostat before irradiation induced a strong inhibition of RAD51-containing subnuclear repair foci formation, suggesting that abexinostat may act, in part, by inhibiting DNA repair [17]. Based on the pre-clinical studies showing activity of abexinostat in solid tumor models and enhanced radiosensitization by abexinostat in solid tumor cell lines, an exploratory phase 1, dose escalation study of abexinostat in combination with standard hypofractionated radiotherapy was conducted in patients with advanced solid tumors treated in a palliative setting.

RESULTS

Patients

A total of 62 patients were enrolled in the study between September 2, 2010, and March 25, 2015. Fifty-eight patients received at least 1 dose of the study treatment, of whom 33 patients were treated in schedule 1 and 25 patients in schedule 2. Four patients were withdrawn from the study (3 due to AEs and 1 due to protocol deviation). The number of patients enrolled by schedule and group (supra- and subdiaphragmatic) is shown in Supplementary Table 1. Baseline characteristics of all treated patients are summarized in Table 1. The median age was 61.5 years (range, 20-82), with 38% of patients aged 65 years. The most common primary diagnoses were breast cancer (36%), followed by lung cancer (24%), colorectal cancer (9%), and neuroendocrine cancer (9%); 33% of the patients were staged T2 at baseline, 21% T3, and 17% T4. Overall, 47% of the patients had M1 stage disease and 43% M0. Of the 58 treated patients, 95% had received previous chemotherapy alone or chemotherapy in combination with surgery and/or radiotherapy. Overall, 33% of patients received ≥4 lines of chemotherapy. The most prior common chemotherapy regimens included fluorouracil (40%), cisplatin (33%), cyclophosphamide (29%), docetaxel (28%), and epirubicin (22%). No patient had received surgery or radiotherapy alone, and only 1 patient (2%) had received a combination of surgery and radiotherapy. Two patients (3%) had received no previous therapy for disease control.

In the supradiaphragmatic group, the common sites of irradiation included lung/mediastinum (n=13 patients) and cerebral (n=10), followed by bone lesions (n=7 including 2 scapular, 2 vertebral, 2 sternum, and 1 rib lesion), other thoracic soft tissue (n=4), and cervical (n=3). In the subdiaphragmatic group, the common sites of irradiation were bone lesions (n=12 including 6 vertebral, 2 femoral, and 4 iliac lesions), followed by other soft tissue (n=4 including 1 abdomen, 1 hip, 1 suprarenal, and 1 thigh lesion), pelvis (n=4), and finally organ lesions (n=2) and sites of adenopathy (n=3).

At a median follow-up of 16 weeks (range, 0.6, 52.6), 83% of all treated patients completed the study. Of the 58 treated patients, 10 patients (17%) discontinued treatment. The primary reason for discontinuation was AEs in 6 patients (10%), progressive disease in 2 patients (3%), protocol deviation in 1 patient (2%), and nonmedical reason in 1 patient (2%). No patient was lost to follow-up (Table 2).

Efficacy

Of the 51 patients evaluable for response, best overall response was 8% (1 CR, 3 PRs), and best loco-regional response was 12% (1 CR and 5 PRs) at a median follow-up of 16 weeks (Table 3). The best overall and loco-regional response by supra- and subdiaphragmatic group is shown in Supplementary Table 2.

Ten patients had brain lesions as target or non-target lesions, with the most common primary tumor being breast adenocarcinoma (n=6), followed by 1 case each of adenocarcinoma of the colon, adenocarcinoma of the

Table 1: Baseline characteristics by schedule 1 and 2

Characteristic	Schedule 1 (n=33)	Schedule 2 (n=25)	Schedule 1 + Schedule 2 (N=58)
Median age (range), years	61 (20-76)	61 (37-82)	61.5 (20-82)
>65 years, n (%)	13 (39%)	9 (36%)	22 (38%)
Males, n (%)	13 (39%)	8 (32%)	21 (36%)
Eastern Cooperative Oncology Group performance status, n (%)			
Normal activity without restriction	17 (52%)	6 (24%)	23 (40%)
Ambulatory but restricted in physical activity	15 (46%)	14 (56%)	29 (50%)
Ambulatory but unable to carry out any work	1 (3%)	5 (20%)	6 (10%)
Limited self-care, 50% in bed	0	0	0
Completely disabled, self-care limited	0	0	0
Types of prior therapies, n (%)			
Antineoplastic agents	30 (91%)	22 (88%)	52 (90%)
Endocrine therapy	7 (21%)	7 (28%)	14 (24%)
All other therapeutic products	9 (27%)	4 (16%)	13 (22%)
Drugs for treatment of bone diseases	0 (0%)	3 (12%)	3 (5%)
Pituitary and hypothalamic hormones and analogues	1 (3%)	1 (4%)	2 (3%)
Antiemetics and antinauseants	1 (3%)	0 (0%)	1 (2%)
Diagnostic radiopharmaceuticals	1 (3%)	0 (0%)	1 (2%)
Immunostimulants	1 (3%)	0 (0%)	1 (2%)
Sex hormones and modulators of the genital system	1 (3%)	0 (0%)	1 (2%)
Number of prior chemotherapy lines, n (%)			
1	6 (18%)	3 (12%)	9 (16%)
2	7 (21%)	7 (28%)	14 (24%)
3	9 (27%)	4 (16%)	13 (22%)
≥4	11 (33%)	8 (32%)	19 (33%)
Median number of prior therapy lines (range)	3 (1-10)	3 (1-8)	3 (1-10)
Primary diagnosis, n (%)			
Breast cancer	10 (30%)	11 (44%)	21 (36%)
Lung cancer	7 (21%)	7 (28%)	14 (24%)
Colorectal cancer	5 (15)	0 (0%)	5 (9%)
Neuroendocrine cancer	3 (9%)	2 (8%)	5 (9%)
Malignant melanoma	3 (9%)	0 (0%)	3 (5%)
Other cancers	5 (15%)	5 (20%)	10 (16%)

Table 2: Patient disposition by schedule

All Treated, n (%)	Schedule 1 (n=33)	Schedule 2 (n=25)	Schedule 1 + Schedule 2 (N=58)
Completed	28 (85%)	20 (80%)	48 (83%)
Withdrawn due to	5 (15%)	5 (20%)	10 (17%)
Adverse event	4 (12%)	2 (8%)	6 (10%)
Protocol deviation	1 (3%)	1 (4%)	2 (3%)
Progressive disease	0 (0%)	1 (4%)	1 (2%)
Nonmedical reason	0 (0%)	1 (4%)	1 (2%)
Lost to follow-up	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Table 3: Best overall and loco-regional response by schedule

Best ORR, n (%)	Schedule 1 (n=30)	Schedule 2 (n=21)	Schedule 1 + Schedule 2 (N=51)
CR	0 (0.0%)	1 (5%)	1 (2%)
PR	1 (3%)	2 (10%)	3 (6%)
SD	17 (57%)	10 (48%)	27 (53%)
PD	10 (33%)	8 (38%)	18 (35%)
Non-CR/Non-PD	2 (7%)	0 (0%)	2 (4%)
Objective response rate	1 (3%)	3 (14%)	4 (8%)
95% CI	0.1-17.2	3.0-36.3	2.2-18.9
Best Loco-regional Response Rate, n (%)	**Schedule 1(n=30)**	**Schedule 2(n=21)**	**Schedule 1 + Schedule 2(N=51)**
CR	0 (0%)	1 (5%)	1 (2%)
PR	1 (3%)	4 (19%)	5 (10%)
SD	21 (70%)	11 (52%)	32 (63%)
PD	4 (13%)	4 (19%)	8 (16%)
Non-CR/Non-PD	1 (3%)	1 (5%)	2 (4%)
Objective response rate	1 (3%)	5 (24%)	6 (12%)
95% CI	0.1-17.2	8.2-47.2	4.4-23.9

esophagus, adenocarcinoma of the lung, and melanoma. Loco-regional efficacy assessment was performed in 7 patients. Of 4 patients with brain lesions as target lesions, 1 patient achieved a loco-regional best response of PR, and 3 achieved stable disease (loco-regional response rate 25%). Of 6 patients with brain lesions recorded as non-target lesions, the loco-regional best responses were 1 CR, 4 non-CR/non-PD, and 1 PD (loco-regional response rate 17%). The primary tumor histology for the patient achieving a CR was lung adenocarcinoma. Three patients did not complete the tumor evaluation visit at week 6 as per protocol requirement (they did complete the follow-up visit) and were therefore considered non-evaluable for final efficacy assessment.

Safety

MTDs and DLTs for schedule 1 and 2

Abexinostat was administered BID from day 1 to 5 and during radiotherapy from day 8 to 12 and 15 to 19. This schedule of 5 days on/2 days off (schedule 1) chosen for this study was used with a starting daily dose of 15 mg/m² BID.

The schedule of 4 days on/3 days off (schedule 2) was based on tolerability of abexinostat given as stand-alone therapy observed in the clinical study CL1-78454-002 [18], a study performed during the same timeframe. This schedule is associated with the smallest platelet

decrease [18], and dose levels 75 mg/m^2 BID, 90 mg/m^2 BID, and 105 mg/m^2 BID. Changes in the abexinostat administration schedule were made to increase the hematological therapeutic window of abexinostat.

Twenty-seven patients were evaluated for DLT in schedule 1. MTD1 for schedule 1 was reached at 60 mg/m^2 in the supradiaphragmatic group (2 DLTs for 6 evaluable patients), after which dose escalation was initiated from MTD1 (60 mg/m^2 BID) with schedule 2 of administration (i.e., 4 days on/3 days off per week over 2 weeks). MTD1 of schedule 1 was not reached at 60 mg/m^2 BID in the subdiaphragmatic group, after which dose escalation started from the next dose level (75 mg/m^2 BID) with schedule 2.

Twenty-two patients were evaluated for DLT in schedule 2. MTD2 of schedule 2 was reached at 105 mg/m^2 (160 mg) for the subdiaphragmatic group. Four patients treated at the dose level of 105 mg/m^2 (160 mg) across supra/subdiaphragmatic groups were evaluable for assessment of DLTs. Numbers of patients and DLTs at each dose level within the supra- and subdiaphragmatic groups are given in Supplementary Table 3.

At the highest dose level of 105 mg/m^2 (160 mg), 3 out of 4 evaluable patients had a DLT (2 in subdiaphragmatic group and 1 in supradiaphragmatic group) of hematologic or gastrointestinal origin (2 cases of grade 4 thrombocytopenia and 1 case of grade 3 diarrhea). No clinically meaningful differences were observed between the supra- and subdiaphragmatic groups in terms of frequencies of DLTs. Based on these DLT observations, the study sponsor and study investigators determined that MTD2 was reached at 105 mg/m^2 (160 mg), and the recommended phase 2 dose was therefore considered 90 mg/m^2 (140 mg) for both subdiaphragmatic and supradiaphragmatic groups.

Overall, 98% of all treated patients experienced 1 or more AE. Grade ≥3 AEs occurred in 55% of patients. Grade ≥3 hematologic AEs occurring in more than 1 patient included thrombocytopenia (n=10, 17%), lymphopenia (n=7, 12%), and neutropenia (n=2, 3%) (Table 4). Grade ≥3 nonhematologic AEs occurring in more than 1 patient included hypokalemia (n=4, 7%), asthenia (n=3, 5%), diarrhea (n=2, 3%), gamma-glutamyltransferase increased (n=2, 3%), and decreased appetite (n=2, 3%) (Table 4). No substantial differences were observed in the frequencies of AEs between the supra- and subdiaphragmatic groups. Seventeen patients (29%) experienced an SAE, which were grade ≥3 in 22% of patients. Treatment-related SAEs occurred in 12% of patients (9% grade ≥3). Malignant neoplasm progression leading to death was reported in 3 patients (5%).

Six patients (10%) discontinued treatment due to AEs (4 due to thrombocytopenia, 1 due to vomiting and diarrhea, 1 due to cholangiolitis). No grade ≥3 prolongation of the QTc interval or grade ≥2 prolongation of the QTc interval persisting more than 14 days (as determined by a central electrocardiogram [ECG] reading center) was observed, and no patient discontinued due to QTc interval prolongation.

DISCUSSION

Current treatments for patients with advanced metastatic solid tumors tend to be only palliative, which represents an area of unmet need. Concomitant chemoradiotherapy is an established treatment modality for solid tumors, particularly for loco-regional disease control [19]; however, the main drawback of chemotherapy when combined with radiotherapy is the possible amplification of radiation-induced acute and late toxicity to normal tissues. Thus, there is a need to optimize radiotherapy of metastatic solid tumors using combination agents that are active and tolerable.

Through preclinical studies in cancer models, HDACIs are emerging as radiation sensitizers, suggesting their clinical potential in combination with radiotherapy. Our preclinical data using an EMT-6 tumor-bearing murine model demonstrated that combination of low-dose radiation (2 Gy) and abexinostat led to inhibition of tumor growth and improved survival benefit compared with abexinostat alone or low-dose radiation alone (Supplementary Figures 1A and 1B). Previous studies demonstrated that following IV administration of radiolabeled [^{14}C]-abexinostat, unchanged parent drug was the major component in the plasma, and radioactivity was widely distributed in all tissues, especially cerebellum, cerebrum, and cerebrospinal fluid, indicating that radiolabeled abexinostat crossed the blood-brain barrier (data not shown).

The current phase 1 study was designed to evaluate initial safety and tolerability of the novel HDACI abexinostat in combination with radiotherapy, with the intent of systemic disease assessment, such as secondary tumor sites in the setting of palliation, where long-term toxicities are different from those in early-stage localized disease [20]. The major limitation of the use of a trial design, such as ours, focusing on patients receiving radiation with a palliative intent (i.e., 30 Gy in 10 fractions of 3 Gy) without focusing on a specifically defined tumor location is that the trial generates information about normal tissue tolerance (the major objective of a radiation + new drug phase 1 trial), but only after irradiation of variable normal tissues and dose-limiting organs. Given the fact that the normal lung and bowel are major dose-limiting organs, but display different volume and radiation dose tolerance, the design of our trial included 2 distinct cohorts, the subdiaphragmatic group that is more likely to accrue patients for whom radiation fields encompass the bowel, and the supradiaphragmatic group that is more likely to include the lung into the irradiated volume [20]. However, we believe that this type of

Table 4: Overview of common AEs (>10%) and grade ≥3 AEs in >1 patient

	AE (>10%)	Any grade	Grade ≥3
Hematologic AEs, n (%)	Thrombocytopenia	32 (55%)	10 (17%)
	Lymphopenia	8 (14%)	7 (12%)
	Anemia	8 (14%)	0 (0%)
	Neutropenia	4 (7%)	2 (3%)
Nonhematologic AEs, n (%)	Nausea	32 (55%)	1 (2%)
	Diarrhea	29 (50%)	2 (3%)
	Asthenia	28 (48%)	3 (5%)
	Vomiting	26 (45%)	0 (0%)
	Decreased appetite	15 (26%)	2 (3%)
	Anemia	8 (14%)	0 (0%)
	Headache	8 (14%)	0 (0%)
	Constipation	7 (12%)	0 (0%)
	Dry mouth	7 (12%)	0 (0%)
	Hypokalemia	5 (9%)	4 (7%)
	Neutropenia	4 (7%)	2 (3%)
	Malignant neoplasm progression	3 (5%)	3 (5%)
	Gamma-glutamyltransferase increased	2 (3%)	2 (3%)

design was probably the safest in terms of risk/benefit balance when a drug is combined with radiation for the first time in humans. Previously used by other groups [21, 22], this type of design offers the advantage of a better safety balance when a drug is combined with radiation in human subjects for the first time. This is especially important because this type of trials select patients requiring palliative radiotherapy without concurrent chemotherapy (platinum, 5-fluorouracil, etc). On the contrary, a trial addressing solely one type of localized cancer treated with radiotherapy in a curative intent might have provided more information in terms of tolerance for a given organ; however, this type of trial would have inevitability carried the risk of major, permanent toxicity in a population of patients amenable to cure.

PK/pharmacodynamic modeling studies have been able to predict the optimal schedule of abexinostat allowing higher doses with minimal thrombocytopenia, showing that an abexinostat dosing schedule of 4 days on/3 days off (schedule 2 in the present study) was associated with smaller platelet decrease. The MTD2 reached for this optimized schedule was 105 mg/m^2 BID, and the recommended dose, 90 mg/m^2 BID [18]. These doses are in agreement with the findings of this study. We speculated that the unique PK profile of abexinostat (half-life 4-5 hours) with twice daily dosing [18] may provide an advantageous safety profile in combination with radiotherapy for the treatment of advanced solid tumors.

Safety data demonstrated good tolerability of abexinostat combined with hypofractionated palliative radiotherapy in this patient population of advanced solid tumors. No marked differences were observed in the frequencies of DLTs or AEs between the supra- and subdiaphragmatic groups. Thrombocytopenia was the most common hematologic toxicity, reported in 55% of the patients, with grade ≥3 in 17%. This result is consistent with the finding that thrombocytopenia is less frequently observed with the 4 days on/3 days off schedule [20] compared with a high frequency of grade ≥3 thrombocytopenia with a 14-day dosing schedule (21-day cycle) in patients with non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia [21]. The most common nonhematologic toxicities reported were nausea, diarrhea, asthenia, and vomiting, which have been commonly observed in previous studies with HDACIs. Cardiotoxicities such as QT/QTc prolongation have been a safety concern with the use of existing HDACIs in some instances [23, 24]. In the current study, no grade ≥3 prolongation of the QTc interval (as determined by a central ECG reading center) was observed. Only 2 patients on schedule 2 had a grade 1/2 prolongation of QTc, and no patient discontinued treatment due to QTc interval prolongation. QT prolongations (grade 2) in both patients

resolved without dose reductions, were not serious, and were assessed by the investigator as unlikely related to the study treatment. Overall, only 10% of all treated patients discontinued treatment, demonstrating a tolerable safety profile of abexinostat in combination with radiotherapy.

The combination of abexinostat and low-dose radiotherapy led to a loco-regional response rate of 12%, with 5 PRs and 1 CR in the current study, and a substantial proportion of patients (63%) achieved a best loco-regional response of stable disease. A longer follow-up and a larger sample size is warranted to monitor these responses. No clinically significant differences in efficacy were observed between schedules 1 and 2 or supra/subdiaphragmatic groups. Due to the larger number of patients enrolled in some dose cohorts, a statistically valid conclusion could not be made for the dose/response relationship.

The ability of abexinostat to cross the blood-brain barrier demonstrated in pre-clinical studies is supported by the encouraging loco-regional responses observed in patients with brain lesions in this study and suggests that abexinostat in combination with radiotherapy may constitute a treatment option for these lesions. These findings are notable (particularly a best response of CR in 1 patient with brain lesions as non-target lesion) given the modest activity of currently approved HDACIs, vorinostat and romidepsin, as single agents or in combination therapy in patients with high-grade gliomas [25] and with glioblastoma [26–28].

Of note, HDACIs have been demonstrated to exert immunomodulatory effects in cancer cells, such as enhanced expression of natural killer cell–activating ligands, MHC class I and II molecules, and CD40 molecules [29–31]. It was demonstrated that vorinostat elicits antitumor immunity in colon cancer mouse models through immunogenic cell death [32]. The abscopal effect of radiation has been shown to be immune-mediated [33], in part by IL-12 [34], dendritic cells, and T cells [35]. Thus, the immunomodulatory effects of abexinostat have marked implications for radiotherapy and warrant evaluation of the combination in future radiotherapy studies.Subsequent trials with a focus on a particular tumor type are needed that can first test the combination in a phase I/II setting, especially if higher radiation doses or concurrent chemotherapy are investigated in combination with abexinostat.

In summary, oral abexinostat in combination with hypofractionated radiotherapy demonstrates activity with specific loco-regional responses in patients with metastatic solid tumors who have undergone prior surgery with

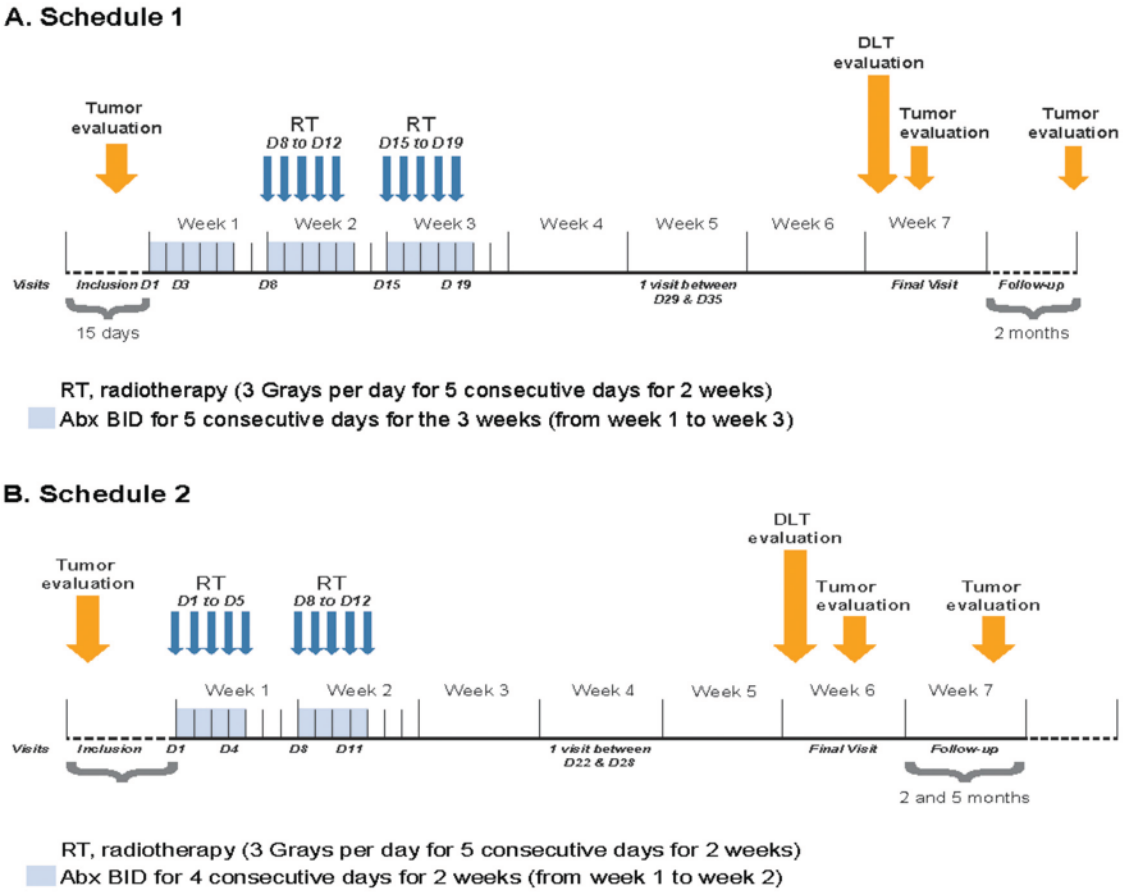


Figure 1: Study Design. A. Schedule 1. **B.** Schedule 2.

chemotherapy or chemoradiotherapy. The combination is well tolerated, with the majority of AEs being grade 1/2. Although our patient population was small, based on the positive results observed, the potential of this combination for the treatment of patients with brain lesions should be investigated further in a larger population and with longer follow-up.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

Investigation has been conducted in accordance with the ethical standards and according to the Declaration of Helsinki and according to national and international guidelines and has been approved by the authors' institutional review board. Written consent was obtained from each patient prior to study entry.

EMT-6 murine breast carcinoma model

Tumor volumes before and after treatment was assessed in 4 groups: vehicle only, abexinostat only, low-radiation only, and combination of low-dose radiotherapy and abexinostat (n=10 each). Female BALB/c mice 8 to 12 weeks old were injected in the flank region with 5×10^6 EMT-6 tumor cells in 0% Matrigel (cell injection volume was 0.1 mL/mouse). Treatment was started on matched pairs when tumors reached an average size of 50-70 mm^3. Tumors were irradiated at a dose of 2 Gy/animal for 5 days (1 cycle). Abexinostat (IP) was administered concurrently at a dose of 12 mg/kg BID, 6 hours apart, 5 days on/2 days off/week for 4 weeks. Mice were monitored until tumor volume reached 2000 mm^3 or 45 days, whichever came first. Tumor volumes were measured twice per week in two dimensions using a calipers, and the volume was expressed in mm^3 using the formula: $V = 0.5\ a \times b^2$ where a and b are the long and short diameters of the tumor, respectively. Kaplan-Meier survival curves of EMT-6 tumor-bearing mice were analyzed until 45 days after the start of treatment.

Study design

We conducted a multicenter, open-label, exploratory phase 1, dose-escalation study at 6 centers in Italy and France. Eligible patients had histologically confirmed solid tumors with measurable disease and required a course of hypofractionated palliative radiotherapy. These included patients with metastatic tumors with locally advanced disease for which primary tumor management before systemic treatment was required; primary tumors in relapse, tumors not previously irradiated, and tumors requiring hypofractionated radiotherapy; metastatic localization requiring hypofractionated radiotherapy; and patients not fit for conventional chemoradiotherapy. Other eligibility criteria included an Eastern Cooperative Oncology Group performance status ≤2; an estimated life expectancy >20 weeks; and adequate hematologic, cardiac, renal, and hepatic functions. Exclusion criteria included allogenic bone marrow transplant; major surgery within 4 weeks before first day of treatment; chemotherapy within 3 weeks (6 weeks in case of nitrosoureas) of study treatment administration; previous radiotherapy on the same area; immunotherapy or hormone therapy within 2 weeks except stable luteinizing hormone-releasing hormone agonist therapy for prostate cancer, stable oral glucocorticoid and mineralocorticoid replacement for adrenal insufficiency, stable mitotane for adrenal carcinoma, or oral contraceptives treatment with other anti-neoplastic agents within 3 weeks; concurrent therapeutic anticoagulation by vitamin K antagonists; any treatment known to prolong QTc interval; treatment with valproic acid within 5 days of study drug administration; and prophylactic use of growth factors.

Abexinostat and radiotherapy schedule

Abexinostat in combination with a fixed radiation dose (30 Gy in 10 daily fractions of 3 Gy, 5 days per week over 2 weeks) was administered in 2 schedules. For schedule 1, treatment with abexinostat started 1 week before starting hypofractionated radiotherapy in order to induce biological modifications in tumor cells before radiation and then continued concomitantly with hypofractionated radiotherapy for 2 weeks. Abexinostat was given twice a day (BID) from day 1 to 5 and during radiotherapy from day 8 to 12 and 15 to 19. The schedule of 5 days on/2 days off (schedule 1) chosen for this study was based on tolerability and activity of abexinostat observed in the clinical study PCYC-0402 [18]. The choice of this schedule also allowed the administration of abexinostat concomitantly with radiotherapy. In order to increase safety margin of the combination of abexinostat with radiotherapy, we chose a starting daily dose of 15 mg/m^2 BID for the present study, which is 25% of the recommended dose of 60 mg/m^2 BID found in PCYC-0402 study and 1 dose level below the starting dose used in the PCYC-0402 study.

For schedule 2, abexinostat and hypofractionated radiotherapy were administered concomitantly from day 1 to day 4 and from day 8 to day 11 (Figure 1). The schedule of 4 days on/3 days off (schedule 2) chosen for this study was based on tolerability of abexinostat observed in the clinical study CL1-78454-002 [20]. This schedule is associated with the smallest platelet decrease [20], and dose levels 75 mg/m^2 BID, 90 mg/m^2 BID, and 105 mg/m^2 BID were investigated.

For both schedules, radiotherapy was administered using a 3-dimensional conformal technique. Patients received hypofractionated external beam irradiation using linear accelerators with photon energies ≥4 megavolts. Patients within the 2 schedules were categorized

according to the localization of the radiation field (supradiaphragmatic and subdiaphragmatic group) in order to evaluate radiotherapy-related potential toxicities specific to the irradiated regions.

Dose escalation followed a 3 + 3 algorithm-based design and continued until maximum tolerated dose (MTD) was achieved based on protocol-defined dose-limiting toxicities (DLTs) defined as the occurrence in cycle 1 of any of the following: a grade 3 nonhematologic adverse event (AE), grade 3 prolongation of the QTc interval, grade 4 neutropenia lasting >5 days on growth factors, grade 4 thrombocytopenia, or failure to restart abexinostat administration within 2 weeks. Dose escalation to the next level proceeded after DLT assessment over the 3-week treatment period for schedule 1 or over the 2-week treatment period for schedule 2, and the following 3 weeks without treatment. Tumor evaluation was performed 3 weeks after treatment completion and after a 2-month follow-up. AEs at each visit were graded according to the Common Toxicity Criteria for Adverse Events [CTCAE] v3.0) [36]. Serious AEs (SAEs) were those events that were fatal, life threatening, required hospitalization, disabling, or judged to be medically significant.

Study objectives and assessments

The primary objectives of the study were to assess the safety and tolerability of oral abexinostat given in combination with standard hypofractionated radiotherapy in patients with advanced solid tumor in terms of MTD and to establish the recommended phase 2 dose. The secondary objectives were to assess safety and tolerability of the combination, to evaluate tumor responses of the combination, and to analyze the pharmacokinetic (PK) profile of abexinostat and its metabolites. Tumor responses as defined by loco-regional response rate and overall response rate (ORR) were assessed per the revised Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST version 1.1) [37].

ORR was defined as proportion of patients exhibiting a complete response (CR) or a partial response (PR) per the RECIST criteria (version 1.1). Loco-regional response rate was defined as the proportion of patients exhibiting a CR or a PR per the RECIST criteria (version 1.1) using tumor lesions encompassed within the radiation field. Lesions were evaluated by both clinical exam and computed tomography imaging. Electrocardiograms were performed at screening and both at pre-first dose and 1 to 1.5 hours post-first dose on days 1, 3, 8, 15, 19, and final visit of schedule 1 and days 1, 4, 8, 11, and final visit of schedule 2.

Statistical analysis

The efficacy analyses were performed in the full analysis set, which included patients who had received at least 1 dose of study treatment and who had at least 1 baseline and 1 post-baseline tumor evaluation. Best overall response per investigator assessment was provided for each dose level and overall population by schedule and group. Response rates (loco-regional response and ORR) and corresponding exact binomial 95% confidence interval were provided. Safety analyses were conducted on the safety set in each anatomically based group by dose level. Safety was assessed with a description of DLTs on the DLT-evaluable population comprising patients who completed the total treatment period of 3 weeks for schedule 1 and 2 weeks for schedule 2 and 3 weeks without treatment period (i.e., evaluation period) following total treatment period or who discontinued due to DLT during total treatment or 3 weeks without treatment period. Descriptive statistics were used for evaluating toxicity (according to CTCAE v3.0), AEs, physical examination, performance status, vital signs, and laboratory tests.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the patients who participated in the study and their supportive families, and the investigators and clinical research staff from the study centers. Medical writing assistance was provided by Swati Ghatpande, PhD, and was funded by Pharmacyclics LLC, an AbbVie company.

CONFLICTS OF INTEREST

ED, consulting or advisory role for Roche, research funding from Servier, Roche, AstraZeneca, travel accommodations from Merck, Roche; ECJM, consulting or advisory role for Merck; VG, consulting or advisory role for and travel accommodations from Pfizer, Novartis, Eli Lilly, Roche, AstraZeneca, Boehringer Ingelheim; PAZ, no relevant financial disclosures; JM, no relevant financial disclosures; JCS, no relevant financial disclosures; IK, patients, royalties, or other intellectual property for Servier; JH, employment with Pharmacyclics and Astellas Pharma (Agensys), stock or other ownership for AbbVie; YL, employment with Pharmacyclics, stock or other ownership for AbbVie; EL, employment for Pharmacyclics, Theorem Clinical Research, stock or other ownership for AbbVie; RV, employment for Pharmacyclics, stock or other ownership for AbbVie; TG, employment and patents, royalties, or other intellectual property for Pharmacyclics, stock or other ownership for AbbVie; SR, travel accommodations from Novartis.

GRANT SUPPORT

Not applicable. Trial was funded by Pharmacyclics LLC, an AbbVie Company.

REFERENCES

1. Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. Nat Rev Drug Discov. 2006; 5:37-50.
2. Luo JY, Su F, Chen DL, Shiloh A, Gu W. Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. Nature. 2000; 408:377-381.
3. Duan H, Heckman CA, Boxer LM. Histone deacetylase inhibitors down-regulate bcl-2 expression and induce apoptosis in t(14;18) lymphomas. Mol Cell Biol. 2005; 25:1608-1619.
4. Doi T, Hamaguchi T, Shirao K, Chin K, Hatake K, Noguchi K, Otsuki T, Mehta A, Ohtsu A. Evaluation of safety, pharmacokinetics, and efficacy of vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, in the treatment of gastrointestinal (gi) cancer in a phase I clinical trial. Int J Clin Oncol. 2013; 18:87-95.
5. Amiri-Kordestani L, Luchenko V, Peer CJ, Ghafourian K, Reynolds J, Draper D, Frye R, Woo S, Venzon D, Wright J, Skarulis M, Figg WE, Fojo T, et al. Phase I trial of a new schedule of romidepsin in patients with advanced cancers. Clin Cancer Res. 2013; 19:4499-4507.
6. Ramalingam SS, Belani CP, Ruel C, Frankel P, Gititz B, Kocywas M, Espinoza-Delgado I, Gandara D. Phase II study of belinostat (PXD101), a histone deacetylase inhibitor, for second line therapy of advanced malignant pleural mesothelioma. J Thorac Oncol. 2009; 4:97-101.
7. Woyach JA, Kloos RT, Ringel MD, Arbogast D, Collamore M, Zwiebel JA, Grever M, Villalona-Calero M, Shah MH. Lack of therapeutic effect of the histone deacetylase inhibitor vorinostat in patients with metastatic radioiodine-refractory thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab. 2009; 94:164-170.
8. Martinet N, Bertrand P. Interpreting clinical assays for histone deacetylase inhibitors. Cancer Manage Res. 2011; 3:117-141.
9. Whitehead RP, Rankin C, Hoff PM, Gold PJ, Billingsley KG, Chapman RA, Wong L, Ward JH, Abbruzzese JL, Blanke CD. Phase 2 trial of romidepsin (NSC-630176) in previously treated colorectal cancer patients with advanced disease: a Southwest Oncology Group study (S0336). Invest New Drugs. 2009; 27:469-475.
10. Stadler WM, Margolin K, Ferber S, McCulloch W, Thompson JA. A Phase 2 study of depsipeptide in refractory metastatic renal cell cancer. Clin Genitourin Cancer. 2006; 5:57-60.
11. Giaccone G, Rajan A, Berman A, Kelly RJ, Szabo E, Lopez-Chavez A, Trepel J, Lee MJ, Cao L, Espinoza-Delgado I, Spittler J, Loehrer PJ Sr. Phase II study of belinostat in patients with recurrent or refractory advanced thymic epithelial tumors. J Clin Oncol. 2011; 29:2052-2059.
12. Sholler GS, Currier EA, Dutta A, Slavik MA, Illenye SA, Mendonca MC, Dragon J, Roberts SS, Bond JP. PCI-24781 (abexinostat), a novel histone deacetylase inhibitor, induces reactive oxygen species-dependent apoptosis and is synergistic with bortezomib in neuroblastoma. J Cancer Ther Res. 2013; 2:21.
13. Lopez G, Liu J, Ren W, Wei W, Wang S, Lahat G, Zhu QS, Bornmann WG, McConkey DJ, Pollock RE, Lev DC. Combining PCI-24781, a novel histone deacetylase inhibitor, with chemotherapy for the treatment of soft tissue sarcoma. Clin Cancer Res. 2009; 15:3472-3483.
14. Rivera-Del Valle N, Gao S, Miller CP, Fulbright J, Gonzales C, Sirisawad M, Steggerda S, Wheler J, Balasubramanian S, Chandra J. PCI-24781, a novel hydroxamic acid HDAC inhibitor, exerts cytotoxicity and histone alterations via caspase-8 and FADD in leukemia cells. Int J Cell Biol. 2010; 2010:207420.
15. Mottamal M, Zheng S, Huang TL, Wang G. Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. Molecules. 2015; 20:3898-3941.
16. Banuelos CA, Banáth JP, MacPhail SH, Zhao J, Reitsema T, Olive PL. Radiosensitization by the histone deacetylase inhibitor PCI-24781. Clin Cancer Res. 2007; 13:6816-6826.
17. Adimoolan S, Sirisawad M, Chen J, Thiemann P, Ford JM, Buggy JJ. HDAC inhibitor PCI-24781 decreases RAD51 expression and inhibits homologous recombination. Proc Natl Acad Sci USA. 2007; 104:19482-19487.
18. Fouliard S, Robert R, Jacquet-Bescond A, du Rieu QC, Balasubramanian S, Loury D, Loriot Y, Hollebecque A, Kloos I, Soria JC, Chenel M, Depil S. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling-based optimisation of administration schedule for the histone deacetylase inhibitor abexinostat (S78454/PCI-24781) in phase I. Eur J Cancer. 2013; 49:2791-2797.
19. Seiwert TY, Salama JK, Vokes EE. The concurrent chemoradiation paradigm--general principles. Nat Clin Pract Oncol. 2007; 4:86-100.
20. Deutsch E, Soria JC, Armand JP. New concepts for phase I trials: evaluating new drugs combined with radiation therapy. Nat Clin Pract Oncol. 2005; 2:456-465.
21. Harrington KJ, Hingorani M, Tanay MA, Hickey J, Bhide SA, Clarke PM, Renouf LC, Thway K, Sibtain A, McNeish IA, Newbold KL, Goldsweig H, Coffin R, et al. Phase I/II study of oncolytic HSV GM-CSF in combination with radiotherapy and cisplatin in untreated stage III/IV squamous cell cancer of the head and neck. Clin Cancer Res. 2010; 16:4005-4015.
22. Pugh TJ, Chen C, Rabinovitch R, Eckhardt SG, Rusthoven KE, Swing R, Raben D. Phase I trial of bortezomib and concurrent external beam radiation in patients with advanced solid malignancies. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2010; 78:521-526.
23. Ribrag V, Kim WS, Bouabdallah R, Lim ST, Coiffier B, Felloussi Z, Kloos I, Luan Y, Graef Y, Morschhauser F. Safety and efficacy of abexinostat, a pan- histone deacetylase inhibitor, in non-Hodgkin lymphoma and

chronic lymphocytic leukemia: results of an ongoing phase 2 study. Blood. 2015; 126:256.

24. Gryder BE, Sodji QH, Oyelere AK. Targeted cancer therapy: giving histone deacetylase inhibitors all they need to succeed. Future Med Chem. 2012; 4:505-524.
25. Lee EQ, Puduvalli VK, Reid JM, Kuhn JG, Lamborn KR, Cloughesy TF, Chang SM, Drappatz J, Yung WK, Gilbert MR, Robins HI, Lieberman FS, Lassman AB, et al. Phase I study of vorinostat in combination with temozolomide in patients with high-grade gliomas: North American Brain Tumor Consortium Study 04-03. Clin Cancer Res. 2012; 18:6032-6039.
26. Galanis E, Jaeckle KA, Maurer MJ, Reid JM, Ames MM, Hardwick JS, Reilly JF, Loboda A, Nebozhyn M, Fantin VR, Richon VM, Scheithauer B, Giannini C, et al. Phase II trial of vorinostat in recurrent glioblastoma multiforme: a north central cancer treatment group study. J Clin Oncol. 2009; 27:2052-2058.
27. Iwamoto FM, Lamborn KR, Kuhn JG, Wen PY, Yung WK, Gilbert MR, Chang SM, Lieberman FS, Prados MD, Fine HA. A phase I/II trial of the histone deacetylases inhibitor romidepsin for adults with recurrent malignant glioma: North American Brain Tumor Consortium Study 03-03. Neuro Oncol. 2011; 13:509-516.
28. Friday BB, Anderson SK, Buckner J, Yu C, Giannini C, Geoffroy F, Schwerkoske J, Mazurczak M, Gross H, Pajon E, Jaeckle K, Galanis E. Phase II trial of vorinostat in combination with bortezomib in recurrent glioblastoma: a North Central Cancer Treatment Group study. Neuro Oncol. 2012; 14:215-221.
29. Khan AN, Magner WJ, Tomasi TB. An epigenetic vaccine model active in the prevention and treatment of melanoma. J Transl Med. 2007; 5:64.
30. Magner WJ, Kazim AL, Stewart C, Romano MA, Catalano G, Grande C, Keiser N, Santaiello F, Tomasi TB. Activation of MHC class I, II, and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors. J Immunol. 2000; 165:7017-7024.
31. Skov S, Pedersen MT, Andresen L, Straten PT, Woetmann A, Odum N. Cancer cells become susceptible to natural killer cell killing after exposure to histone deacetylase inhibitors due to glycogen synthase kinase-3-dependent expression of MHC class I-related chain A and B. Cancer Res. 2005; 65:11136-11145.
32. West AC, Mattarollo SR, Shortt J, Cluse LA, Christiansen AJ, Smyth MJ, Johnstone RW. An intact immune system is required for the anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. Cancer Res. 2013; 73:7265-7276.
33. Liauw SL, Connell PP, Weichselbaum RR. New paradigms and future challenges in radiation oncology: an update of biological targets and technology. Sci Transl Med. 2013; 5:173sr2.
34. Seetharam S, Staba MJ, Schumm LP, Schreiber K, Schreiber H, Kufe DW, Weichselbaum RR. Enhanced eradication of local and distant tumors by genetically produced interleukin-12 and radiation. Int J Oncol. 1999; 15:769-773.
35. Demaria S, Ng B, Devitt ML, Babb JS, Kawashima N, Liebes L, Formenti SC. Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2004; 58:862-870.
36. National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v4.0. Available at: http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/docs/ctcaev3.pdf.
37. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). Eur J Cancer. 2009; 45:228-247.

A phase 1 dose-escalation study of the oral histone deacetylase inhibitor abexinostat in combination with standard hypofractionated radiotherapy in advanced solid tumors

SUPPLEMENTARY TABLES AND FIGURE

Supplementary Table 1: Number of patients enrolled by schedule and radiotherapy region

Subdiaphragmatic (n=25)					
	Dose Level (BID)	**# of Patients**		**Dose Level (BID)**	**# of Patients**
Schedule 1	15 mg/m^2	3	**Schedule 2**	60 mg/m^2	0
	30 mg/m^2	3		75 mg/m^2=120 mg	3
	45 mg/m^2	3		90 mg/m^2=140 mg	3
	60 mg/m^2	5		105 mg/m^2=160 mg	5
Supradiaphragmatic (n=33)					
Schedule 1	15 mg/m^2	3	**Schedule 2**	60 mg/m^2	6
	30 mg/m^2	4		75 mg/m^2 =120 mg	4
	45 mg/m^2	3		90 mg/m^2 =140 mg	3
	60 mg/m^2	9		105 mg/m^2=160 mg	1

Supplementary Table 2: Best loco-regional response and overall response by radiotherapy region

Best Loco-regional Response, n (%)	Supradiaphragmatic (n=29)	Subdiaphragmatic (n=22)
CR	0 (0.0%)	1 (5%)
PR	4 (14%)	1 (5%)
Stable disease (SD)	18 (62%)	14 (64%)
PD	5 (17%)	3 (14%)
Non CR/Non PD	0 (0%)	2 (9%)
Objective response rate	4 (14%)	2 (9%)
95% CI	3.9-31.7	1.1-29.2
Best Overall Response, n (%)		
CR	0 (0%)	1 (5%)
PR	3 (10%)	0 (0%)
SD	15 (52%)	12 (55%)
PD	11 (38%)	7 (32%)
Non-CR/Non-PD	0 (0%)	2 (9%)
Objective response rate	3 (10%)	1 (5%)
95% CI	2.2-27.4	0.1-22.8

Supplementary Table 3: DLTs by radiotherapy region and dose levels

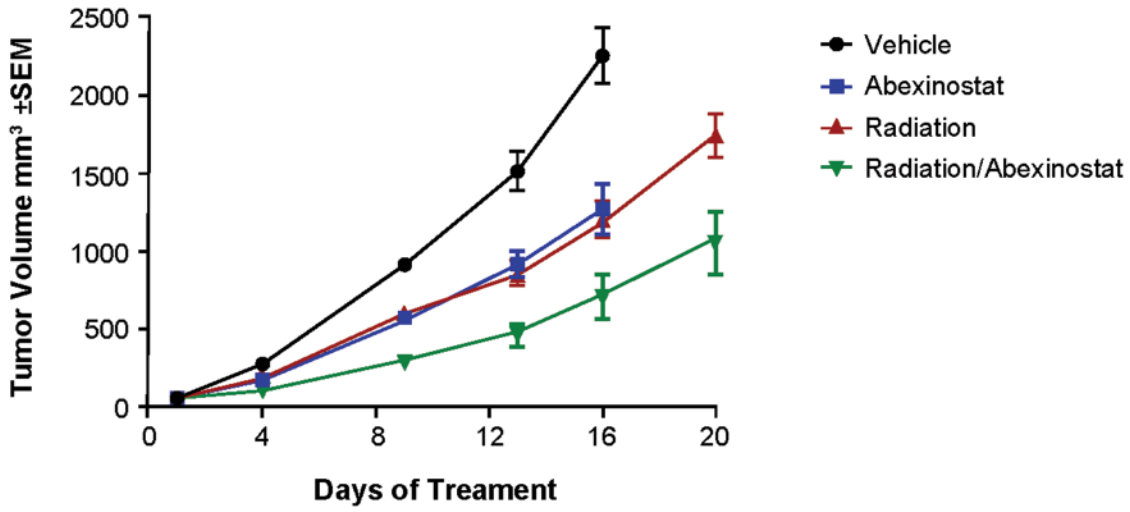
Schedule 1 (n=27)							
		Subdiaphragmatic		Supradiaphragmatic		Total Numbers	
	Dose Level	# of Patients	# of DLTs	# of Patients	# of DLTs	# of Evaluable Patients	# of DLTs
5d/7, 3w, 1 cycle Hydrochloride formula	15 mg/m^2	3	0	3	0	6	0
	30 mg/m^2	3	0	4 (1 NE)	0	6	0
	45 mg/m^2	3	0	3	0	6	0
	60 mg/m^2	5 (2 NE)	0	9 (3 NE)[b]	2	9	2
Schedule 2 (n=23)							
		Subdiaphragmatic		Supradiaphragmatic		Total Numbers	
	Dose Level	# of Patients	# of DLTs	# of Patients	# of DLTs	# of Evaluable Patients	# of DLTs
4d/7, 2w, 1 cycle Hydrochloride formula/ tosylate formula	60 mg/m^2	-	-	7 (1 NE)	1	6	1
	75 mg/m^2 =120 mg[a]	3	0	5 (2 NE)	0	6	0
	90 mg/m^2 =140 mg[a]	3	0	4 (1 NE)	0	6	0
	105 mg/m^2 =160 mg[a]	5 (1 NE)[c]	2	1	1	5	3

DLTs, dose-limiting toxicities; NE, not evaluable.

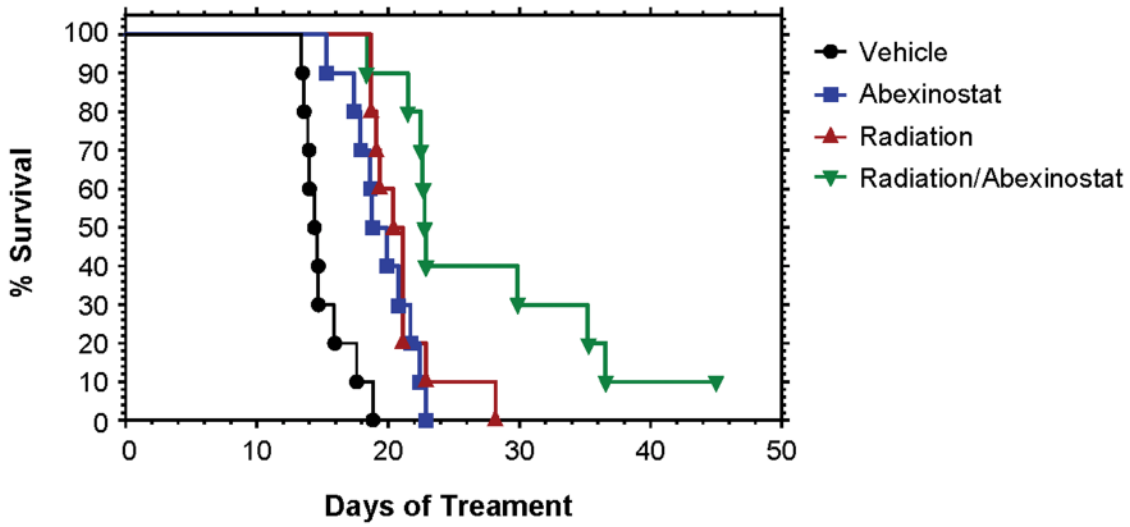
[a]Equivalence in tosylate formula.

[b]MTD1 for schedule 1 was reached at 60 mg/m^2 in supradiaphragmatic group.

[c]MTD2 of schedule 2 was reached at 105 mg/m^2 (160 mg[a]) for subdiaphragmatic group.



Supplementary Figure 1A: Mean tumor growth inhibition in murine breast cancer model (EMT-6).



Supplementary Figure 1B: Kaplan-Meier survival curve in murine breast cancer model.

ARTICLES PUBLIES

- **"Phasel trial of everolimus in combination with thoracic radiotherapy in non-small-cell lung cancer"**

22. Neskey DM, Osman AA, Ow TJ et al. Evolutionary Action score of TP53 (EAp53) identifies high risk mutations associated with decreased survival and increased distant metastases in head and neck cancer. Cancer Res 2015 Jan 29 [Epub ahead of print].
23. Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. Nat Rev Cancer 2009; 9: 701–713.
24. Moser R, Xu C, Kao M et al. Functional kinomics identifies candidate therapeutic targets in head and neck cancer. Clin Cancer Res 2014; 20: 4274–4288.
25. Bauman JE, Chung CH. CHK it out! Blocking WEE kinase routs TP53 mutant cancer. Clin Cancer Res 2014; 20: 4173–4175.
26. Turner JH, Reh DD. Incidence and survival in patients with sinonasal cancer: a historical analysis of population-based data. Head Neck 2012; 34: 877–885.
27. Ayiomamitis A, Parker L, Havas T. The epidemiology of malignant neoplasms of the nasal cavities, the paranasal sinuses and the middle ear in Canada. Arch Otorhinolaryngol 1988; 244: 367–371.

Annals of Oncology 26: 1223–1229, 2015
doi:10.1093/annonc/mdv105
Published online 20 February 2015

Phase I trial of everolimus in combination with thoracic radiotherapy in non-small-cell lung cancer

E. Deutsch[1,2,3,4]*, C. Le Péchoux[1,5], L. Faivre[6], S. Rivera[1,2], Y. Tao[1,2], J.-P. Pignon[6], M. Angokai[6], R. Bahleda[2], D. Deandreis[7], E. Angevin[2], C. Hennequin[8], B. Besse[5,9], A. Levy[1,2,4,5] & J.-C. Soria[2,3,5]

[1]Department of Radiation Oncology; [2]Drug Development Department (DITEP), Gustave Roussy, Paris-Sud University, Villejuif; [3]Paris-Sud University, Kremlin-Bicêtre Medical University, DHU TORINO, SIRIC SOCRATES, LABEX LERMIT; [4]INSERM 1030 Molecular Radiotherapy, Cancer research institute, Villejuif; [5]Institut d'Oncologie Thoracique (IOT); Departments of [6]Biostatistics; [7]Nuclear Medicine, Gustave Roussy, Villejuif; [8]Department of Radiation Oncology, Saint Louis Hospital, Paris; [9]Department of Medicine, Gustave Roussy, Villejuif, France

Received 6 December 2014; revised 4 February 2015; accepted 12 February 2015

Background: This phase I study evaluated the safety and efficacy of the oral mTOR inhibitor everolimus in combination with thoracic radiotherapy followed by consolidation chemotherapy in locally advanced or oligometastatic untreated non-small-cell lung cancer (NSCLC).

Patients and methods: Everolimus dose was escalated in incremental steps [sequential cohorts of three patients until the occurrence of dose-limiting toxicity (DLT)] and administered orally weekly (weekly group: dose of 10, 20 or 50 mg) or daily (daily group: 2.5, 5 or 10 mg), 1 week before, and during radiotherapy until 3.5 weeks after the end of radiotherapy. Two cycles of chemotherapy (cisplatin–navelbine) were administrated 4.5 weeks after the end of radiotherapy.

Results: Twenty-six patients were included in two centers, 56% had adenocarcinoma and 84% had stage III disease. In the weekly group (12 assessable patients), everolimus could be administered safely up to the maximum planned weekly dose of 50 mg; however, one patient experienced a DLT of interstitial pneumonitis at the weekly dose level of 20 mg. In the daily group (9 assessable patients): one DLT of interstitial pneumonitis with a fatal outcome was observed at the daily dose level of 2.5 mg; two other DLTs (one grade 3 esophagitis and one bilateral interstitial pneumonitis) were found at the daily dose level of 5 mg. Overall there were five patients with G3–4 interstitial pneumonitis related to treatment. Among 22 assessable patients for response, there were 9 (41%) partial response and 7 (32%) stable disease. At a median follow-up of 29 months, the 2-year overall survival and progression-free survival actuarial rates were 31% and 12%, respectively.

Conclusion: In previously untreated and unselected NSCLC patients, the recommended phase II dose of everolimus in combination with thoracic radiotherapy is 50 mg/week. Pulmonary toxicity is of concern and should be carefully monitored to establish the potential role of mTOR inhibitor with concomitant radiotherapy.

EudraCT N: 2007-001698-27.

Key words: everolimus, thoracic radiotherapy, concomitant combination, non-small-cell lung cancer, phase I

introduction

Chemoradiotherapy is the treatment of choice for locally advanced unresectable non-small-cell lung cancer (NSCLC) but the optimal chemotherapy regimen to use with concurrent thoracic radiotherapy is unknown [1–3] Also, as the prognosis of

*Correspondence to: Prof. Eric Deutsch, Department of Radiation Oncology, Gustave Roussy, 114 rue E. Vaillant, 94850 Villejuif, France. Tel: +33-1-42-11-65-73; Fax: +33-1-42-11-52-53; E-mail: eric.deutsch@gustaveroussy.fr

© The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of the European Society for Medical Oncology.
All rights reserved. For permissions, please email: journals.permissions@oup.com.

Downloaded from http://annonc.oxfordjournals.org/ at Inserm/Disc on October 12, 2016

locally advanced NSCLC remains dismal, new effective treatments that can be given safely with radiotherapy are required. In the recent years, an improved understanding of the molecular pathways that drive malignancy in NSCLC has led to the development of agents that target specific molecular pathways. Many NSCLC have molecular abnormalities such as KRAS mutation and/or mutation and/overexpression of epidermal growth factor receptor (EGFR). Such conditions induce the activation of downstream signaling pathways, including phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K)/AKT pathway that is one of the essential pathways of tumor radioresistance [4], while less frequent and more recently described alterations such as PI3KCA, anaplastic lymphoma kinase, MET and ERBB2 also signal, at least partly through the AKT/mTOR pathway [5].

It is established that irradiation activates the PI3K/AKT pathway and that inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR), a main downstream effector of AKT, induces radiosensitization in models of human carcinomas. Furthermore, the inhibition of mTOR also leads to greater sensitivity to irradiation of endothelial cells [6, 7]. These data suggest that the inhibition of mTOR may have the ability to radiosensitize human tumors, including NSCLC [8, 9], both by a direct effect on tumor cells and also an antiangiogenic effect. Everolimus (RAD001) is an oral mTOR inhibitor that has been validated in several malignancies such as breast cancer and renal cell carcinoma [10, 11] and has shown contrasting results in NSCLC patients [12]. In a phase I trial in patients with advanced solid tumors, everolimus was delivered in weekly or daily schedules with equivalent activity [13]. In this phase I trial, we assessed the safety of the combination of everolimus and conformal thoracic radiotherapy followed by chemotherapy in locally advanced or oligometastatic NSCLC.

patients and methods

patients

Patients (≥18 years) were eligible for inclusion if they had histologically confirmed unresectable non-pretreated stage III NSCLC. Stage IV NSCLC patients with symptomatic primary tumors requiring radiotherapy and with limited extrathoracic lesions ($n < 3$) were eligible after an amendment. These patients did not present with widespread metastasis and responded to the definition of the oligometastatic status [14]. Additional inclusion criteria were: measurable lesion according to Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST version 1.0); Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status (ECOG PS) 0 or 1 at trial entry; adequate hematologic, hepatic, and renal function. Exclusion criteria included: prior treatment with an mTOR inhibitor or radiotherapy; for stage IV NSCLC: diffuse and/or non-locally symptomatic (cough, dyspnea or pain) or with extrathoracic lesions requiring a systemic treatment; venous thromboembolism within the past 6 months; pulmonary fibrosis; concurrent treatment with CYP3A4 modulators, agents otherwise used in the treatment of cancer, immunosuppressant, corticoids for more than 6 months, or oral anticoagulants; severe coexisting or uncontrolled condition; impaired digestive function that could alter the absorption of the experimental molecule.

study design and treatments

This phase I study was a bi-centric, open-label, dose-escalation trial using a 3 + 3 design to evaluate the safety and tolerability of everolimus and combination with concurrent radiotherapy followed by chemotherapy in unresectable non-pretreated stage III/IV NSCLC. Everolimus was orally administered for 11 weeks: starting 1 week before and during radiotherapy (66 Gy in 6.5 weeks, 2 Gy/day, 5 fractions/week), until 3.5 weeks after the end of radiotherapy. Initial doses administered in two sequential groups of patients: 10 mg once a week in the weekly group or 2.5 mg per day in the daily group. The dose was escalated in incremental steps (20 and 50 mg in the weekly cohort and 5 and 10 mg in the daily cohort) in sequential cohorts of three patients until the occurrence of dose-limiting toxicity (DLT). If any of these toxicities occurred, the treatment cohort was expanded to three patients. If no further DLT was observed in this expanded cohort, the dose escalation was continued in incremental steps until ≥1 DLT occurred. Dose escalations were stopped after two or more of the six treated patients experienced a DLT. All dose escalations were started after all patients in the previous dose cohort completed treatment and all reported adverse events (AEs) were analyzed. Patients had to be replaced if they were not fully accessible for these assessments. Patients who achieved stable disease (SD) or a tumor response were eligible to receive two cycles of chemotherapy (cisplatin 100 mg/m^2 D1, navelbine 25 mg/m^2 D1, D8, every 21 days), administrated 4.5 weeks after the end of radiotherapy. Prophylactic premedication with Granulocyte colony stimulating factors was not permitted. The study was approved by the relevant ethics committee/institutional review board and was conducted in compliance with the Declaration of Helsinki as well as good clinical practice guidelines. Written informed consent was obtained from all patients before trial initiation.

objectives and outcome measures

The primary objectives were to assess the safety and tolerability of everolimus given concurrently with radiotherapy and to identify DLTs and the maximum tolerated dose (MTD) of everolimus. The secondary objectives were to collect antitumor activity data from the combination.

DLT was assessed during treatment until the end of week 11 according to National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI-CTCAE) version 3.0, and was defined as any of the following AEs: grade 4 neutropenia for ≥5 days or associated with a temperature ≥38.5°C requiring an hospitalization; grade 4 thrombocytopenia or grade 3 for more than 4 days; grade ≥4 nausea and emesis despite optimal antiemetic treatment; persistent grade 3 (15 days) or 4 (8 days) skin toxicity within the radiotherapy field; other toxicity requiring an interruption of everolimus and/or radiotherapy lasting more than 2 weeks; others persistent grade 3–4 toxic effects despite an adequate management lasting more than 15 and 8 days, respectively. Any relationship between reported AEs and the experimental treatments has been assessed by the investigator. If a reasonable alternative explanation for the occurrence of toxicity during treatment was not available, the observed AE had to be considered as related to the study drug. The MTD was defined as the highest dose at which less than two out of six patients experienced a DLT.

Antitumor activity was determined after completion of everolimus (week 12) and chemotherapy (week 21) based on computed tomography (CT) according to RECIST version 1.0. Overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) were estimated using the Kaplan–Meier method. Survival rates were defined as the time between the beginning inclusion and the first event. Statistical analyses were carried out using SPSS software, version 19 (IBM SPSS, Inc., Jersey City, NJ). All reported P values are two-sided, and P-values <0.05 were considered significant.

results

patient baseline characteristics and exposure to treatments

Twenty-six patients were enrolled between February 2008 and March 2012 in two centers: 58% (15/26) in the weekly group

Downloaded from http://annonc.oxfordjournals.org/ at Inserm/Disc on October 12, 2016

and 42% (11/26) in the daily group. Patients from both sites were enrolled to both groups. One patient from the weekly group was excluded from the study because he did not fulfill the inclusion criteria. He did not receive everolimus and was not included in the analyses. Then, 25 patients received everolimus. One patient was included despite a protocol deviation (mediastinal lymph node recurrence after surgery and adjuvant chemotherapy delivered one year before). Patient baseline demographics and disease characteristics are shown in Table 1. Sixty percent of the patients (15/25) were men and the median age was 59 years (range, 43–75). Most patients had an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) PS of 0 (88%, 22/25), adenocarcinoma (56%, 14/25) and stage III disease (84%, 21/25) at the trial entry. There were 16% (4/25) oligometastatic stage IV patients.

Overall, 48% (12/25) of the patients (weekly group: 64%, 9/14 and daily group: 27%, 3/11) received the initially planned dose of everolimus. Twenty-two out of 25 (88%) patients (weekly group: 93% [13/14] and daily group: 82% [9/11]) received >70% and 12% (3/25) patients (weekly group: 7%, 1/14 and daily group: 18%, 2/11) received <50% of the initially planned dose of everolimus. Six patients out of 25 (24%) had early discontinuation of everolimus due to toxicity and three (12%) to other reasons: stopped by patient, error of the physician, discovery of metastasis at the end of the first week of everolimus.

All patients have received 3D conformal radiotherapy (96% per-protocol) excepted one patient who had intensity-modulated radiation therapy (IMRT). Four patients were treated with gating (breath-hold technique). Among the 24 patients treated per protocol, 22 received >90% of the planned dose, and two patients (daily group) received <70% of the initially planned dose due to toxicity. Irradiation was delivered at a median total dose of 66 Gy (range, 28–66), in a median number of 33 fractions (range, 14–33), over a median duration of 47 days (range, 20–58) with a median planned tumor volume of 459 cm^3 (range, 67–887).

Twenty-two patients have subsequently received chemotherapy (15/22, 68% per-protocol) and 40% (6/15) received the initially planned dose.

DLTs, MTD and safety profile

Twenty-one patients (84%) were accessible for DLT. An overview of everolimus dose levels and DLTs observed in treated patients is provided in Table 2. Four patients were considered not accessible for the following reasons: error of dosage or schedule ($n = 2$), exclusion criteria (Stage IV NSCLC with metastases requiring a systemic treatment) discovered after 1 week of treatment and everolimus discontinuation>15 days due to unrelated toxicity (jugular thrombosis).

Both groups, weekly and daily, were run in parallel. After starting with an everolimus dose of 10 mg weekly ($n = 3$), the dose was increased to 20 mg weekly and a first DLT was

Table 1. Patients' baseline characteristics at inclusion

Characteristics	Weekly group $n = 14$ (%)	Daily group $n = 11$ (%)	Total $n = 25$ (%)
Age (years)[a]	55.5 (45–69)	62 (43–75)	59 (43–75)
Gender			
Male	6 (43)	9 (82)	15 (60)
Female	8 (57)	2 (18)	10 (40)
ECOG PS score			
0	12 (86)	10 (91)	22 (88)
1	2 (14)	1 (9)	3 (12)
Tobacco Status			
Never smoker	1 (7)	0	1 (4)
smoker	11 (79)	7 (64)	18 (72)
Current smoker	2 (14)	4 (36)	6 (24)
Histology of primary tumor			
Adenocarcinoma	8 (58)	6 (55)	14 (56)
Squamous cell carcinoma	3 (21)	3 (27)	6 (24)
Others	3 (21)	2 (18)	5 (20)
Stage of disease			
IIIA	6 (43)	4 (36)	10 (40)
IIIB	6 (43)	5 (45)	11 (44)
IV	2 (14)	2 (18)	4 (16)
Pulmonary function testing[a]			
FEV1 (liter)	2.3 (1–3.2)	2.7 (1.3–4.3)	2.3 (1.3–4.3)
VC (% theo.)	96 (79–132)	76 (65–107)	93 (65–132)
DLCO (% theo.)	75 (44–96)	88 (37–110)	77.5 (37–110)

[a]Median (range).

ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; *N*, number of patients; FEV1, Forced Expiratory Volume in one second; VC, vital capacity; DLCO, diffusing capacity for carbon monoxide; % theo, % of the theoretical value.

Downloaded from http://annonc.oxfordjournals.org/ at Inserm/Disc on October 12, 2016

observed at week 10 (W10) (grade 2 interstitial pneumonitis requiring a discontinuation of everolimus >15 days). The treated population of this dose level was subsequently expanded to six patients, but no further DLTs were observed in the weekly group at this dose level ($n = 6$) neither in the subsequent dose level (50 mg weekly, $n = 3$). The daily cohort was started at a dose of 2.5 mg per day and a DLT was observed at W6 (grade 2 interstitial pneumonitis requiring a discontinuation of everolimus >15 days) evolved to a fatal outcome (1 month after the interruption of treatment). The treated population of this dose level was subsequently expanded to six patients, no further DLTs were observed in the daily group at this dose level ($n = 6$) and the dose was subsequently increased to 5 mg daily. Two grade 3–4 DLTs were observed at this dose level: one patient experienced grade 3 interstitial pneumonitis at W11 and grade 4 dyspnea at W9, and one other experienced grade 3 esophagitis associated with grade 3 dysphagia at W5. As a result of these DLTs in two of five patients at an everolimus dose of 5 mg per day, further patient recruitment at this dose level was stopped, and 50 mg weekly was considered to be the MTD.

Table 2. Overview of everolimus dose levels and DLTs observed in treated patients

Dose (mg)	*N* treated	*N* evaluable for DLT	*N* DLT Overall	*N* DLT Grade 3-4
Weekly group				
10	4	3	0	0
20	7	6	1	0
50	3	3	0	0
Daily group				
2.5	6	6	1[a]	0
5	5	3	2	2
10	0	0	0	0
Total	25	21	4	2

[a]Toxic death.
DLT, dose-limiting toxicity; *n*, number of patients.

During the experimental combination period, a total of 280 AEs were observed in the 21 patients accessible for DLT (weekly group: 55%, 154/280 and daily group: 45%, 126/280) and 17 were grade 3–4 (11 in the weekly arm and 6 in the daily arm). Most frequent AEs (all grades) were: asthenia (86%), cough (81%), dyspnea (76%), thoracic pain (71%), dermatitis (67%), mucositis (57%), esophagitis (57%), anorexia (52%) and nausea/vomiting (43%) (Table 3). The most common G3-4 AEs were: esophagitis ($n = 2$), dermatitis ($n = 2$) and interstitial pneumonitis ($n = 2$) (Table 4). There was no clinically relevant G3–4 hematologic toxicity during the combination. There were 31 serious AEs (SAE) in eight patients (three in the weekly group

Table 3. Most common AEs (>10% of patients overall) observed during the combination of everolimus and radiotherapy (weeks 1–11)

AEs	Total			Related to everolimus-RT		
	Weekly, *n*	Daily, *n*	Total, *n* (%)	Weekly, *n*	Daily, *n*	Total, *n* (%)
Asthenia	10	8	18 (86)	4	7	11 (52)
Cough	10	7	17 (81)	4	4	8 (38)
Dyspnea	10	6	16 (76)	4	2	6 (29)
Thoracic pain	8	7	15 (71)	3	2	5 (24)
Dermatitis	9	5	14 (67)	9	5	14 (67)
Mucositis	7	5	12 (57)	7	5	12 (57)
Esophagitis	8	4	12 (57)	8	4	12 (57)
Anorexia	7	4	11 (52)	3	3	6 (29)
Nausea/vomiting	2	7	9 (43)	2	5	7 (33)
Dysphagia	3	6	9 (43)	2	5	7 (33)
Constipation	3	6	9 (43)	1	3	4 (19)
Weight Loss	4	4	8 (38)	2	1	3 (14)
Headache	4	4	8 (38)	0	0	0
Fever	3	4	7 (38)	1	2	3 (14)
Diarrhea	5	1	6 (29)	3	1	4 (19)
Myalgia	3	2	5 (24)	0	0	0
Interstitial pneumonitis	2	2	4 (19)	2	2	4 (19)
Xerostomia	2	2	4 (19)	2	1	3 (14)
Odynophagia	2	2	4 (19)	1	2	3 (14)
Xerosis	3	1	4 (19)	2	1	3 (14)
Dysphonia	3	1	4 (19)	0	0	0
Dysgeusia	2	1	3 (14)	1	1	2 (10)
Oral infection	2	1	3 (14)	1	1	2 (10)
Insomnia	1	2	3 (14)	0	0	0
Paresthesia	2	1	3 (14)	0	0	0

AEs, adverse events; N, number of patients; RT, radiotherapy.

Downloaded from http://annonc.oxfordjournals.org/ at Inserm/Disc on October 12, 2016

Table 4. Grade 3 or 4 AEs considered to be related to the combination of everolimus and radiotherapy (weeks 1 to 11)

G3-4 AEs	Total			Related to everolimus-RT		
	Weekly, *n*	Daily, *n*	Total, *n*	Weekly, *n*	Daily, *n*	Total, *n*
Interstitial pneumonitis	1	1	2	1	1	2
Cough	1	0	1	1	0	1
Thoracic pain	1	0	1	0	0	0
Pneumonia	0	1	1	0	0	0
Dyspnea	0	1	1	0	1	1
Dermatitis	2	0	2	2	0	2
Esophagitis	1	1	2	1	1	2
Dysphagia	0	1	1	0	1	1
Diarrhea	1	0	1	0	0	0
Asthenia	1	0	1	1	0	1
Fever	1	0	1	0	0	0
Weight loss	0	1	1	0	0	0
Venous thrombosis	1	0	1	0	0	0
Extra-thoracic pain	1	0	1	0	0	0
Total	11	6	17	6	4	10

AEs, adverse events; *n*, number of patients.

and five in the daily group). Among these 31 SAEs, there was one (4%) grade 4, 11 (35%) grade 3, 11 (35%) grade 2 and 8 (26%) grade 1. There was one toxic death (compare DLT in the daily group at a dose level of 2.5 mg).

During protocol chemotherapy, eight G3–4 toxicities related to everolimus radiotherapy were encountered in four patients: interstitial pneumonitis ($n = 3$), thoracic pain ($n = 2$), esophagitis ($n = 1$) and dyspnea ($n = 2$). Thirteen G3–4 late toxic effects were then observed in 10 patients: cardiovascular (pulmonary embolism: $n = 5$; pericardial effusion: $n = 1$), lung (post-radiation pneumonitis: $n = 3$; pneumonia: $n = 1$; dyspnea: $n = 1$) and digestive (digestive tract infection: $n = 1$, and abdominal pain: $n = 1$). Only interstitial pneumonitis was related to the experimental combination. Overall (all periods taken into account), there were five patients with G3–4 interstitial pneumonitis related to treatments (two in daily and three in weekly groups).

antitumor activity of everolimus and radiotherapy

All patients except one had tumor assessment at inclusion, among them, 22 (92%; including non-eligible patients for DLT) had tumor assessment. Best response (Figure 1) consisted of 9 (41%) partial response (PR; 7 in the weekly group and 2 in the daily group), 7 (32%) SD (3 in the weekly group and 4 in the daily group). There were 6 (27%) progressive disease (3 in the weekly group and 3 in the daily group) and no complete response was observed.

At a median follow-up of 32 months (range: 20–46), 7(28%) of 25 patients remain alive (72% death, all excepted one due to progression) and 20 (80%) had a progressive disease (locoregional: $n = 8$; distant: $n = 7$; both locoregional and distant: $n = 5$), resulting in a 2-year OS and PFS rates of 31% (95% CI 16–51; median: 21 months, 95% CI 6-NA), and 12% (95% CI 4–33; median: 8 months, 95% CI 4–11), respectively. There was no difference of outcome between the daily and the weekly groups and according to the stage (only four oligometastatic stage IV patients, supplementary Figure 1S, available at *Annals of Oncology* online).

discussion

This is the first phase I trial assessing everolimus in combination with thoracic radiotherapy for previously untreated NSCLC. We found that it could be safely administered with radiation only if given according to a weekly schedule at the dose of 50 mg/week.

Temsirolimus, another mTOR inhibitor delivered intravenously, had recently been tested in 10 NSCLC patients receiving palliative lung irradiation (35 Gy for a total of 14 days). In this report, there were three PR and two SD in the eight assessable patients (9 [41%] PR, and 7 [32%] SD in our series). The dose-limiting toxic effects included sudden death, pneumonitis and pulmonary hemorrhage [15]. Pneumonitis is a known side-effect of mTOR inhibitors, and it may occur in the absence of thoracic radiotherapy. In a meta-analysis of published series including both patients treated with temsirolimus or everolimus, incidence of all- and high-grades pulmonary toxicity was 10.4% and 2.4%, respectively [16]. According to studies where systematic radiological review of CT scans of patients under treatment was carried out, radiographic abnormalities may occur in about one-third of patients [17]. mTOR-related interstitial lung diseases are generally reversible but the evolution may be fatal. Thus combining everolimus with thoracic radiotherapy can be tricky, and the exact impact of this combination on lung toxicity needs to be further explored. On the other hand, in several phase I trials combining everolimus with non-thoracic irradiation in glioblastomas [18, 19] or head and neck tumors [20], no unexpected radio-enhanced toxicity was observed. Still, this was the case for one patient in our series that had previous background of severe emphysema, and the only toxic death reported. Since the start of our trial, strategies for monitoring and management of such toxic effects have been published for patients

Downloaded from http://annonc.oxfordjournals.org/ at Inserm/Disc on October 12, 2016

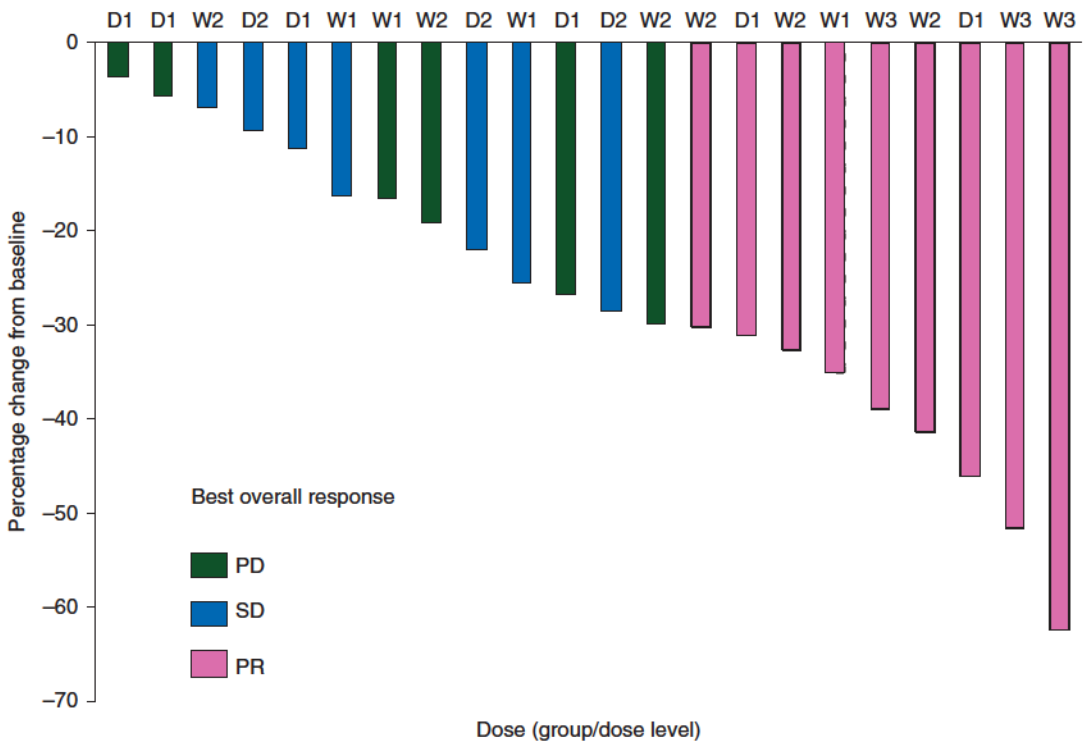


Figure 1. Best overall response per patients during the 21 weeks of treatments. D: daily group (dose levels 1, and 2 of 2.5, and 5 mg, respectively); W, weekly group (dose levels 1, 2, and 3 of 10, 20, and 50 mg, respectively); PD, progressive disease; SD, stable disease; PR, partial response.

who develop symptoms or radiographic changes while receiving everolimus based on the grade of pneumonitis [21].

The fact that ionizing radiation can induce pneumonitis and lung fibrosis underlines the difficulties to incriminate specifically everolimus or radiation therapy. In practice it is likely that the combination of ionizing radiation and everolimus may increase the toxicity profile within irradiated areas. So this combination may be difficult to use in patients with altered lung functions. Here, as patients included were non-pretreated stage III/IV NSCLC, a dose reduction of irradiation would have not been ethically defendable. The implementation of more modern radiotherapy techniques such as IMRT or respiratory gating could also allow decreasing pulmonary toxicity [22, 23]. However IMRT may be harmful to lung. In our series, constraints of normal lung irradiated where relatively tight (volume of normal lung minus the planned target volume [PTV] receiving at least 20 Gy (V20) < 30%), this has to be kept in mind for the conception of future trials since any loosening in radiotherapy constraints may be hazardous in terms of safety of the combination. A subsequent planned analysis will include the dosimetric parameter of the irradiated patients. Conversely, one might argue that the tolerance could be improved in patients systematically treated with smaller irradiated volumes provided that image guided radiotherapy is used.

The reason for the sequential administration of chemotherapy in our trial was the fact that a concomitant administration of both radiation therapy, everolimus and a platinum based regimen may have impacted the safety profile on the one hand and because there was no rationale supporting the fact that the triple combination acts synergistically.

Our results were still encouraging. In this population of locally advanced or oligometastatic NSCLC, 41% had a PR and 28% of patients remained alive more than two years after the experimental treatment despite having 4 patients with oligometastatic disease. The combination of targeted agents and radiotherapy for locally advanced NSCLC should benefit of future biomarker-driven trials [24, 25]. This was not the case (unselected population) in previous early clinical trials, and in the only negative phase III trial combining epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors to chemoradiotherapy for NSCLC [26]. A randomized phase II trial is currently assessing erlotinib or crizotinib in patients that exhibit 'sensitizing' mutations in EGFR (exon 19 deletion, L858) and/or EML4-anaplastic lymphoma kinase (ALK) fusion arrangement (RTOG [Radiation Therapy Oncology Group] 1306). Such predictive molecular markers are not yet incorporated in clinical practices for anti-mTOR therapies. The loss-of-function mutation in TSC1 (tuberous sclerosis complex 1), a regulator of the mTOR pathway activation, has been identified by whole-genome sequencing in a patient treated with everolimus that exerted a durable remission of metastatic bladder cancer [27]. Mutations in the H1047R PIK3 catalytic subunit alpha, of KRAS, or of TSC2 could also be predictive biomarkers in patients receiving mTOR inhibitors [28–30]. Other future therapeutic perspectives include the combination of radiotherapy with targeted immunotherapy [31].

In this phase I trial, the recommended phase II dosage of Everolimus is 50 mg/week in combination with thoracic radiotherapy administered with conventional fractionation at the dose of 66 Gy followed by chemotherapy in previously untreated stage III/IV NSCLC. Interstitial pneumonitis (a side-effect potentially related to radiotherapy as well as to everolimus) is the main

Downloaded from http://annonc.oxfordjournals.org/ at Inserm/Disc on October 12, 2016

challenge of this combination. Further investigation is needed to better assess the therapeutic ratio of this new combination in trials that take into account modern radiation-delivery techniques and incorporate the emerging biological information of tumors.

funding

This trial has been funded by Novartis (no grant number).

disclosure

The authors have declared no conflicts of interest.

references

1. Aupérin A, Le Péchoux C, Pignon JP et al. Meta-Analysis of Cisplatin/carboplatin based Concomitant Chemotherapy in non-small cell Lung Cancer (MAC3-LC) Group. Concomitant radio-chemotherapy based on platin compounds in patients with locally advanced non-small cell lung cancer (NSCLC):a meta-analysis of individual data from 1764 patients. Ann Oncol. 2006; 17: 473–483.
2. O'Rourke N, Roquél Figuls M, Farré Bernadó N et al. Concurrent chemoradiotherapy in non-small cell lung cancer. Cochrane Database Syst Rev. 2010; CD002140: 1–47.
3. Le Pechoux C, Burdett S, Auperin A. Individual patient data (IPD) meta-analyses (MA) of chemotherapy (CT) in locally advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). 1st European Lung Cancer Conference, Geneva, April 2008. J Thorax Oncol 2008; 3: S20.
4. Kim IA, Bae SS, Fernandes A et al. Selective inhibition of Ras, phosphoinositide 3 kinase, and Akt isoforms increases the radiosensitivity of human carcinoma cell lines. Cancer Res. 2005; 65: 7902–7910.
5. Cheng L, Alexander RE, Maclennan GT et al. Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine. Mod Pathol. 2012; 25: 347–369.
6. Prevo R, Deutsch E, Sampson O et al. Class I PI3 kinase inhibition by the pyridinylfuranopyrimidine inhibitor PI-103 enhances tumor radiosensitivity. Cancer Res. 2008; 68: 5915–5923.
7. Manegold PC, Paringer C, Kulka U et al. Antiangiogenic therapy with mammalian target of rapamycin inhibitor RAD001 (Everolimus) increases radiosensitivity in solid cancer. Clin Cancer Res. 2008; 14: 892–900.
8. Balsara BR, Pei J, Mitsuuchi Y et al. Frequent activation of AKT in non-small cell lung carcinomas and preneoplastic bronchial lesions. Carcinogenesis 2004; 25: 2053–2059.
9. Mauceri HJ, Sutton HG, Darga TE et al. Everolimus exhibits efficacy as a radiosensitizer in a model of non-small cell lung cancer. Oncol Rep. 2012; 27: 1625–1629.
10. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S et al.; RECORD-1 Study Group. Phase 3 trial of everolimus for metastatic renal cell carcinoma:final results and analysis of prognostic factors. Cancer 2010; 116: 4256–4265.
11. Baselga J, Campone M, Piccart M et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. N Engl J Med. 2012; 366: 520–529.
12. Soria JC, Shepherd FA, Douillard JY et al. Efficacy of everolimus (RAD001) in patients with advanced NSCLC previously treated with chemotherapy alone or with chemotherapy and EGFR inhibitors. Ann Oncol. 2009; 20: 1674–1681.
13. Tabernero J, Rojo F, Calvo E et al. Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus:a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. J Clin Oncol. 2008; 26: 1603–1610.
14. Weichselbaum RR, Hellman S. Oligometastases revisited. Nat Rev Clin Oncol. 2011; 8: 378–382.
15. Waqar SN, Robinson C, Bradley J et al. A phase I study of temsirolimus and thoracic radiation in non--small-cell lung cancer. Clin Lung Cancer 2014; 15: 119–123.
16. Iacovelli R, Palazzo A, Mezi S et al. Incidence and risk of pulmonary toxicity in patients treated with mTOR inhibitors for malignancy. A meta-analysis of published trials. Acta Oncol. 2012; 51: 873.
17. White DA, Schwartz LH, Dimitrijevic S et al. Characterization of pneumonitis in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with everolimus (RAD001). J Thorac Oncol. 2009; 4: 135.
18. Sarkaria JN, Galanis E, Wu W et al. North Central Cancer Treatment Group Phase I trial N057K of everolimus (RAD001) and temozolomide in combination with radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2011; 81: 468–475.
19. Chinnaiyan P, Won M, Wen PY et al. RTOG 0913:a phase 1 study of daily everolimus (RAD001) in combination with radiation therapy and temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2013; 86: 880–884.
20. Fury MG, Lee NY, Sherman E et al. A phase 1 study of everolimus + weekly cisplatin + intensity modulated radiation therapy in head-and-neck cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2013; 87: 479–486.
21. Eisen T, Sternberg CN, Robert C et al. Targeted therapies for renal cell carcinoma: review of adverse event management strategies. J Natl Cancer Inst. 2012; 104: 93–113.
22. Jiang ZQ, Yang K, Komaki R et al. Long-term clinical outcome of intensity-modulated radiotherapy for inoperable non-small cell lung cancer:the MD Anderson experience. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2012; 83: 332–339.
23. Giraud P, Morvan E, Claude L et al.; STIC Study Centers. Respiratory gating techniques for optimization of lung cancer radiotherapy. J Thorac Oncol. 2011; 6: 2058–2068.
24. Deutsch E, Soria JC, Armand JP. New concepts for phase I trials:evaluating new drugs combined with radiation therapy. Nat Clin Pract Oncol. 2005; 2: 456–465.
25. Levy A, Gomez-Roca C, Massard C et al. Clinical benefit for patients with non-small cell lung cancer enrolled in phase I trials. Onkologie 2013; 36: 357–362.
26. Bradley J, Masters GA, Hu C et al. An intergroup randomized phase III comparison of standard-dose (60 Gy) vs high-dose (74 Gy) chemoradiotherapy (CRT) +/− cetuximab (cetux) for stage III non-small cell lung cancer (NSCLC):results on cetux from RTOG 0617. Clin Adv Hematol Oncol. 2014; 12: 2–4.
27. Iyer G, Hanrahan AJ, Milowsky MI et al. Genome sequencing identifies a basis for everolimus sensitivity. Science 2012; 338: 221.
28. Janku F, Hong DS, Fu S et al. Assessing PIK3CA and PTEN in early-phase trials with PI3K/AKT/mTOR inhibitors. Cell Rep. 2014; 6: 377–387.
29. Di Nicolantonio F, Arena S, Tabernero J et al. Deregulation of the PI3K and KRAS signaling pathways in human cancer cells determines their response to everolimus. J Clin Invest. 2010; 120: 2858–2866.
30. Wagle N, Grabiner BC, Van Allen EM et al. Response and acquired resistance to everolimus in anaplastic thyroid cancer. N Engl J Med. 2014; 371: 1426–1433.
31. Levy A, Chargari C, Cheminant M et al. Radiation therapy and immunotherapy: implications for a combined cancer treatment. Crit Rev Oncol Hematol. 2013; 85: 278–287.

Downloaded from http://annonc.oxfordjournals.org/ at Inserm/Disc on October 12, 2016

- **“New challenge of developing combined radio-drug therapy”**

Review Article

New challenge of developing combined radio-drug therapy

Philippe Maingon[1], Anne-Sophie Govaerts[2], Sofia Rivera[3], Conchita Vens[4], Emad Shash[2], Vincent Grégoire[5]

[1]Radiotherapy Department, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France; [2]EORTC Headquarters, Brussels, Belgium; [3]Radiotherapy Department, Gustave Roussy, Paris, France; [4]Radiobiology Department, Netherlands Cancer Institute (NKI), Amsterdam, The Netherlands; [5]Radiation Oncology Department, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium

Correspondence to: Professor Philippe Maingon, MD. European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC)-Radiation Oncology Group (ROG), Radiotherapy Department-Centre Georges-François Leclerc, 1 Rue du Professeur Marion, 21000 Dijon, France.
Email: pmaingon@cgfl.fr.

Abstract: Combined modality treatment can be used to improve control of the local disease at the expense of increased toxicity. Several randomized trials have demonstrated that this combined modality therapy is better than radiotherapy alone or chemotherapy alone in the treatment of locally advanced diseases. Several new targets as well as potential new radio-sensitizers have been identified. To speed-up the process of developing new combined modality treatments, good preclinical models for optimization of the ratio between efficacy and toxicity and a well established methodology within a network of advanced high-tech laboratories and clinical departments devoted to early phase trials, are mandatory. The Synergy of Targeted Agents and Radiation Therapy (STAR) platform of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) is gathering these tools.

Keywords: Radiotherapy; chemo-radiation; early phase trials; radiobiology; targeted agents

Submitted May 13, 2014. Accepted for publication May 26, 2014.
doi: 10.3978/j.issn.2304-3865.2014.05.14
View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2304-3865.2014.05.14

Introduction

Radiation therapy (RT) is one of the three therapeutic pillars among cancer treatment regimens. Numerous approaches have been tested to improve the therapeutic ratio of RT, and these include increasing the dose delivered to the tumor, altered fractionation schemes, combined modality treatment with chemotherapy, and, more recently, novel targeted agents (1). This last approach is based on a mechanistic understanding suggesting that a combined approach with RT could enhance the killing of tumor cells through inhibition of DNA repair processes and the inhibition of tumor repopulation between RT fractions.

Combined modality treatment can be used to improve control of the local disease at the expense of increased toxicity. Several randomized trials have demonstrated that this combined modality therapy is better than RT alone or chemotherapy alone in the treatment of locally advanced cancer of the head and neck (HNC), lung, esophagus, and rectum, as well as high grade glioma. Following the introduction of 5-fluorouracil (5-FU) associated with RT in advanced HNC in the early 1980's, different combinations using classical cytotoxic agents have been studied (2).

The Radiation Oncology Group (ROG) of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC), formally known as the Radiotherapy Group, has conducted more than 80 clinical trials, three quarters of which have been randomized phase III trials. The ROG has played a major role in changing clinical practice having shown the impact on outcome of combined chemo-RT in the pre-operative treatment of locally advanced rectal cancer (3), of the combination of temozolomide and RT in glioblastoma (4), and of chemo-RT in the post-operative setting of HNC (5). It did so for locally advanced prostate carcinoma with the combination of hormonal and radiation therapies (6). Furthermore, this success story has been associated with a dramatic improvement in quality of life of patients receiving chemo-radiation for advanced laryngeal

© Chinese Clinical Oncology. All rights reserved.

carcinoma in voice preservation trials as well as for rectal and anal cancer in sphincter preservation trials (7-14).

Rationale

The first trial to use a monoclonal antibody (MoAb) was one in which patients with HNC were treated with cetuximab combined with RT. This phase III trial comparing RT alone to concomitant treatment with RT and cetuximab showed that the outcome of patients receiving RT in combination with this chimeric MoAb directed against the epidermal growth factor receptor (EGFR) is improved compared to patients who underwent RT alone (15). Furthermore, this molecule has been proven efficacious in locally advanced or metastatic HNC in combination with 5-FU and cisplatin (16). Preclinical and clinical studies have demonstrated the efficacy of cetuximab in combination with RT. However, increased skin toxicity, mainly acneiform rash, has been reported underlining the need for better early assessment of potential toxicity in various preclinical models. In a comparison between RT combined with platinum based chemotherapy versus RT with cetuximab, a significantly higher number of grade 3 oral mucositis and dermatitis were observed in the cetuximab containing arm; this must be outweighed by the higher risk of hematological toxicity by cisplatin based radio-chemotherapy. So far, these adverse events have been reported only for HNCs; in trials on thoracic or pelvic RT with cetuximab, increased rates of skin toxicity have not been observed. Unfortunately, following this preliminary experience, other antibodies combined with RT have shown neither an increased rate of local tumor control nor an increase in overall survival as compared to radio-chemotherapy. Panitumumab, a MoAb directed against EGFR, has a higher affinity and fewer hypersensitivity reactions due to its non-chimeric character, but it failed to demonstrate a significant therapeutic impact when combined with RT (17). Similar results have been obtained with nimotuzumab (18).

There are many factors that determine tumor cell sensitivity to radiation. Three important biological processes have been shown to affect tumor response and outcome after RT: hypoxia, the ability of the surviving cells to repopulate during the course of treatment, and the intrinsic radio-resistance of the tumor cells. In addition, micro-environmental host factors such as tumor infiltration of inflammatory cells and other bone marrow-derived cells (BMDCs) have been shown to play a role. A complementary approach associated with the development and the implementation of new technologies is to contribute to the reduction of normal tissue injury induced by ionizing radiation. This is especially important in dose escalation studies, when the aim is to increase the probability of tumor control. Both approaches, increasing tumor cell kill and decreasing morbidity, even in the context of combined modality treatment, can improve cure rates and quality of life of cancer patients undergoing RT.

It is obvious that the development of a combined modality strategy is of key importance for about half of the patients suffering from cancer, considering that local control of the primary tumor should first be obtained. RT is the main actor along with surgery for this goal. Therefore, the traditional research on RT focusing on improving technical delivery has to be associated with improvement in combined modality treatment to optimize the acute tolerance and late toxicity of associated treatments on normal tissues.

Combining novel targeted approaches with radiation therapy (RT)

Several processes have been identified as potential targets for radio-sensitization, and perhaps the most famous one is modulating DNA repair (19). Owing to genetic instability, tumors are often defective in one aspect of DNA repair, but usually have backup pathways for accomplishing repair. Attacking these backup pathways can render the tumor radio-sensitive while leaving the normal tissue relatively resistant. Since tumors are often defective in one of the cell cycle checkpoints (such as the G1/S checkpoint), the modulating of cell cycle checkpoints is another important potential approach. Inhibiting remaining checkpoints can leave tumors with less repair time, resulting in greater cell kill than in normal tissues. The PI3K-AKT, nuclear factor-κB (NF-κB), MAPK pathways and others can mediate radio-resistance and are often aberrantly activated in tumors. Attacking these pathways with specific inhibitors of signal transduction is a promising avenue for increasing the radio-sensitivity of tumors (20).

More recently, efforts have been made to better understand the role of the microenvironment: tumors often contain radio-resistant and chemo-resistant hypoxic cells. Several methods are available to attack or exploit tumor hypoxia, leading to tumor-specific effects. Tumor vasculature can also be attacked in ways that increase the response to ionizing radiation. Moreover, a variety of strategies for modulating normal tissue damage has shown promise in ameliorating ionizing radiation

© Chinese Clinical Oncology. All rights reserved.

damage to normal tissues. These include protection with radical scavengers, stimulating recovery with cytokines, modifying the p53 response, reducing the negative effects of inflammatory cascades and oxidative stress, and stem cell therapy.

Radio-sensitization

DNA damage response (DDR)

DNA damage induced by ionizing radiation triggers the DDR which comprises molecular events that mostly involve post-translational modification of proteins that activate intracellular signaling pathways. Repair of double strand breaks (DSBs) requires arrest of cell cycle progression to avoid further damage before commitment to S-phase or mitosis. Oncogene-driven DNA replication stress has been implicated as a cause of constitutive activation of DDR and tumor progression. Defects in both DNA repair and checkpoint responses in tumor cells affect the response to ionizing radiation and can be exploited for targeted radio-sensitization strategies. Inhibitors of important molecules in DSB repair, such as ataxia telangiectasia mutated protein (ATM) or DNA-dependent protein kinase (DNA-PK), have been shown to sensitize cancer cells and xenografted tumors to RT. New agents have been developed in recent years and tested in phases I, II, and III trials concomitantly with RT or chemo-RT to sensitize cancer cells and xenografted tumors to RT. One class of such drugs, the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors, has shown activity in conjunction with RT in several cancer cell lines (21). Clinical trials assessing the toxicity and potential benefit of combining RT with PARP inhibition are now ongoing.

Cell cycle checkpoints

Besides DNA repair, cell cycle checkpoints constitute another important component of DDR. Induction of DNA damage by ionizing radiation in normal cells halts their progression through the cell cycle and prevents further accumulation of damage and its serious consequences. In contrast, in cancer cells with an impaired G1 checkpoint, cell cycle progression will continue unabated, and therefore removing the G2 block will increase damage and its transmission to progeny (22). This will ultimately lead to the loss of clonogenicity, and this is the rationale of checkpoint inhibition strategies. ATM and downstream proteins such as the cell division cycle 25 (CDC25) phosphatase represent cell cycle checkpoints in response to ionizing radiation that would otherwise prevent the propagation of DNA damage. CDC25 phosphatase and ATM inhibitors have been used as single agents but have also been demonstrated to enhance cell kill in combination with DNA-damaging drugs and RT.

Signal transduction pathways: the EGFR-PI3K-AKT axis

The importance of PI3K-AKT as a survival pathway has led to the development of a multitude of blocking antibodies and small-molecule inhibitors. The most successful to date is the EGFR-specific antibody cetuximab, which in combination with RT significantly increased local-regional tumor control and overall survival in a phase III trial in HNC. Receptor tyrosine kinase inhibitors (TKIs) can also abrogate the EGFR signaling cascade, and this leads to increased radio-sensitivity. In some preclinical models, antibodies seem to be more effective at modifying the ionizing radiation response than TKIs. Four pathways demonstrate a clear role in the response and sensitivity to ionizing RT: PI3K-AKT, nuclear NF-κB, MAPK, and TGFβ. The activation of AKT by phosphorylation occurs through growth factor receptor pathways, e.g., receptor overexpression such as EGFR, loss of PTEN, oncogenic mutations in NRAS or KRAS, all of which have been shown to be associated with increased resistance to RT in tumor cell lines. EGFR-directed MoAbs and TKIs most likely increase radio-sensitivity by inhibiting DNA repair.

Histone deacetylase (HDAC) inhibitors

HDAC-I acts predominantly by inducing differentiation, apoptosis, and cell cycle arrest with a preferential cytotoxicity for tumor cells (apoptosis induction). HDAC-I induces cell death (via an unclear mechanism involving mitochondrial apoptosis, autophagy, regulation of reactive oxygen species, etc.) and cell cycle arrest mainly in G1 but also demonstrates anti-angiogenic, anti-invasive, and immune-modulatory activities (23). The exact mechanism by which HDAC inhibitor-induced radio-sensitization occurs is currently unclear, but may be, at least in part, due to the preventing the repair of damaged DNA. Thus, HDAC inhibitors appear to inhibit DNA double strand breaks (DSB) repair leading to enhanced tumor cell death. Radio-sensitization has also been explained by modulation of cell cycle regulation and down-regulation of surviving signals. One of the major advantages of HDAC inhibitors as radio-sensitizing agents for cancer therapy is the fact

© Chinese Clinical Oncology. All rights reserved.

that they are relatively specific for malignant cells and spare normal tissues. Several *in vitro* studies have demonstrated this finding of no increased radio-sensitivity in normal tissue cell lines when exposed to HDAC inhibitors, and some HDACs may actually play a role in protecting normal tissue from radiation-induced side effects (inhibition of TNF-α and TGF-β). Even though cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) is the only cancer for which HDAC inhibitors are currently FDA-approved, many clinical trials are assessing the efficacy and safety of other HDAC inhibitors when used alone or in combination therapies in both solid and hematologic malignancies. Clinical trials, in conjunction with new insights from basic scientific research, will help elucidate which treatment combinations and dosing regimens are optimal for various types of cancers in the context of varied patient characteristics and biomarker profiles.

Heat shock protein 90 (HSP90) inhibitors

Hsp90, a 90 kDa heat shock protein, is a highly expressed molecular chaperone that mediates maturation and activation of client proteins, and plays a critical role in establishing resistance to RT. Among Hsp90 clients are a number of proteins which contribute in a cell type-dependent manner to tumor cell radio-resistance. Exposure of a variety of solid tumor cell lines to clinically relevant Hsp90 inhibitors results in tumor growth suppression and increased induction of therapeutic cell death. Whereas an increase in radio-sensitivity of tumor cells was consistently reported, the radio-sensitivity of normal fibroblasts was not affected by Hsp90 inhibition. This suggests that there might be a potential for tumor-selective radio-sensitization. The molecular chaperone Hsp90 has been the focus of a number of investigations as a multi-target approach to radio-sensitization. The Hsp90 inhibitors evaluated to date enhance the *in vitro* radio-sensitivities of cell lines initiated from prostate and lung tumors (24,25).

Hypoxia/angiogenesis: modulating the microenvironment

Both, hypoxia and vascularization, can exert a considerable influence on the response to ionizing radiation, and both are rewarding processes to intervene for improving the response to therapy. Hypoxia leads to the activation of the hypoxia-inducible factor (HIF) and unfolded protein response (UPR) pathways, both of which determine survival under this stress. High expression of hypoxia-inducible genes is often associated with poor prognosis. More continuous exposure can lead to down-regulation of the DNA repair gene RAD51 and others as well as an increase sensitivity to crosslinking agents. A recent systematic review of published and unpublished data identified 4,805 patients with HNC undergoing curative intended primary RT alone. These data from 32 randomized clinical trials were analyzed with regard to the following endpoints: loco-regional control (32 trials), disease specific survival (30 trials), overall survival (29 trials), distant metastases (12 trials) and complications to RT (23 trials). Overall, hypoxic modification of RT in HNC resulted in a significantly increased therapeutic benefit (26).

The problem of hypoxia can be tackled in several ways. The first is to increase blood oxygen. Oxygen delivery can be increased by using drugs such as efaproxiral which reduce oxygen-hemoglobin binding. Using a different approach, Ogawa *et al*. (27) developed a radio-sensitizing treatment that directly oxygenated the tumor by intratumoral administration of hydrogen peroxide and sodium hyaluronate. Second, many oxygen-mimetic/electron-affinic drugs have been developed that specifically radio-sensitize hypoxic, but not normoxic cells. Several drugs underwent clinical testing, but only the 5-nitroimadazole nimorazole showed efficacy in phase III trials. A randomized phase III trial will test the added value of this drug to cisplatin combined with RT in an EORTC trial dedicated to locally advanced human papilloma virus (HPV) negative HNC. The third is by mimicking the redox systems of nitroimidazoles, and fourth, the chemistry of transition metal complexes has been exploited for use in radio-sensitization, the best example of which is cisplatin. Fifth, hypoxic cytotoxins have been developed that kill hypoxic cells with far greater efficiency than normoxic cells. This is an alternative to radio-sensitizing hypoxic cells, and modelling studies indicate that it is the more effective strategy to combine with RT. Tirapazamine is the archetypical drug, although it did not show efficacy in a recent phase III trial in combination with RT and cisplatin. But, we are well aware of the impact that compliance by the centers to the RT protocol can have on the results of a randomized phase III trial dedicated to locally advanced HNC (28). Poor compliance jeopardized the outcome and created a demonstrated bias in the final analysis of the trial.

Hypoxia-induced up-regulation of HIF1α leads to angiogenesis through the up-regulation of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) and other growth factors. In addition, vasculogenesis (vascular formation from circulating BMDCs) has been shown to be crucial

© Chinese Clinical Oncology. All rights reserved.

for the growth of tumors that recur after RT. VEGF is the key pro-angiogenic growth factor that is secreted by almost all solid tumors and acts through VEGFR1, VEGFR2 or VEGFR3 receptors on endothelial cells. Vasculogenesis also depends on hypoxia, which is more extensive in recurrent tumors and leads to up-regulation of cytokines which in turn recruit and activate the BMDCs necessary for vascularization. In preclinical models, inhibiting vasculogenesis by various interventions, both genetic and pharmacological, dramatically increases tumor responses after RT and was more effective than inhibiting angiogenesis. This represents a fairly new and promising way to increase the response to RT.

Apoptosis modulation

Modulation of apoptosis sensitivity, mainly linked to caspase activation, has emerged as a promising strategy to increase radiation-induced cell kill and improve clinical outcome. There are two major pathways for the activation of inducer caspases: the mitochondrial-dependent intrinsic pathway and the extrinsic pathway involving ligand-binding death receptors at the cell surface. Most apoptotic stimuli, including radiation and chemotherapy, depend on the intrinsic mitochondrial pathway in which induced permeability of the mitochondrial outer membrane permits the release of pro-apoptotic factors into the cytosol. The activation of the extrinsic pathway depends on ligand binding to cell surface death receptors, such as tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptors and CD95 which are members of the TNF receptor superfamily and activate inducer caspases at the death domain in their cytoplasmic tail (29). Interventional strategies that target apoptotic pathways can be distinguished as those that promote pro-apoptotic signaling and those that inhibit anti-apoptotic signaling. While of interest as a therapeutic modality in itself, TRAIL is also an excellent candidate for combination therapy, since TRAIL and radiation activate partially distinct apoptosis signaling pathways, and a molecular basis for synergy may lie in the up-regulation or sensitization of the TRAIL receptor complex by radiation.

Prerequisite for the development of novel combined radio-molecularly targeted agents

To speed-up the process of developing new combined modality treatments, good preclinical models for optimization of the ratio between efficacy and toxicity and a well established methodology gathering quality controls within a network of advanced high-tech laboratories and clinical departments devoted to early phase trials, as well as trained in implementing new imaging modalities including fluorodeoxyglucose (FDG)-positron emission tomography (PET) and new tracers, useful for monitoring or predicting response to RT, are indispensable (30). Even if it has been well demonstrated that FDG PET is useful to study the glucose metabolism of tumor cells, proliferation could be studied by fluorothymidine (FLT)-PET and hypoxia by fluoromisonidazole (F-miso) and fluoroazomycin arabinoside (FAZA) (31). Receptor-based imaging has also been introduced with tracers targeting EGFR, HER2 and the somatostatin receptor. Efficacy induced by RT combined with chemotherapeutics or targeted agents induce changes in a tumor's physiology, metabolism and proliferation which often precede volumetric changes. Therefore, reliable biomarkers and imaging modalities that could assess treatment response more rapidly or even predict tumor response to treatment at an early phase, would be very useful in identifying the responders and/or avoiding toxic therapies in non-responders. The currently available assays to detect the most prominent types of radiation induced cell death (apoptosis, necrosis, mitotic catastrophy, autophagy and senescence) *in vitro* and *in vivo*, have been described comprehensively by Verheij (32).

In the framework of the EORTC, a strategic initiative called Synergy of Targeted Agents and Radiation Therapy (STAR), offers industry and pharmaceutical companies an efficient and robust preclinical evaluation of the combination of new molecular targeted therapy and RT. The duration of phase I RT combination studies is perceived as a major challenge by the pharmaceutical industry (33), and there is a lack of acceptable endpoints for such RT studies and of defined regulatory pathways to consecutive approval. In order to convince the pharmaceutical industry of a dedicated drug development program, the EORTC ROG is providing a network of experienced radiotherapy departments, a radiation therapy quality assurance (RTQA) program dedicated to clinical trials, disease oriented group working parties, strong connections with the EORTC Imaging and Pathobiology Groups, and working in close connection with a headquarter platform. It could facilitate the rational selection of agents and provide a straightforward methodology for conducting early clinical trials. In the future, multi-study agreements between pharmaceutical companies with such academic and independent clinical trial groups should be favored so as to

© Chinese Clinical Oncology. All rights reserved.

incorporate pre-clinical research into agreements for drug development.

Acknowledgements

The authors thank John Bean for his assistance in editing this paper.
Disclosure: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Lawrence TS, Haffty BG, Harris JR. Milestones in the use of combined-modality radiation therapy and chemotherapy. J Clin Oncol 2014;32:1173-9.
2. Byfield JE, Sharp TR, Frankel SS, et al. Phase I and II trial of five-day infused 5-fluorouracil and radiation in advanced cancer of the head and neck. J Clin Oncol 1984;2:406-13.
3. Bosset JF, Collette L, Calais G, et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. N Engl J Med 2006;355:1114-23.
4. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med 2005;352:987-96.
5. Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, et al. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. N Engl J Med 2004;350:1945-52.
6. Bolla M, de Reijke TM, Van Tienhoven G, et al. Duration of androgen suppression in the treatment of prostate cancer. N Engl J Med 2009;360:2516-27.
7. Bottomley A, Tridello G, Coens C, et al. An international phase 3 trial in head and neck cancer: quality of life and symptom results: EORTC 24954 on behalf of the EORTC Head and Neck and the EORTC Radiation Oncology Group. Cancer 2014;120:390-8.
8. Lefebvre JL, Andry G, Chevalier D, et al. Laryngeal preservation with induction chemotherapy for hypopharyngeal squamous cell carcinoma: 10-year results of EORTC trial 24891. Ann Oncol 2012;23:2708-14.
9. Lefebvre JL, Rolland F, Tesselaar M, et al. Phase 3 randomized trial on larynx preservation comparing sequential vs alternating chemotherapy and radiotherapy. J Natl Cancer Inst 2009;101:142-52.
10. Lefebvre JL, Chevalier D, Luboinski B, et al. Larynx preservation in pyriform sinus cancer: preliminary results of a European Organization for Research and Treatment of Cancer phase III trial. EORTC Head and Neck Cancer Cooperative Group. J Natl Cancer Inst 1996;88:890-9.
11. Bosset JF, Calais G, Mineur L, et al. Fluorouracil-based adjuvant chemotherapy after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer: long-term results of the EORTC 22921 randomised study. Lancet Oncol 2014;15:184-90.
12. Bosset JF, Calais G, Mineur L, et al. Enhanced tumorocidal effect of chemotherapy with preoperative radiotherapy for rectal cancer: preliminary results--EORTC 22921. J Clin Oncol 2005;23:5620-7.
13. Bosset JF, Roelofsen F, Morgan DA, et al. Shortened irradiation scheme, continuous infusion of 5-fluorouracil and fractionation of mitomycin C in locally advanced anal carcinomas. Results of a phase II study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. Radiotherapy and Gastrointestinal Cooperative Groups. Eur J Cancer 2003;39:45-51.
14. Matzinger O, Roelofsen F, Mineur L, et al. Mitomycin C with continuous fluorouracil or with cisplatin in combination with radiotherapy for locally advanced anal cancer (European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase II study 22011-40014). Eur J Cancer 2009;45:2782-91.
15. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med 2006;354:567-78.
16. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. N Engl J Med 2008;359:1116-27.
17. Kruser TJ, Armstrong EA, Ghia AJ, et al. Augmentation of radiation response by panitumumab in models of upper aerodigestive tract cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2008;72:534-42.
18. Rodríguez MO, Rivero TC, del Castillo Bahi R, et al. Nimotuzumab plus radiotherapy for unresectable squamous-cell carcinoma of the head and neck. Cancer Biol Ther 2010;9:343-9.
19. Verheij M, Vens C, van Triest B. Novel therapeutics in combination with radiotherapy to improve cancer treatment: rationale, mechanisms of action and clinical perspective. Drug Resist Updat 2010;13:29-43.
20. Begg AC, Stewart FA, Vens C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. Nat Rev Cancer 2011;11:239-53.
21. Powell C, Mikropoulos C, Kaye SB, et al. Pre-clinical and clinical evaluation of PARP inhibitors as tumour-specific radiosensitisers. Cancer Treat Rev 2010;36:566-75.
22. Anastasov N, Höfig I, Vasconcellos IG, et al. Radiation resistance due to high expression of miR-21 and G2/

© Chinese Clinical Oncology. All rights reserved.

M checkpoint arrest in breast cancer cells. Radiat Oncol 2012;7:206.
23. Folkvord S, Ree AH, Furre T, et al. Radiosensitization by SAHA in experimental colorectal carcinoma models-in vivo effects and relevance of histone acetylation status. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2009;74:546-52.
24. Alcorn S, Walker AJ, Gandhi N, et al. Molecularly targeted agents as radiosensitizers in cancer therapy--focus on prostate cancer. Int J Mol Sci 2013;14:14800-32.
25. Laszlo A, Thotala D, Hallahan DE. Membrane phospholipids, EML4-ALK, and Hsp90 as novel targets in lung cancer treatment. Cancer J 2013;19:238-46.
26. Overgaard J. Hypoxic modification of radiotherapy in squamous cell carcinoma of the head and neck--a systematic review and meta-analysis. Radiother Oncol 2011;100:22-32.
27. Ogawa Y, Kubota K, Ue H, et al. Phase I study of a new radiosensitizer containing hydrogen peroxide and sodium hyaluronate for topical tumor injection: a new enzyme-targeting radiosensitization treatment, Kochi Oxydol-Radiation Therapy for Unresectable Carcinomas, Type II (KORTUC II). Int J Oncol 2009;34:609-18.
28. Peters LJ, O'Sullivan B, Giralt J, et al. Critical impact of radiotherapy protocol compliance and quality in the treatment of advanced head and neck cancer: results from TROG 02.02. J Clin Oncol 2010;28:2996-3001.
29. Zhao L, Lu X, Cao Y. MicroRNA and signal transduction pathways in tumor radiation response. Cell Signal 2013;25:1625-34.
30. Nimmagadda S, Ford EC, Wong JW, et al. Targeted molecular imaging in oncology: focus on radiation therapy. Semin Radiat Oncol 2008;18:136-48.
31. Servagi-Vernat S, Differding S, Hanin FX, et al. A prospective clinical study of 18 F-FAZA PET-CT hypoxia imaging in head and neck squamous cell carcinoma before and during radiation therapy. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2014. [Epub ahead of print].
32. Verheij M. Clinical biomarkers and imaging for radiotherapy-induced cell death. Cancer Metastasis Rev 2008;27:471-80.
33. Ataman OU, Sambrook SJ, Wilks C, et al. The clinical development of molecularly targeted agents in combination with radiation therapy: a pharmaceutical perspective. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2012;84:e447-54.

Cite this article as: Maingon P, Govaerts AS, Rivera S, Vens C, Shash E, Grégoire V. New challenge of developing combined radio-drug therapy. Chin Clin Oncol 2014;3(2):18. doi: 10.3978/j.issn.2304-3865.2014.05.14

© Chinese Clinical Oncology. All rights reserved.

- **“Cellules souches cancéreuses : nouvelle cible thérapeutique dans le traitement des cancers broncho-pulmonaires”**

Cancer/Radiothérapie 15 (2011) 355–364

Disponible en ligne sur ScienceDirect www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France EM|consulte www.em-consulte.com

Revue générale

Cellules souches cancéreuses : nouvelle cible thérapeutique dans le traitement des cancers bronchopulmonaires

Cancer stem cells: A new target for lung cancer treatment

S. Rivera[a,b,*], C. Rivera[a,c], Y. Loriot[a], C. Hennequin[b], M.-C. Vozenin[a], É. Deutsch[a]

[a] *Inserm 10–30 « radiosensibilité des tumeurs et tissus sains », institut de cancérologie Gustave-Roussy, 114, rue Édouard-Vaillant, 94805 Villejuif, France*
[b] *Service de cancérologie radiothérapie, hôpital Saint-Louis, AP–HP, 1, avenue Claude-Vellefaux, 75010 Paris, France*
[c] *Service de chirurgie thoracique, hôpital Haut-Lévêque, CHU de Bordeaux, avenue de Magellan, 33604 Pessac cedex, France*

INFO ARTICLE

Historique de l'article :
Reçu le 8 mars 2011
Reçu sous la forme révisée
21 mars 2011
Accepté le 31 mars 2011
Disponible sur Internet le 12 juin 2011

Mots clés :
Cellules souches
Cellules souches cancéreuses
Radiorésistance
Radiosensibilité
Carcinome bronchique
Modèles précliniques
Cible thérapeutique

RÉSUMÉ

Le cancer bronchopulmonaire reste le cancer le plus meurtrier. Une meilleure compréhension de la biologie et de la physiologie des tumeurs pulmonaires pourrait permettre de contrôler leur développement et/ou d'améliorer leur prise en charge thérapeutique. Le concept de cellule souche cancéreuse fait référence à une sous-population de cellules cancéreuses aussi appelées cellules initiatrices de tumeur ayant la capacité de régénérer une tumeur ad integrum. Des cellules présentant les caractéristiques des cellules souches cancéreuses ont été identifiées et isolées dans le cancer bronchopulmonaire. L'identification de marqueurs cellulaires et de voies de signalisation des cellules souches cancéreuses pulmonaires pourrait apporter des éléments nouveaux dans le traitement et le pronostic. Des données précliniques sur des cibles potentielles spécifiques des cellules souches cancéreuses émergent ces dernières années. Ces études préliminaires constituent les étapes essentielles du développement et de la mise au point de nouvelles thérapies dans le cancer bronchopulmonaire.

© 2011 Société française de radiothérapie oncologique (SFRO). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Keywords:
Stem cell
Cancer stem cell
Radioresistance
Radiosensitivity
Lung carcinoma
Preclinical models
Therapeutic target

ABSTRACT

Lung cancer remains the leading cause of cancer death. Understanding lung tumours physiopathology should provide opportunity to prevent tumour development or/and improve their therapeutic management. Cancer stem cell theory refers to a subpopulation of cancer cells also named tumour initiating cells that can drive cancer development. Cells presenting these characteristics have been identified and isolated from lung cancer. Exploring cell markers and signalling pathways specific to lung cancer stem cells may lead to progress in therapy and improve the prognosis of patients with lung cancer. Continuous efforts in developing in vitro and in vivo models may yield reliable tools to better understand cancer stem cell abilities and to test new therapeutic targets. Even if some data are in favour of a higher chemo and radioresistance of cancer stem cells this issue remains disputed. Preclinical data on putative cancer stem cell targets are emerging by now. These preliminary studies are critical for the next generation of lung cancer therapies.

© 2011 Société française de radiothérapie oncologique (SFRO). Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

De nombreuses thérapeutiques innovantes ont été développées ces dernières années dans le cancer bronchopulmonaire dont le pronostic reste très péjoratif, avec un taux de survie de l'ordre de 15 % à cinq ans tous stades confondus. Il existe une réelle et profonde modification de l'épidémiologie des cancers bronchiques

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : sorivera1999@yahoo.fr (S. Rivera).

1278-3218/$ – see front matter © 2011 Société française de radiothérapie oncologique (SFRO). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.
doi:10.1016/j.canrad.2011.03.003

en particulier chez la femme et les non-fumeurs qui sont devenus un nouveau problème de santé publique et un enjeu dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Le cancer bronchique pose le problème des récidives précoces à l'arrêt des traitements anticancéreux. Le concept de cellules souches cancéreuses capables de résister aux traitements cytotoxiques comme la chimiothérapie ou la radiothérapie pourrait contribuer à expliquer la récidive de ces tumeurs à l'arrêt des thérapeutiques [1]. Cibler ces cellules souches cancéreuses afin d'éradiquer la maladie pourrait être une stratégie innovante et constituer une perspective intéressante des thérapies ciblées. Cet article a pour objectif de faire un état des lieux des connaissances et des dernières avancées dans le domaine des cellules souches cancéreuses pulmonaires et de leurs implications cliniques en se basant sur les données précliniques disponibles obtenues grâce aux modèles de cellules souches cancéreuses que nous exposeront.

2. Cellules souches cancéreuses

Deux modèles principaux ont été décrits pour expliquer la prolifération tumorale : le modèle dit « d'évolution clonale », impliquant une composante stochastique, et le modèle des cellules souches cancéreuses, qui est basé sur une définition hiérarchique. Selon le modèle « d'évolution clonale », la tumeur provient d'une seule cellule originelle et la prolifération tumorale résulte de modifications génétiques acquises au sein du clone originel permettant une sélection séquentielle de cellules plus agressives [2]. Le modèle des cellules souches cancéreuses est basé sur le fait que la tumeur est constituée de cellules fonctionnellement hétérogènes et que seules les cellules souches cancéreuses ont la capacité de proliférer indéfiniment et de former de nouvelles tumeurs ad integrum, dans toute leur hétérogénéité phénotypique [1,3]. Ces modèles ne s'excluent pas mutuellement et peuvent tout à fait coexister [4]. Des données récentes soutiennent l'hypothèse des cellules souches cancéreuses, qui suggèrent qu'une sous-population relativement rare de cellules au sein de la tumeur aurait la capacité d'initier et de perpétuer la prolifération tumorale [5]. Les cellules souches cancéreuses ont été identifiées et isolées dans différentes tumeurs solides comme les carcinomes bronchopulmonaires [6–11]. Ces cellules peuvent être définies comme des cellules tumorales capables de donner naissance à tous les types cellulaires présents au sein d'une tumeur. Les cellules souches cancéreuses partagent de nombreuses caractéristiques des cellules souches embryonnaires et somatiques comme les capacités d'autorenouvellement et de différenciation multipotente [12,13]. L'auto-renouvellement est défini comme la capacité d'effectuer un nombre illimité de cycles cellulaires tout en maintenant un état indifférencié. Les cellules souches se caractérisent par leur capacité de renouvellement par mitose et de différenciation en un large spectre de sous-types cellulaires spécialisés. L'autorenouvellement, qui assure la tumorogenèse, et la différenciation, qui permet l'hétérogénéité cellulaire au sein de la tumeur, sont considérés comme les propriétés clés des cellules souches cancéreuses.

Les populations de cellules souches non tumorales sont regroupées en niches, définies comme des régions spécifiques régulant la participation de ces cellules au renouvellement tissulaire, à sa maintenance et à sa réparation [14]. Ces niches correspondent au microenvironnement qui interagit avec les cellules souches pour réguler leur autorenouvellement et leur différenciation. La dépendance des cellules souches vis-à-vis de leur niche limite leur expansion. Les cellules souches cancéreuses pourraient provenir de cellules souches non tumorales mutées capables d'échapper au contrôle de leur niche [15]. De plus en plus de données suggèrent un rôle important du microenvironnement de la tumeur et de l'hôte sur le statut souche lui-même [16]. La prolifération des cellules de ces niches pourrait être guidée par des altérations des cellules souches cancéreuses ou d'autres cellules de ces niches. Dans les deux cas, il existerait un autorenouvellement d'un pool de cellules souches cancéreuses capables de donner de manière aberrante des cellules cancéreuses différenciées qui constituent la masse tumorale [17]. Certaines altérations des cellules souches cancéreuses pourraient leur permettre d'agir sur d'autres niches cellulaires en émettant des signaux favorisant leur auto-renouvellement. Calabrese et al. ont montré que les niches vasculaires au sein des tumeurs cérébrales contribuent directement à la genèse de cellules souches cancéreuses et à la croissance tumorale [18]. Bien que certaines cellules souches soient périvasculaires, d'autres pourraient se trouver dans des zones hypoxiques et pourraient être régulées par les gradients d'oxygène tissulaire [19]. Les mécanismes sous-jacents restent peu connus mais l'oxygénation pourrait jouer un rôle direct sur la régulation des cellules souches via la modulation de HIF-1α (hypoxia-induced factor) et la voie de Wnt/ß-caténine [20]. Cette hypothèse selon laquelle les cellules souches cancéreuses pourraient dépendre de l'influence d'une niche microenvironnementale pourrait déboucher sur une nouvelle cible thérapeutique.

Certaines caractéristiques fondamentales sont nécessaires pour reconnaître une cellule souche cancéreuse. Le terme de cellule initiatrice de tumeur est souvent utilisé pour faire référence aux cellules souches cancéreuses. En effet, des transplantations en série de cellules souches cancéreuses sur des modèles animaux, restaurent en partie l'hétérogénéité phénotypique de la tumeur initiale [21]. Des xénogreffes sur souris immunodéficientes, suivies de transplantations en série sont actuellement considérées comme un critère essentiel dans la définition des cellules souches cancéreuses. Cette caractéristique prépondérante pourrait constituer un parallèle mécanistique avec la régénération de tissus ou organes à partir de cellules souches non tumorales. Les cellules souches cancéreuses peuvent être cultivées en condition non adhérentes sous forme de sphères [22]. La capacité d'autorenouvellement doit également être démontrée pour pouvoir parler de cellules souches cancéreuses.

Dans certains modèles in vitro il a été montré que les cellules souches cancéreuses sont hautement résistantes à la radiothérapie et à la chimiothérapie [23,24]. Cela pourrait expliquer un reliquat tumoral, correspondant à la notion de maladie résiduelle, à partir duquel pourrait se faire la récidive. Toutefois la radiorésistance des cellules souches cancéreuses reste très controversée. Les résultats expérimentaux contradictoires observés pourraient être liés aux difficultés d'isolement d'une sous-population de cellules souches cancéreuses au sein d'une tumeur (appelée *side population* en anglais ou SP) [25]. Les cellules souches cancéreuses pourraient être moins vulnérables du fait de propriétés intrinsèques de radio- et chimiorésistance [26]. Une des hypothèses est que les cellules souches cancéreuses seraient moins sensibles aux dommages de l'ADN induits par ces traitements [27,28]. Les cellules souches cancéreuses pourraient avoir des capacités de réparation accrues [29].

La fréquence des cellules souches cancéreuses semble très variable ce qui reflète la grande diversité biologique des tumeurs et les difficultés techniques importantes pour les étudier. Cette sous-population marginale (SP) a été identifiée en utilisant des techniques de tri cellulaire par cytométrie de flux basé sur l'élimination du Hoechst 33 342 [30]. Ce test repose sur un transporteur transmembranaire ABCG2 qui est un membre de la sous famille G des transporteurs « ATP *Binding Cassette* » (ABC). ABCG2 est l'une des protéines transmembranaires de résistance multidrogue (MDR) les plus importantes et le Hoechst 33 342 est l'un de ses substrats [31]. Ce transporteur est fortement exprimé dans la sous-population marginale contenant des cellules souches [32]. Les cellules souches cancéreuses sont capables d'autorenouvellement et peuvent donner des progéniteurs différenciés. Ces progéniteurs sont engagés dans une voie de différenciation qui génère progres-

sivement des cellules matures. Les cellules souches cancéreuses expriment des marqueurs de surface tissus-spécifiques comme le CD34 dans certaines leucémies ou le CD44 dans les cancers mammaires [6,33]. Aucun de ces marqueurs n'est spécifique des cellules souches : le CD34 est exprimé par les cellules endothéliales et hématologiques normales, le CD44 est exprimé par les cellules endothéliales et mésenchymateuses. Le CD133 a été observé sur un large spectre de cellules cancéreuses et en particulier dans les carcinomes bronchiques [11,34]. La fonction du CD133 demeure inconnue. Le CD133 pourrait avoir un rôle dans l'activation et le maintien des cellules souches et pourrait réguler les activités de contacts intercellulaires [35,36]. Le phénotype des cellules souches cancéreuses n'est pas nécessairement uniforme d'un sous type tumoral à l'autre ni même au sein d'un même sous type tumoral [37]. L'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) est impliquée dans le métabolisme d'une large variété d'aldéhydes endogènes et exogènes [38]. Une forte activité de l'aldéhyde déshydrogénase a été retrouvée dans les cellules souches et progénitrices de différentes lignées [39–41]. Cela suggère qu'une forte activité et/ou expression d'aldéhyde déshydrogénase pourrait servir de marqueur des cellules souches cancéreuses dans certains cancers, en particulier bronchiques [42].

3. Le concept de cellule souche cancéreuse est-il toujours discuté ?

Dans le modèle stochastique la transformation tumorale résulte de mutations survenant au hasard et de la sélection clonale qui en découle. Mais ce modèle n'est peut être pas suffisant pour expliquer toute la biologie de la cancérogénèse. Le vide conceptuel laissé par ce modèle pourrait être comblé par l'hypothèse des cellules souches cancéreuses particulièrement intéressante dans ce contexte. En effet, la carcinogénèse suppose l'acquisition et l'accumulation de mutations génétiques et de régulations épigénétiques qui peuvent prendre plusieurs années. Puisque l'épithélium pulmonaire se renouvelle relativement rapidement, il doit y avoir un type cellulaire, dont la durée de vie est plus longue, qui sert de réservoir conservant toutes ces mutations accumulées. Cela pourrait s'intégrer dans l'hypothèse des cellules souches cancéreuses et expliquer l'hétérogénéité des cellules cancéreuses et des évènements métastatiques. Cette théorie pourrait apporter des bases fondamentales pour la compréhension des mécanismes de résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie ainsi que des mécanismes de formation et de progression tumorale. Cela pourrait avoir d'importantes implications cliniques dans la prévention, le dépistage et le traitement des cancers [3]. Toutefois des controverses persistent [43–45]. La croissance tumorale n'est peut être pas commandée par de rares cellules souches cancéreuses. La théorie des cellules souches cancéreuses n'est pas nécessairement un prérequis pour expliquer la résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie de certaines tumeurs. Ces résistances peuvent être en rapport avec des phénotypes de MDR [46]. Une certaine flexibilité métabolique peut générer des changements adaptatifs dans les cellules tumorales résiduelles pouvant conduire à la croissance tumorale et à la récidive [47]. La progression tumorale et la récidive pourraient s'expliquer par un état de dormance des cellules cancéreuses [48]. Les cellules souches cancéreuses ne sont peut être pas une entité réelle. La théorie des cellules souches cancéreuses pourrait être la simple transposition au cancer du modèle des cellules souches dans le développement des tissus normaux. Bien que l'hypothèse des cellules souches nécessite encore d'être validée dans les carcinomes bronchiques, son applicabilité apporterait une amélioration de notre compréhension des mécanismes de cancérogénèse.

4. Cancers bronchiques

Avec un taux de survie à cinq ans tous stades confondus d'environ 15 %, le cancer du poumon est l'un des cancers les plus meurtriers. Ce pronostic défavorable est lié à une dissémination extrathoracique et à des récidives fréquentes. Les principaux types de cancers bronchiques sont les cancers bronchiques à petites cellules et les cancers bronchiques non à petites cellules, qui comprennent trois types histologiques majoritaires : l'adénocarcinome, le carcinome épidermoïde et les carcinomes à grandes cellules [49]. Environ 15 % des cancers bronchiques sont des cancers bronchiques à petites cellules qui prennent naissance dans les voies aériennes proximales, ont une croissance rapide et comportent une composante neuroendocrine. Les adénocarcinomes représentent environ 40 % des cancers bronchiques non à petites cellules et prennent le plus souvent naissance dans le parenchyme pulmonaire distal. Les carcinomes épidermoïdes constituent environ 25 % des cancers bronchiques non à petites cellules et débutent généralement à proximité d'une bronche proximale. Les carcinomes à grandes cellules semblent provenir de cellules neuroendocrines et peuvent être observés en association à d'autres types histologiques de cancers bronchiques non à petites cellules. Ces tumeurs bronchiques neuroendocrines sont des tumeurs épithéliales caractérisées par leur différenciation neuroendocrine préférentielle comme en témoignent les granulations neuroendocrines, la présence de mucine et de tonofilaments ainsi que la positivité aux marqueurs neuroendocrines (chromogranine, synaptophysine, CD56) [50].

Le tabac serait à l'origine de 90 % des cancers bronchiques. Toutefois, différentes modifications génétiques ont été décrites dans les cancers bronchiques comme des anomalies chromosomiques récurrentes [51], une augmentation de l'activité des télomérases [52] et des mutations d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeur (TP53, RB1, CDKN2A, KRAS, récepteurs de l'*epidermal growth factor* [EGFR]). Certains pourraient être des marqueurs pronostiques, d'autres pourraient avoir un rôle direct dans la cancérogenèse bronchique dans un contexte d'interaction gène-environnement [53]. Le lien entre ces mutations et le caractère souche des cellules cancéreuses est un aspect important à étudier. Les données actuelles sont insuffisantes pour déterminer si les mutations conduisant aux cellules souches cancéreuses ont lieu dans des cellules souches normales ou dans des cellules différenciées pulmonaires saines. Ces données laissent à penser qu'une connaissance approfondie de chaque type tumoral pourrait conduire au développement de traitements personnalisés.

5. Cellules souches pulmonaires normales ou non tumorales

Le système respiratoire dérive de l'endoblaste du tube digestif primitif antérieur et suit un développement arborescent de tubules épithéliaux et de structures vasculaires qui conduit à la formation des voies aériennes et des alvéoles matures. Une séquence précise de divisions dichotomiques à partir du bourgeon bronchique qui provient d'une évagination à la face ventrale du tube digestif primitif antérieur abouti à la formation d'un réseau tubulaire ramifié. Ce processus pourrait être dirigé par un programme stéréotypé hiérarchisé d'embranchements successifs dont le contrôle moléculaire reste à l'étude [54,55]. Le développement du parenchyme pulmonaire est fortement influencé par des signaux provenant de l'épithélium et de la plèvre qui permettent un équilibre entre la différenciation et la prolifération des progéniteurs multipotents au cours de la croissance pulmonaire [56]. Durant la morphogénèse de l'arbre bronchique, le facteur de transcription *Sox2* est associé à l'épithélium moins morphologiquement actif. Il existe une perte

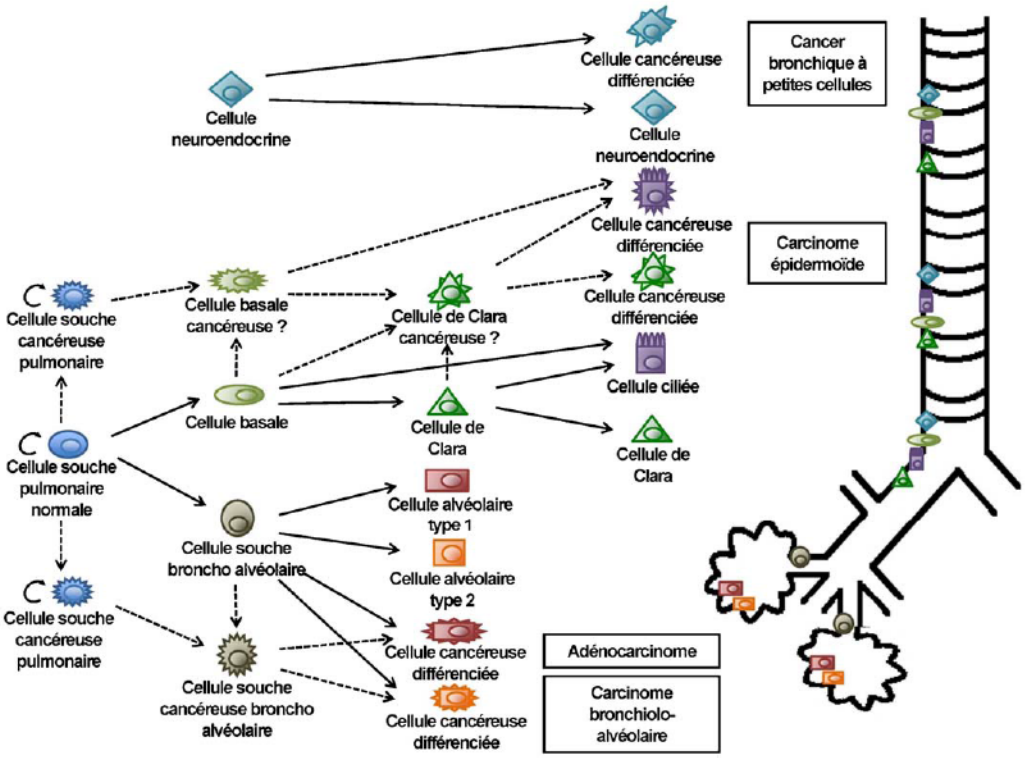


Fig. 1. Cellules souches cancéreuses pulmonaires et cellules progénitrices malignes dont la différenciation aboutit à l'hétérogénéité du cancer bronchopulmonaire. Les hiérarchies cellulaires normale et tumorale génèrent progressivement des cellules progénitrices puis des cellules différenciées matures aussi bien au niveau des voies aériennes distales que proximales. Les hypothèses proposées sont indiquées en pointillés.

d'expression de *Sox2* dans les zones d'émergence des bourgeons bronchiques [57,58]. Puisque les cellules épithéliales de l'arbre bronchique continuent de se différencier, il est indispensable de maintenir et d'accroître un pool de cellules progénitrices, non engagées dans une voie de différenciation, capables d'assurer la croissance continue et le renouvellement de l'arbre bronchique (Fig. 1). Ce pool de cellules pourrait se trouver en zone distale et serait constitué d'une population de cellules épithéliales immatures proliférantes exprimant fortement le protooncogène *Mycn* [59].

L'épithélium respiratoire mature est constitué de nombreux types cellulaires. Les cellules ciliées, neuroendocrines et sécrétrices sont situées dans la partie proximale de l'arbre respiratoire. Les cellules alvéolaires de type 1 (AT1) et 2 (AT2) se trouvent à la partie distale de l'arbre bronchique, en zone alvéolaire (Fig. 1). Les analyses de lignage cellulaire suggèrent que l'origine des cellules formant la trachée et la partie proximale de l'arbre est différente de celle des cellules de la partie distale [60]. Pendant le développement bronchique, l'activité des pools de cellules progénitrices serait régiospécifique et donc différente entre les parties proximales et distales ce qui expliquerait les compositions cellulaires différentes et spécifiques des parties trachéo-bronchique et bronchioloalvéolaire de l'arbre respiratoire [61]. Les cellules basales pourraient être les progéniteurs multipotents de l'arbre bronchique. Elles ont la capacité de restaurer un épithélium bronchique différencié complet [62,63]. Les cellules souches cancéreuses bronchiques pourraient partager des voies de développement communes avec les cellules souches pulmonaires normales.

6. Cellules souches cancéreuses pulmonaires

Les altérations épithéliales des voies aériennes retrouvées dans des pathologies pulmonaires aigues ou chroniques peuvent augmenter significativement le risque de développer un cancer bronchique [64,65]. La contribution des cellules souches des voies aériennes dans le renouvellement et l'entretien de l'épithélium normal n'est pas connue [66]. Les cellules de Clara participent à l'entretien des cellules sécrétrices et des cellules ciliées lors de dommages oxydatifs [67]. Cependant, une population de cellules souches résistantes aux agents polluants localisée à la jonction entre les bronchioles et les alvéoles contribuent à la restauration d'un épithélium phénotypiquement hétérogène après déplétion en cellules de Clara [68]. Ces cellules sont nommées cellules souches broncho-alvéolaires (Fig. 1). Les cellules neuroendocrines pulmonaires ainsi que les cellules de Clara ont été évoquées comme potentiellement progénitrices et impliquées dans la genèse des cancers bronchiques à petites cellules et des cancers bronchiques non à petites cellules [69]. Les cellules neuroendocrines pulmonaires sont des cellules épithéliales des voies respiratoires spécialisées capables de produire des neuropeptides. Elles sont regroupées entre elles pour former des corps neuroépithéliaux (ou *neuroepithelial bodies*: NEB). La réparation des dommages des voies respiratoires est associée à une hyperplasie des cellules neuroendocrines pulmonaires [70]. Des cellules présentant des caractéristiques proches de celles des cellules de Clara avec une expression réduite de protéines secrétrices ont été identifiées comme étant associées à des lésions prénéoplasiques [71]. Cela suggère que des cellules engagées dans des voies de différenciation pourraient réactiver des gènes d'immaturité. Dans ce contexte, les cellules souches cancéreuses pourraient provenir d'une population restreinte de progéniteurs ou de cellules plus différenciées ayant réactivé leur capacité d'autorenouvellement [5]. Cette hypothèse pourrait avoir un impact direct sur le concept de plasticité des cellules souches qui est défini comme leur capacité à franchir la barrière de lignage et à adopter un phénotype de cellule différenciée [72]. Cela soulève également la question d'une possible trans-différenciation de cellules différenciées en cellules souches cancéreuses expliquant la diversité phénotypique des cellules cancéreuses [73].

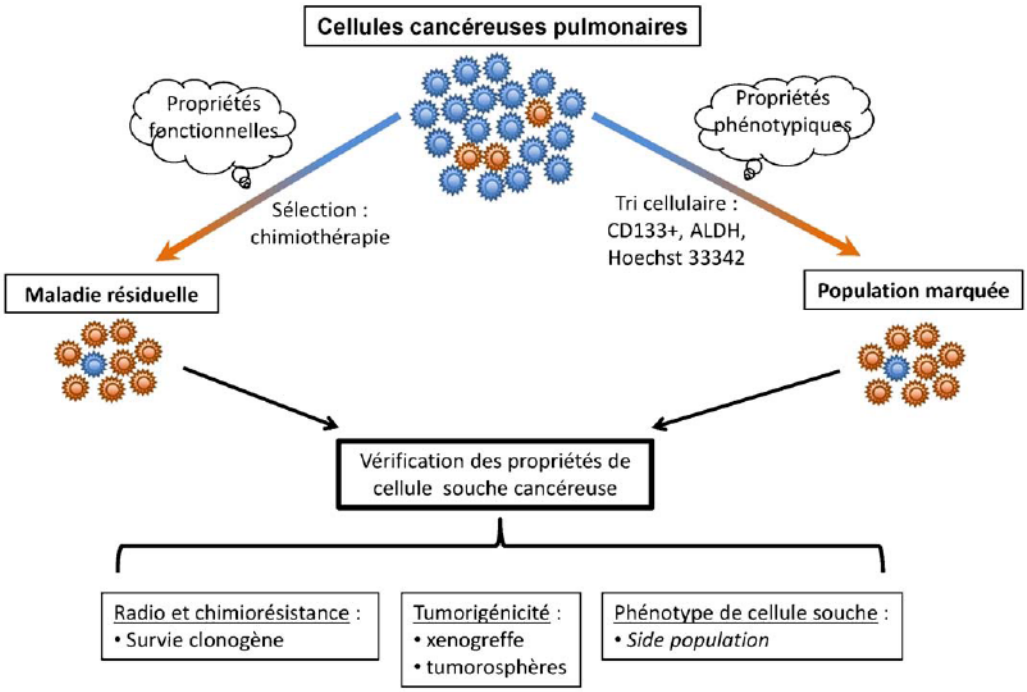


Fig. 2. Modèles in vitro de cellules souches cancéreuses pulmonaires. Les modèles expérimentaux de cellules souches cancéreuses pulmonaires s'appuient soit sur leurs propriétés fonctionnelles de chimiorésistance, soit sur leurs caractéristiques phénotypiques. Les populations cellulaires enrichies en cellules souches cancéreuses obtenues après traitement par chimiothérapie au tri cellulaire en cytométrie de flux doivent vérifier toutes les propriétés de cellules souches pour être considérées comme modèles de cellules souches cancéreuses pulmonaires.

Les cellules souches broncho-alvéolaires situées à la jonction bronchioloalvéolaire des voies respiratoires de l'adulte pourraient être des cellules initiatrices d'adénocarcinome pulmonaire [74]. Les cellules souches et les progéniteurs pourraient être considérés comme des candidats idéaux initiateurs de tumeur car la dérégulation des capacités prolifératives par mutation pourrait rapidement provoquer une croissance dysplasique proche de celle des tumeurs. L'origine commune endoblastique des cellules souches pourrait être responsable de la différenciation multidirectionnelle des tumeurs bronchiques, incluant le phénotype neuroendocrine des cancers bronchiques non à petites cellules ainsi que les stigmates épidermoïdes ou glandulaires de différenciation des authentiques tumeurs neuroendocrines [75].

L'hétérogénéité phénotypique observée entre les différents types tumoraux suggère un impact important du microenvironnement des tumeurs pulmonaires sur le devenir des cellules cancéreuses [76]. Le programme de développement de cellules initialement engagées dans une voie de lignage spécifique peut être modifié par des changements de signaux provenant du microenvironnement local [77]. Les différentes tumeurs bronchiques pourraient provenir de niches de cellules souches cancéreuses spécifiques de certaines régions pulmonaires. Toutefois leur existence reste débattue [78].

7. Modèle des cellules souches cancéreuses pulmonaires

Les cellules tumorogènes pulmonaires humaines ont été isolées en utilisant différentes approches à partir de lignées cellulaires et de tumeurs primitives. Les modèles de cellules souches cancéreuses établis à partir de lignées cancéreuses pulmonaires sont basés sur le phénotype ou sur les caractéristiques fonctionnelles de ces cellules (Fig. 2). La sous-population isolée a montré une capacité de repopulation et de résistance à de multiples drogues de chimiothérapie dans le cancer bronchique. De plus, l'expression de la télomérase humaine reverse transcriptase (hTERT) est plus élevée dans la SP ce qui suggère que cette fraction cellulaire serait particulièrement riche en cellules initiatrices de tumeurs bronchiques dont le potentiel prolifératif serait illimité [79–82]. Les cellules souches cancéreuses peuvent être identifiées et isolées par tricellulaire à l'aide d'une technique de cytométrie de flux utilisant le marqueur de surface CD133 [37]. Le peu de marqueurs précoces pour les progéniteurs pulmonaires représente un net manque dans nos connaissances. Les marqueurs connus ne sont pas toujours idéaux pour trier les populations de cellules souches cancéreuses [83]. Le phénotype des cellules souches cancéreuses n'est pas uniforme ce qui souligne la nécessité de trouver de nouveaux marqueurs plus spécifiques ou d'identifier des combinaisons de marqueurs pour caractériser les cellules souches cancéreuses potentielles. L'isolement des cellules souches cancéreuses pulmonaires basé sur une activité élevée d'aldéhyde déshydrogénase a été obtenu en utilisant la technique d'Aldefluor suivi d'un tricellulaire par activation de fluorescence (FACS) (Fig. 2) [42]. La seconde approche conduisant à l'isolement de cellules souches cancéreuses pulmonaires a été basée sur leurs propriétés inhérentes fonctionnelles de résistance à la chimiothérapie (Fig. 2). Les cellules survivantes après traitement par cisplatine, doxorubicine ou étoposide ont été isolées. Elles présentent les caractéristiques phénotypiques précédemment décrites [84]. Ces différents modèles de cellules souches cancéreuses développés à partir de lignées cancéreuses peuvent être cultivés in vitro en tumorosphères en condition non adhérentes en utilisant du milieu sans sérum supplémenté par des facteurs de croissance. Ces cellules ont également un fort potentiel clonogène, des capacités d'autorenouvellement, de production de progéniteurs différenciés et de forte tumorogénicité in vivo (Fig. 3).

Les premières expériences d'isolement, de culture et d'expansion de cellules souches cancéreuses pulmonaires à partir de tumeurs primitives issues de patients ont été basées sur la capacité de ces cellules à survivre dans du milieu de culture sans sérum et à proliférer en formant des tumorosphères [11]. Les

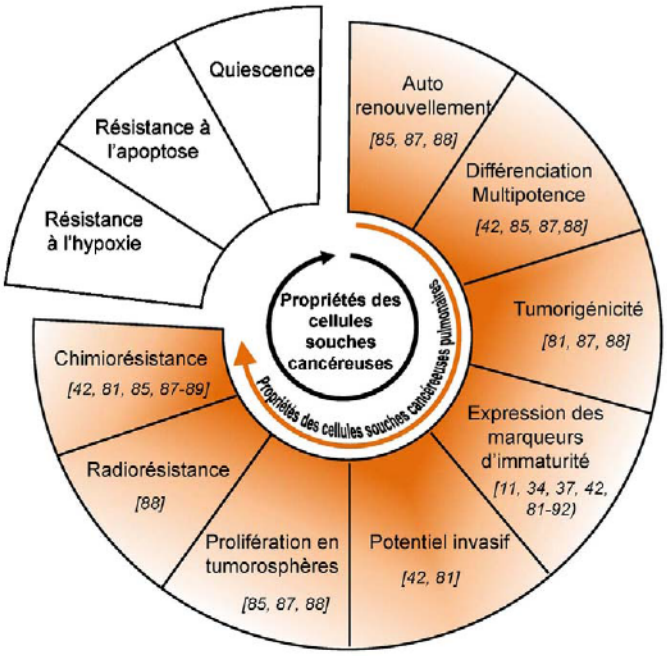


Fig. 3. Propriétés des cellules souches cancéreuses et des cellules souches cancéreuses pulmonaires. Les caractéristiques des cellules souches cancéreuses vérifiées au sein de modèles pulmonaires sont présentées avec les références des travaux correspondants.

cellules CD133+ isolées à partir de tumeurs primitives présentaient des caractéristiques de cellules souches cancéreuses in vitro et in vivo [85]. L'expression de CD133 par les tumeurs a été corrélée avec une survie sans progression plus courte chez les patients traités par une chimiothérapie à base de platine, mais ce point reste controversé [86–89].

In vivo, les dilutions limite consistent à injecter un nombre décroissant de cellules. Cette méthode, utilisée pour des xénogreffes tumorales sous-cutanées, pourrait prouver un enrichissement en cellules souches cancéreuses dans la sous-population cellulaire isolée [27,90]. À ce jour, il n'y a pas de données publiées sur l'utilisation de cette méthode dans le modèle des cellules souches cancéreuses pulmonaires permettant de déterminer le nombre minimal de cellules initiatrices de tumeur nécessaire et suffisant pour régénérer une tumeur.

Quelques modèles murins de cellules initiatrices de tumeurs pulmonaires ont été développés [74,91]. La fréquence des cellules souches cancéreuses dans ces modèles est très variable. Actuellement, il n'existe pas de sous-population isolée à partir d'un modèle animal capable de restaurer l'hétérogénéité de la tumeur initiale chez un hôte secondaire ou tertiaire [83].

8. Radiosensibilité des cellules souches cancéreuses

L'existence des cellules souches cancéreuses et leur sensibilité aux traitements est une question cruciale en cancérogénèse et pour la curabilité des tumeurs. Plusieurs études suggèrent une résistance des cellules souches cancéreuses à la chimiothérapie ainsi qu'à la radiothérapie. Phillips et al. ont montré sur des modèles de culture en mammosphères, riches en cellules de phénotype $CD24^{-/bas}/CD44^{+}$, que des cellules issues de lignées cellulaires de carcinome mammaire ayant des propriétés « initiatrices de tumeur » sont plus radiorésistantes que les autres cellules de carcinome mammaire [91]. En effet, cette équipe a mis en évidence une différence absolue de la fraction survivante à 2 Gy de 20 % en moyenne ainsi qu'une diminution du taux d'espèces réactives de l'oxygène et du taux d'histones H2AX phosphorylés (γH2AX) dans les cultures sphéroïdes riches en cellules initiatrices de tumeur, γH2AX étant un senseur des cassures double-brin de l'ADN. De plus, l'irradiation fractionnée d'une population mixte en culture augmente le pourcentage de cellules non adhérentes $CD24^{-/bas}/CD44^{+}$ suggérant une relative radiorésistance de cette sous-population qui pourrait expliquer les phénomènes de poursuite évolutive sous radiothérapie. Toutefois, Diehn et al. soulèvent plusieurs points importants dans l'interprétation de ces résultats [92]. Tout d'abord, le concept de cellule souche décrit dans les tumeurs primitives n'est pas nécessairement transposable aux lignées cellulaires du fait de leurs multiples passages en culture dans des conditions artificielles pouvant influencer leur potentiel tumorogène. De plus, les conditions de culture peuvent induire des différences fonctionnelles entre les cellules souches cancéreuses et les cellules cancéreuses « non souches » de la masse tumorale observées in vitro. Les cultures de mammosphères de Phillips et al. ont été réalisées en présence d'*epidermal growth factor* (EGF) et de *fibroblast growth factor* (FGF) qui sont connus pour réduire la radiosensibilité cellulaire [93,94]. Les protéines de surface utilisées pour identifier les cellules souches cancéreuses ne sont pas nécessaires et suffisantes pour conférer des propriétés analogues à celles des cellules souches. Ces protéines ne peuvent être considérées pour l'instant que comme des marqueurs de sélection sans implication fonctionnelle. Il est donc impératif de montrer que la population sélectionnée par son phénotype de surface possède bien les caractéristiques fonctionnelles des cellules souches cancéreuses c'est-à-dire la capacité d'autorenouvellement ainsi que celle de donner naissance à des progéniteurs engagés vers une différenciation et que les cellules cancéreuses considérées comme « non souches » ne présentent pas ces propriétés. Clarke et al. ont proposé de mettre en évidence cette différence de propriétés grâce à des modèles animaux de transplantation en série de cellules souches cancéreuses et de cellules cancéreuses « non souches » [95]. Dans les différentes études sur des modèles murins, plusieurs centaines voir milliers de cellules souches cancéreuses sont nécessaires à la formation d'une tumeur. Il est possible que parmi ces cellules initiatrices de tumeur seule une partie corresponde à des cellules souches capables d'autorenouvellement et de production de progéniteurs malins. Les cultures de sphéroïdes de Phillips et al. contiennent environ 40 % de cellules $CD24^{-/bas}/CD44^{+}$ et possiblement encore moins de vraies cellules souches cancéreuses. L'existence d'une population mixte de cellules souches et « non souches » peut biaiser les analyses fonctionnelles reflétant également les propriétés des cellules « contaminantes » correspondant possiblement à des progéniteurs précoces.

Enfin, in vivo le microenvironnement peut avoir un effet de régulation positive ou négative de la radiosensibilité extrinsèque de ces cellules souches cancéreuses. Ainsi, si les cellules souches cancéreuses sont situées dans des régions hypoxiques, le taux d'espèces réactives de l'oxygène produites sera plus faible conduisant à une moindre radiosensibilité. En effet, il existe des données cliniques et précliniques montrant que le taux de contrôle local de la tumeur après radiothérapie est inversement corrélé à l'hypoxie tumorale [96,97]. Cette hypothétique protection des cellules souches cancéreuses par l'hypoxie est corroborée par les études cliniques montrant une meilleure radiosensibilité tumorale lors de l'exposition à des drogues augmentant la sensibilité des cellules hypoxiques aux radiations ionisantes comme les nitroimidazolés ou lors de l'inhalation de gaz enrichis en oxygène en condition hyperbare [98]. Il pourrait donc exister, au sein de la tumeur, des niches microenvironnementales radioprotectrices. Il est par conséquent, important d'évaluer la radiosensibilité dans un contexte tumoral in vivo et non-seulement sur des cultures cellulaires dont la pertinence clinique reste limitée. L'hypoxie pourrait également agir directement sur les cellules souches cancéreuses

par le biais des facteurs inductibles par l'hypoxie (HIFs) comme HIF2α qui pourraient induire l'expression du facteur de transcription *Oct4* qui est l'un des éléments clés du renouvellement et de l'auto-entretien des cellules souches dans de nombreux tissus [99].

Des études complémentaires permettant de préciser la distribution des cellules souches cancéreuses au sein de la tumeur, leur regroupement en niche où au contraire leur répartition homogène, pourraient avoir un impact majeur sur la stratégie balistique et dosimétrique en radiothérapie. Des études portant sur les techniques d'imagerie fonctionnelle et moléculaire permettant d'identifier les zones hypoxiques et de localiser les cellules souches grâce à leurs marqueurs de surface ainsi qu'à de nouveaux traceurs plus spécifiques pourraient conduire à un ciblage des cellules souches cancéreuses par la radiothérapie à l'heure du *dose painting* et des techniques modernes hautement conformationnelles comme la stéréotaxie. De plus, les cellules hypoxiques seraient plus sensibles aux fortes doses par fraction utilisées en radiothérapie en conditions stéréotaxiques qu'à celles utilisées en fractionnement classique [100]. Une autre des hypothèses intéressantes avancées est que les phénomènes de réoxygénation entre les fractions pourraient induire une différenciation des cellules souches cancéreuses les rendant sensibles aux traitements actifs sur les cellules différenciées de la masse tumorale et ainsi permettre d'éradiquer la tumeur [26].

Bao et al. suggèrent que les cellules souches de glioblastome sont radiorésistantes et qu'elles pourraient être à l'origine des échecs de traitement de cette pathologie [29]. En effet, ces auteurs ont montré que les cellules $CD133^+$ de glioblastome multiforme, considérées comme initiatrices de tumeur, sont plus radiorésistantes que les cellules $CD133^-$. In vitro (sur des cultures de neurosphères) et in vivo (sur des modèles de xénogreffe), ces auteurs ont montré une accumulation de cellules $CD133^+$ après irradiation. Une augmentation même modérée du pourcentage de cellules $CD133^+$ en suspension, utilisées pour initier des tumeurs entraîne une augmentation drastique du taux de croissance tumorale. Enfin, Bao et al. ont étudié de nombreux marqueurs de dommages induits par l'irradiation (apoptose, phosphorylation des histones H2AX, phosphorylation des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN) montrant que les cellules $CD133^+$ sont capables d'activer des mécanismes de réparation de manière plus efficace que les cellules $CD133^-$ [29].

Les études de Bao et al. et Philips et al. qui tendent à montrer une radiorésistance des cellules souches cancéreuses, pourraient avoir d'importantes implications cliniques [29,91]. Elles soulèvent toutefois de nombreuses questions encore non résolues sur la généralisation de ces propriétés aux cellules souches cancéreuses d'autres tumeurs, sur l'impact en termes de radiorésistance d'un pourcentage variable de cellules souches cancéreuses au sein d'une tumeur, sur la résistance à d'autres thérapeutiques et sur les moyens de repérer ces cellules souches cancéreuses, de les cibler mais aussi de définir des modèles pertinents pour évaluer l'efficacité des traitements non seulement en termes de réduction de volume tumoral mais surtout en termes de guérison.

Actuellement, la majorité des essais précliniques en cancérologie se basent sur des paramètres volumétriques comme les expériences de retard de croissance tumorale ou de régression tumorale. Il existe, par conséquent, un risque important de baser le développement, l'évaluation et l'optimisation de nouvelles thérapeutiques sur un effet « de masse » sur la tumeur sans impact sur sa curabilité [95,101]. Cela pourrait expliquer certains résultats cliniques parfois spectaculaires en taux de réponse qui ne s'accompagnent pas d'effet sur les taux de contrôle local et de survie. Ainsi, faudrait-il associer un traitement classique détruisant les cellules de la masse tumorale à un traitement ciblant les cellules souches cancéreuses afin d'éviter toute récidive.

9. Données précliniques sur les cellules souches cancéreuses pulmonaires

La fraction survivante de cellules cancéreuses après chimiothérapie ou radiothérapie est faible et pourrait contenir des cellules souches cancéreuses. Ces cellules résiduelles pourraient être responsables de récidives. Ces cellules doivent donc être éradiquées pour permettre une survie sans récidive à long terme. Des traitements associant des drogues cytotoxiques et des thérapies ciblées sont probablement nécessaires pour supprimer toutes les cellules cancéreuses [5]. Des données précliniques sur d'hypothétiques cibles des cellules souches cancéreuses commencent à émerger.

Les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur sont deux types de gènes impliqués dans la cancérogénèse. Les oncogènes sont des gènes dominants alors que les gènes suppresseurs de tumeur sont récessifs [102]. Des mutations activatrices ou des dérégulations transcriptionnelles peuvent faire passer d'un proto-oncogène à un oncogène. Les gènes *Runx* peuvent présenter des caractéristiques d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeur. Ces gènes codent pour des facteurs transcriptionnels impliqués dans le développement normal et ont une expression tissu-spécifique. De nombreuses translocations chromosomiques impliquant les gènes *Runx* et conduisant à une protéine de fusion oncogénique ont été rapportées [103]. Ces protéines de fusion pourraient avoir un spectre d'activité oncogénique restreint à certains tissus [104]. Ce concept, appliqué aux cellules souches cancéreuses pourrait suggérer que certains oncogènes spécifiques serait capables de sélectionner et d'entretenir un phénotype malin particulier propre à une certaine lignée cellulaire. *Runx3* est un facteur transcriptionnel essentiel pour la phase tardive du développement pulmonaire. *Runx3* est nécessaire au contrôle de la différenciation et de la prolifération de l'épithélium bronchiolaire [105]. Une répression fréquente de *Runx3* par hyperméthylation de son promoteur a été rapportée au stade prénéoplasique de l'adénocarcinome bronchique [106,107]. La régulation négative de *Runx3* pourrait être un évènement précoce dans le développement de carcinomes bronchiques via son action sur la différenciation des cellules progénitrices [105].

De plus, certaines données suggèrent que dans les cancers bronchiques, exprimant TTF1 pourrait être un oncogène spécifique du lignage des adénocarcinomes et *BRF2* un oncogène spécifique du lignage des carcinomes épidermoïdes [108,109].

Les cellules souches broncho-alvéolaires ont la capacité de se différencier en cellules de Clara ou en cellules AT2. Elles présentent une co-expression des protéines sécrétrices des cellules de Clara (CCSP) et des protéines C du surfactant (SPC) (Fig. 1) [74]. Ces cellules ont aussi la capacité de s'autorenouveler et d'exprimer *Oct4*. *Oct4* est un facteur transcriptionnel des cellules souches embryonnaires dont l'expression est corrélée avec un pronostic défavorable [85,110,111]. De plus, les cellules *knock down* pour *Oct4* pourraient conduire à l'apoptose d'une population cellulaire tumorale bronchique proche des cellules souches cancéreuses [112].

Sox2 est un facteur essentiel de régulation de la transcription des cellules souches embryonnaires [113]. *Sox2* contrôle l'autorenouvellement et les processus de différenciation [114]. Il est également impliqué dans la morphogénèse de l'arbre bronchique pendant le développement pulmonaire [57,58]. *Sox2* pourrait être un oncogène dont l'expression est essentielle pour la cancérogénèse des carcinomes épidermoïdes. Il serait capable d'induire une transformation cellulaire et de conférer aux cellules épidermoïdes humaines des propriétés initiatrices de tumeur [115]. Les tumeurs sur-exprimant *Sox2* semblent avoir pronostic moins favorable [116].

Oct4 et *Sox2* sont deux des quatre facteurs transcriptionnels cruciaux pour la coopération et la reprogrammation des cellules différenciées en cellules pluripotentes dont le phénotype est proche

de celui des cellules souches [117,118]. La transplantation nucléaire d'*Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* et *Klf4* peut reprogrammer le génome d'une cellule somatique et lui donner le statut d'une cellule souche embryonnaire. Y a-t-il une voie comparable par laquelle les cellules cancéreuses pourraient réacquérir un profil immature avec des propriétés d'autorenouvellement ? *Oct4* et *Sox2* pourraient participer à ce type de processus conduisant à la formation de cellules souches cancéreuses.

Le *stem cell factor* (SCF) est un facteur mitogène et angiogénique impliqué dans la cancérogénèse. Il a été montré que le *c-kit* humain peut agir comme un récepteur de SCF en promouvant la croissance tumorale [119–121].

Les patients présentant soit une mutation soit une surexpression de *c-kit* ont un taux de suivie plus faible et présentent une résistance à la chimiothérapie [122]. Le blocage de la voie SCF/*c-kit* inhibe la prolifération et la survie après chimiothérapie des cellules souches cancéreuses de lignées humaines de carcinomes bronchiques [123]. Le blocage de la voie SCF/*c-kit* par l'exposition à un anticorps neutralisant le SCF ou par l'imatinib (Gleevec®) (inhibiteur de *c-kit*), en association au cisplatine pourrait conduire à une inhibition des cellules souches cancéreuses et des cellules tumorales non souches.

Les différences entre les cellules souches normales et les cellules souches cancéreuses pourraient également être à l'origine de nouvelles cibles thérapeutiques antigéniques ou moléculaires. Il est nécessaire de dessiner de nouvelles approches thérapeutiques pour atteindre spécifiquement les voies de signalisation des cellules souches cancéreuses tout en épargnant celles des cellules souches normales. Une plus ample caractérisation des cibles spécifiques des cellules souches cancéreuses pulmonaires pourrait conduire à de nouvelles associations thérapeutiques plus efficaces. Pour ce faire, l'un des objectifs les plus importants dans un avenir proche est de mieux caractériser et isoler les cellules souches cancéreuses pulmonaires en associant les études de marqueurs de surface et les tests fonctionnels. Les cellules souches cancéreuses pulmonaires correspondent très vraisemblablement à une population hétérogène ayant des profils de résistance variables aux traitements. L'identification d'oncogènes spécifiques de certains lignages ou de leurs protéines de fusion pourrait nous apporter de nouvelles approches thérapeutiques ciblées spécifiquement dirigées contre les cellules souches cancéreuses. Contrairement aux effets de la chimiothérapie ou de la radiothérapie sur les cellules tumorales matures, les thérapies dirigées contre les cellules souches cancéreuses pourraient avoir des effets lents mais durables. Par conséquent les nouveaux modèles d'étude animaux des cellules souches cancéreuses devront être pensés sur de longues périodes d'observation en programmant des analyses intermédiaires.

10. Conclusion

Les cellules souches cancéreuses constituent un thème central de la biologie des cancers et des thérapeutiques antitumorales. La connaissance des voies de signalisation des cellules souches cancéreuses pourrait conduire au développement de nouvelles thérapies pour éradiquer les cellules souches cancéreuses pulmonaires ou induire leur différenciation. Des modèles prometteurs ont récemment été développés pour isoler une sous-population de cellules souches cancéreuses au sein de la masse tumorale contenant principalement des cellules tumorales différenciées. Cibler les cellules souches cancéreuses ou leur niche micro-environnementale pourrait inhiber leur autorenouvellement et permettre de dépasser leur résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Des données précliniques émergent concernant le rôle de facteurs transcriptionnels comme *Runx3*, *Oct4*, *Sox2* et *c-kit* dans la différenciation tumorale et la résistance aux traitements. De plus amples études in vitro et in vivo sont nécessaires pour dessiner de nouvelles associations thérapeutiques dans les cancers pulmonaires. Enfin, la valeur pronostique de ces cellules souches cancéreuses au sein de la tumeur ou parmi les cellules tumorales circulantes doit encore être déterminée.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

[1] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature 2001;414:105–11.
[2] Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. Science 1976;194:23–8.
[3] Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea–a paradigm shift. Cancer Res 2006;66:1883–90 [discussion 1895–1886].
[4] Campbell LL, Polyak K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? Cell Cycle 2007;6:2332–8.
[5] Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. Nat Rev Cancer 2008;8:755–68.
[6] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:3983–8.
[7] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. Nature 2004;432:396–401.
[8] Collins AT, Maitland NJ. Prostate cancer stem cells. Eur J Cancer 2006;42:1213–8.
[9] Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. Cell Stem Cell 2007;1:313–23.
[10] Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. Nature 2007;445:111–5.
[11] Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. Cell Death Differ 2008;15:504–14.
[12] Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. N Engl J Med 2006;355:1253–61.
[13] Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. Ann Rev Cell Dev Biol 2007;23:675–99.
[14] Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. Nature 2006;441:1075–9.
[15] Zhu X, Zhou X, Lewis MT, Xia L, Wong S. Cancer stem cell, niche and EGFR decide tumor development and treatment response: a bio-computational simulation study. J Theor Biol 2011;269:138–49.
[16] Albini A, Cesana E, Noonan DM. Cancer stem cells and the tumor microenvironment: soloists or choral singers? Curr Pharm Biotechnol 2011;12(2):171–81.
[17] Clarke MF, Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve. Cell 2006;124:1111–5.
[18] Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells. Cancer Cell 2007;11:69–82.
[19] Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:5431–6.
[20] Mazumdar J, O'Brien WT, Johnson RS, LaManna JC, Chavez JC, Klein PS, et al. O_2 regulates stem cells through Wnt/beta-catenin signalling. Nat Cell Biol 2010;12:1007–13.
[21] Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature 1994;367:645–8.
[22] Reynolds BA, Rietze RL. Neural stem cells and neurospheres–re-evaluating the relationship. Nat Methods 2005;2:333–6.
[23] Debeb BG, Xu W, Woodward WA. Radiation resistance of breast cancer stem cells: understanding the clinical framework. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2009;14:11–7.
[24] Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. J Natl Cancer Inst 2008;100:672–9.
[25] Al-Assar O, Muschel RJ, Mantoni TS, McKenna WG, Brunner TB. Radiation response of cancer stem-like cells from established human cell lines after sorting for surface markers. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2009;75:1216–25.
[26] Baumann M, Krause M, Hill R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. Nat Rev Cancer 2008;8:545–54.
[27] Zhang M, Atkinson RL, Rosen JM. Selective targeting of radiation-resistant tumor-initiating cells. Proc Natl Acad Sci USA 2010;107:3522–527.
[28] Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. Clin Cancer Res 2008;14:1291–5.

[29] Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature 2006;444:756–60.
[30] Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. J Exp Med 1996;183:1797–806.
[31] Ding XW, Wu JH, Jiang CP. ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy. Life Sci 2010;86:631–7.
[32] Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. Nat Med 2001;7:1028–34.
[33] Ryan DH, Chapple CW, Kossover SA, Sandberg AA, Cohen HJ. Phenotypic similarities and differences between CALLA-positive acute lymphoblastic leukemia cells and normal marrow CALLA-positive B cell precursors. Blood 1987;70:814–21.
[34] Tirino V, Camerlingo R, Franco R, Malanga D, La Rocca A, Viglietto G, et al. The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer. Eur J Cardiothorac Surg 2009;36:446–53.
[35] Yu Y, Flint A, Dvorin EL, Bischoff J. AC133-2, a novel isoform of human AC133 stem cell antigen. J Biol Chem 2002;277:20711–6.
[36] Taieb N, Maresca M, Guo XJ, Garmy N, Fantini J, Yahi N. The first extracellular domain of the tumour stem cell marker CD133 contains an antigenic ganglioside-binding motif. Cancer Lett 2009;278:164–73.
[37] Klonisch T, Wiechec E, Hombach-Klonisch S, Ande SR, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K, et al. Cancer stem cell markers in common cancers – therapeutic implications. Trends Mol Med 2008;14:450–60.
[38] Yoshida A, Rzhetsky A, Hsu LC, Chang C. Human aldehyde dehydrogenase gene family. Eur J Biochem 1998;251:549–57.
[39] Jones RJ, Barber JP, Vala MS, Collector MI, Kaufmann SH, Ludeman SM, et al. Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. Blood 1995;85:2742–6.
[40] Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. Cell Stem Cell 2007;1:555–67.
[41] Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. Cancer Res 2009;69:3382–9.
[42] Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. Mol Cancer Res 2009;7:330–8.
[43] Kelly PN, Dakic A, Adams JM, Nutt SL, Strasser A. Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. Science 2007;317:337.
[44] Yoo MH, Hatfield DL. The cancer stem cell theory: is it correc. Mol Cells 2008;26:514–6.
[45] Rowan K. Are cancer stem cells real? After four decades, debate still simmers. J Natl Cancer Inst 2009;101:546–7.
[46] Baguley BC. Multiple drug resistance mechanisms in cancer. Mol Biotechnol 2010;46:308–16.
[47] Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Metabolic flexibility and cell hierarchy in metastatic cancer. Mitochondrion 2010;10:584–8.
[48] Aguirre-Ghiso JA. The problem of cancer dormancy: understanding the basic mechanisms and identifying therapeutic opportunities. Cell Cycle 2006;5:1740–3.
[49] Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE. Lung cancer: diagnosis and management. Am Fam Physician 2007;75:56–63.
[50] Brambilla E, Veale D, Moro D, Morel F, Dubois F, Brambilla C. Neuroendocrine phenotype in lung cancers. Comparison of immunohistochemistry with biochemical determination of enolase isoenzymes. Am J Clin Pathol 1992;98:88–97.
[51] Yanada M, Yaoi T, Shimada J, Sakakura C, Nishimura M, Ito K, et al. Frequent hemizygous deletion at 1p36 and hypermethylation downregulate RUNX3 expression in human lung cancer cell lines. Oncol Rep 2005;14:817–22.
[52] Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, Yamakido M, Inai K, Gazdar AF, et al. Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. J Natl Cancer Inst 1995;87:895–902.
[53] Amos CI, Xu W, Spitz MR. Is there a genetic basis for lung cancer susceptibility? Recent Results Cancer Res 1999;151:3–12.
[54] Metzger RJ, Klein OD, Martin GR, Krasnow MA. The branching programme of mouse lung development. Nature 2008;453:745–50.
[55] Cardoso WV, Lu J. Regulation of early lung morphogenesis: questions, facts and controversies. Development 2006;133:1611–24.
[56] Weaver M, Batts L, Hogan BL. Tissue interactions pattern the mesenchyme of the embryonic mouse lung. Dev Biol 2003;258:169–84.
[57] Ishii Y, Rex M, Scotting PJ, Yasugi S. Region-specific expression of chicken Sox2 in the developing gut and lung epithelium: regulation by epithelial-mesenchymal interactions. Dev Dyn 1998;213:464–75.
[58] Gontan C, de Munck A, Vermeij M, Grosveld F, Tibboel D, Rottier R. Sox2 is important for two crucial processes in lung development: branching morphogenesis and epithelial cell differentiation. Dev Biol 2008;317:296–309.
[59] Okubo T, Knoepfler PS, Eisenman RN, Hogan BL. Nmyc plays an essential role during lung development as a dosage-sensitive regulator of progenitor cell proliferation and differentiation. Development 2005;132:1363–74.
[60] Perl AK, Wert SE, Nagy A, Lobe CG, Whitsett JA. Early restriction of peripheral and proximal cell lineages during formation of the lung. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:10482–7.
[61] Pack RJ, Al-Ugaily LH, Morris G, Widdicombe JG. The distribution and structure of cells in the tracheal epithelium of the mouse. Cell Tissue Res 1980;208:65–84.
[62] Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR. In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004;286:L643–649.
[63] Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR. Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. Am J Pathol 2004;164:577–88.
[64] Nakanishi K, Hiroi S, Kawai T, Suzuki M, Torikata C. Argyrophilic nucleolar-organizer region counts and DNA status in bronchioloalveolar epithelial hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. Hum Pathol 1998;29:235–9.
[65] Trichopoulos D, Mollo F, Tomatis L, Agapitos E, Delsedime L, Zavitsanos X, et al. Active and passive smoking and pathological indicators of lung cancer risk in an autopsy study. JAMA 1992;268:1697–701.
[66] Giangreco A, Arwert EN, Rosewell IR, Snyder J, Watt FM, Stripp BR. Stem cells are dispensable for lung homeostasis but restore airways after injury. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:9286–91.
[67] Evans MJ, Cabral-Anderson LJ, Freeman G. Role of the Clara cell in renewal of the bronchiolar epithelium. Lab Invest 1978;38:648–53.
[68] Giangreco A, Reynolds SD, Stripp BR. Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction. Am J Pathol 2002;161:173–82.
[69] Reynolds SD, Giangreco A, Power JH, Stripp BR. Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration. Am J Pathol 2000;156:269–78.
[70] Stevens TP, McBride JT, Peake JL, Pinkerton KE, Stripp BR. Cell proliferation contributes to PNEC hyperplasia after acute airway injury. Am J Physiol 1997;272:L486–93.
[71] Linnoila RI, Jensen SM, Steinberg SM, Mulshine JL, Eggleston JC, Gazdar AF. Peripheral airway cell marker expression in non-small cell lung carcinoma. Association with distinct clinicopathologic features. Am J Clin Pathol 1992;97:233–43.
[72] Eisenberg LM, Eisenberg CA. Stem cell plasticity, cell fusion, and transdifferentiation. Birth Defects Res C Embryo Today 2003;69:209–18.
[73] Forbes SJ, Vig P, Poulsom R, Wright NA, Alison MR. Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible. Clin Sci (Lond) 2002;103:355–69.
[74] Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. Cell 2005;121:823–35.
[75] Onuki N, Wistuba II, Travis WD, Virmani AK, Yashima K, Brambilla E, et al. Genetic changes in the spectrum of neuroendocrine lung tumors. Cancer 1999;85:600–7.
[76] Meuwissen R, Berns A. Mouse models for human lung cancer. Genes Dev 2005;19:643–64.
[77] Ohtsuka N, Urase K, Momoi T, Nogawa H. Induction of bud formation of embryonic mouse tracheal epithelium by fibroblast growth factor plus transferrin in mesenchyme-free culture. Dev Dyn 2001;222:263–72.
[78] Giangreco A, Groot KR, Janes SM. Lung cancer and lung stem cells: strange bedfellows? Am J Respir Crit Care Med 2007;175:547–53.
[79] Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. Cancer Res 2007;67:4827–33.
[80] Summer R, Kotton DN, Sun X, Ma B, Fitzsimmons K, Fine A. Side population cells and Bcrp1 expression in lung. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2003;285:L97–104.
[81] Sung JM, Cho HJ, Yi H, Lee CH, Kim HS, Kim DK, et al. Characterization of a stem cell population in lung cancer A549 cells. Biochem Biophys Res Commun 2008;371:163–7.
[82] Salcido CD, Larochelle A, Taylor BJ, Dunbar CE, Varticovski L. Molecular characterisation of side population cells with cancer stem cell-like characteristics in small-cell lung cancer. Br J Cancer 2010;102:1636–44.
[83] Eramo A, Haas TL, De Maria R. Lung cancer stem cells: tools and targets to fight lung cancer. Oncogene 2010;29:4625–35.
[84] Levina V, Marrangoni AM, DeMarco R, Gorelik E, Lokshin AE. Drug-selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties. PLoS One 2008;3:e3077.
[85] Chen YC, Hsu HS, Chen YW, Tsai TH, How CK, Wang CY, et al. Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. PLoS One 2008;3:e2637.
[86] Bertolini G, Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti L, et al. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:16281–6.
[87] Tirino V, Desiderio V, d'Aquino R, De Francesco F, Pirozzi G, Graziano A, et al. Detection and characterization of CD133+ cancer stem cells in human solid tumours. PLoS One 2008;3:e3469.
[88] Salnikov AV, Gladkich J, Moldenhauer G, Volm M, Mattern J, Herr I. CD133 is indicative for a resistance phenotype but does not represent a prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients. Int J Cancer 2010;126:950–8.

[89] Li F, Zeng H, Ying K. The combination of stem cell markers CD133 and ABCG2 predicts relapse in stage I non-small cell lung carcinomas. Med Oncol 2010, doi:10.1007/s12032-010-9646-5 [sous presse].
[90] Bonnefoix T, Bonnefoix P, Verdiel P, Sotto JJ. Fitting limiting dilution experiments with generalized linear models results in a test of the single-hit Poisson assumption. J Immunol Methods 1996;194:113–9.
[91] Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. J Natl Cancer Inst 2006;98:1777–85.
[92] Diehn M, Clarke MF. Cancer stem cells and radiotherapy: new insights into tumor radioresistance. J Natl Cancer Inst 2006;98:1755–7.
[93] Wollman R, Yahalom J, Maxy R, Pinto J, Fuks Z. Effect of epidermal growth factor on the growth and radiation sensitivity of human breast cancer cells in vitro. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1994;30:91–8.
[94] Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodieci P, Juan G, Ehleiter D, et al. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. Science 2001;293:293–7.
[95] Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, et al. Cancer stem cells – perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. Cancer Res 2006;66:9339–44.
[96] Yaromina A, Zips D, Thames HD, Eicheler W, Krause M, Rosner A, et al. Pimonidazole labelling and response to fractionated irradiation of five human squamous cell carcinoma (hSCC) lines in nude mice: the need for a multivariate approach in biomarker studies. Radiother Oncol 2006;81:122–9.
[97] Nordsmark M, Bentzen SM, Rudat V, Brizel D, Lartigau E, Stadler P, et al. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. Radiother Oncol 2005;77:18–24.
[98] Overgaard J. Hypoxic radiosensitization: adored and ignored. J Clin Oncol 2007;25:4066–74.
[99] Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, et al. HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. Genes Dev 2006;20:557–70.
[100] Bernier J, Hall EJ, Giaccia A. Radiation oncology: a century of achievements. Nat Rev Cancer 2004;4:737–47.
[101] Krause M, Zips D, Thames HD, Kummermehr J, Baumann M. Preclinical evaluation of molecular-targeted anticancer agents for radiotherapy. Radiother Oncol 2006;80:112–22.
[102] Bishop JM. The molecular genetics of cancer. Science 1987;235:305–11.
[103] Cameron ER, Neil JC. The Runx genes: lineage-specific oncogenes and tumor suppressors. Oncogene 2004;23:4308–14.
[104] de Guzman CG, Warren AJ, Zhang Z, Gartland L, Erickson P, Drabkin H, et al. Hematopoietic stem cell expansion and distinct myeloid developmental abnormalities in a murine model of the AML1-ETO translocation. Mol Cell Biol 2002;22:5506–17.
[105] Lee KS, Lee YS, Lee JM, Ito K, Cinghu S, Kim JH, et al. Runx3 is required for the differentiation of lung epithelial cells and suppression of lung cancer. Oncogene 2010;29:3349–61.
[106] Li QL, Kim HR, Kim WJ, Choi JK, Lee YH, Kim HM, et al. Transcriptional silencing of the RUNX3 gene by CpG hypermethylation is associated with lung cancer. Biochem Biophys Res Commun 2004;314:223–8.
[107] Licchesi JD, Westra WH, Hooker CM, Machida EO, Baylin SB, Herman JG. Epigenetic alteration of Wnt pathway antagonists in progressive glandular neoplasia of the lung. Carcinogenesis 2008;29:895–904.
[108] Kwei KA, Kim YH, Girard L, Kao J, Pacyna-Gengelbach M, Salari K, et al. Genomic profiling identifies TITF1 as a lineage-specific oncogene amplified in lung cancer. Oncogene 2008;27:3635–40.
[109] Lockwood WW, Chari R, Coe BP, Thu KL, Garnis C, Malloff CA, et al. Integrative genomic analyses identify BRF2 as a novel lineage-specific oncogene in lung squamous cell carcinoma. PLoS Med 2010;7:e1000315.
[110] Zhang X, Han B, Huang J, Zheng B, Geng Q, Aziz F, et al. Prognostic Significance of OCT4 Expression in Adenocarcinoma of the Lung. Jpn J Clin Oncol 2010;40(10):961–6.
[111] Karoubi G, Gugger M, Schmid R, Dutly A. OCT4 expression in human non-small cell lung cancer: implications for therapeutic intervention. Interact Cardiovasc Thorac Surg 2009;8:393–7.
[112] Hu T, Liu S, Breiter DR, Wang F, Tang Y, Sun S. Octamer 4 small interfering RNA results in cancer stem cell-like cell apoptosis. Cancer Res 2008;68:6533–40.
[113] Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. Cell 2005;122:947–56.
[114] Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C, et al. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. Nature 2006;442:533–8.
[115] Hussenet T, Dali S, Exinger J, Monga B, Jost B, Dembele D, et al. SOX2 is an oncogene activated by recurrent 3q26.3 amplifications in human lung squamous cell carcinomas. PLoS One 5:e8960.
[116] Lu Y, Futtner C, Rock JR, Xu X, Whitworth W, Hogan BL, et al. Evidence that SOX2 overexpression is oncogenic in the lung. PLoS One 5:e11022.
[117] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 2006;126:663–76.
[118] Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. Nature 2007;448:318–24.
[119] Krystal GW, Hines SJ, Organ CP. Autocrine growth of small cell lung cancer mediated by coexpression of c-kit and stem cell factor. Cancer Res 1996;56:370–6.
[120] Hines SJ, Organ C, Kornstein MJ, Krystal GW. Coexpression of the c-kit and stem cell factor genes in breast carcinomas. Cell Growth Differ 1995;6:769–79.
[121] Yasuda A, Sawai H, Takahashi H, Ochi N, Matsuo Y, Funahashi H, et al. Stem cell factor/c-kit receptor signaling enhances the proliferation and invasion of colorectal cancer cells through the PI3K/Akt pathway. Dig Dis Sci 2007;52:2292–300.
[122] Hassan HT. c-Kit expression in human normal and malignant stem cells prognostic and therapeutic implications. Leuk Res 2009;33:5–10.
[123] Levina V, Marrangoni A, Wang T, Parikh S, Su Y, Herberman R, et al. Elimination of human lung cancer stem cells through targeting of the stem cell factor-c-kit autocrine signaling loop. Cancer Res 2010;70:338–46.

- **“Thérapies ciblées et radiothérapie dans les cancers bronchiques non à petites cellules”**

Cancer/Radiothérapie 15 (2011) 527–535

Disponible en ligne sur ScienceDirect www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France EM|consulte www.em-consulte.com

Mise au point

Thérapies ciblées et radiothérapie dans les cancers bronchiques non à petites cellules

Targeted therapies and radiation therapy in non-small cell lung cancer

S. Rivera[a,*], L. Quéro[a], S. Wong Hee Kam[a], C. Maylin[a], É. Deutsch[b,c], C. Hennequin[a]

[a] *Service de cancérologie radiothérapie, hôpital Saint-Louis, AP–HP, 1, avenue Claude-Vellefaux, 75010 Paris, France*
[b] *UMR 1030 « radiosensibilité des tumeurs et tissus sains », Inserm, 114, rue Édouard-Vaillant, 94805 Villejuif, France*
[c] *Département de radiothérapie, institut de cancérologie Gustave-Roussy, 114, rue Édouard-Vaillant, 94805 Villejuif, France*

INFO ARTICLE

Historique de l'article :
Disponible sur Internet le 31 août 2011

Mots clés :
Carcinome bronchique non à petites cellules
Antiangiogéniques
Chimioradiothérapie concomitante
EGFR
MTOR
Histones désacétylase
Kinase aurora
HSP90
Cellules souches cancéreuses

RÉSUMÉ

Le cancer bronchique est le plus meurtrier au monde. Environ 80–85 % sont des carcinomes bronchiques non à petites cellules. Plus d'un tiers sont diagnostiqués alors qu'ils sont localement évolués. À ce stade, le traitement de référence reste la chimioradiothérapie concomitante pour les patients en bon état général. En dépit des progrès de ces dernières années, le pronostic des carcinomes bronchiques non à petites cellules reste défavorable avec des taux élevés de récidives locale et métastatique. L'hétérogénéité des anomalies moléculaires présentées par les carcinomes bronchiques non à petites cellules et la connaissance approfondie de ces cibles potentielles est une source prometteuse de développement de nouveaux agents pharmacologiques. Cet article fait une mise au point sur les voies les plus étudiées, mais aussi celles particulièrement prometteuses dans le traitement des bronchiques non à petites cellules localement évolués inopérables. Les études les plus avancées en association à la radiothérapie portent sur l'inhibition de la voie d'*epidermal growth factor receptor* (EGFR) par anticorps monoclonaux et inhibiteurs de tyrosine kinase, et l'inhibition de l'angiogénèse. L'essor de ces thérapies ciblées permet d'envisager le développement de combinaisons thérapeutiques personnalisées adaptées aux caractéristiques tumorales intrinsèques. La modulation pharmacologique de la radiosensibilité par les thérapies ciblées n'en est qu'à ses débuts mais offre déjà des perspectives encourageantes.

© 2011 Société française de radiothérapie oncologique (SFRO). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Keywords:
Non small cell lung carcinoma
Antiangiogenic agents
Concomitant radiochemotherapy
EGFR
MTOR
Histone deacetylase
Aurora kinase
Cancer stem cells

ABSTRACT

Lung cancer is the leading cause of cancer-related death. Between 80–85% of lung cancers are non-small cell lung carcinomas. One third of the patients are diagnosed with locally advanced stage. In this condition, concomitant radio-chemotherapy is the standard treatment for patients with good performance status. Despite important improvements in the last years, non-small cell lung carcinoma prognosis remains poor, with high rates of both local recurrences and metastases. The heterogeneity of molecular characteristics of non-small cell lung carcinoma cells and a better knowledge of potential targets offer promising developments for new pharmacologic agents. Hereafter we will review the currently most studied pathways and the most promising ones for the treatment of locally advanced unresectable non-small cell lung carcinoma. Two of the most attractive pathways where new agents have been developed and assessed in combination with thoracic radiotherapy or radiochemotherapy are the EGFR pathway (either with the use of monoclonal antibodies or tyrosine kinase inhibitors) and the angiogenesis inhibition. The development of targeted agents could lead to individualized therapeutic combinations taking into account the intrinsic characteristics of tumor cells. Pharmacological modulation of tumour cells radiosensitivity by targeted therapies is only starting, but yet offers promising perspectives.

© 2011 Société française de radiothérapie oncologique (SFRO). Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : sorivera1999@yahoo.fr (S. Rivera).

1278-3218/$ – see front matter © 2011 Société française de radiothérapie oncologique (SFRO). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.
doi:10.1016/j.canrad.2011.07.234

1. Introduction

Le cancer bronchique est le plus meurtrier au monde [1]. Avec plus de 30 000 cas par an en France, selon le rapport de l'Institut national de veille sanitaire (INVS) en 2010, il est au quatrième rang des cancers les plus fréquents. Tous stades confondus, le taux de survie à cinq ans est d'environ 14 % [2]. Les carcinomes bronchiques « non à petites cellules » regroupent principalement les adénocarcinomes, les carcinomes épidermoïdes et les carcinomes à grandes cellules. Ils représentent près de 85 % des cancers bronchiques et sont dans 60 à 75 % des cas diagnostiqués alors qu'ils sont inopérables, localement évolués ou métastatiques, et de pronostic défavorable. Dans la classification TNM de 2009, les cancers de stade III (localement évolués), dont le traitement de référence demeure la chimioradiothérapie concomitante, restent un groupe hétérogène comprenant des tumeurs classées de T1 à T4 et de N0 à N3 [3]. Le profil épidémiologique de ces cancers est également hétérogène avec une augmentation de l'incidence chez la femme et les non-fumeurs. En dépit de taux de réponse initiaux non négligeables, le taux de contrôle local reste décevant et les dissémination métastatiques précoces fréquentes. Une meilleure compréhension de la biologie et de la physiologie des tumeurs pulmonaires a permis d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques conduisant au développement de nouveaux agents dont les plus évolués sont les « anti-epidermal growth factor receptor » (anti-EGFR) et les antiangiogéniques. De nombreuses autres voies et stratégies pouvant optimiser la radiothérapie sont actuellement à l'étude. Cette revue de la littérature fait le point sur les données actuelles sur les associations des thérapies ciblées à la radiothérapie externe et des données prometteuses offrant des perspectives d'optimisation de la prise en charge des carcinomes bronchiques non à petites cellules (Tableau 1).

2. Standards actuels de traitement des carcinomes bronchiques non à petites cellules localement évolués

Le traitement de référence des carcinomes bronchiques non à petites cellules de stade III non opérables est la chimioradiothérapie concomitante utilisant une technique d'irradiation conformationnelle et une chimiothérapie à base de sels de platine. La méta-analyse du Lung Cancer Collaborative Group, reposant sur 52 essais randomisés, qui a inclus 9387 patients, a montré que seules les chimiothérapies à base de cisplatine apportaient un bénéfice de survie en association à la radiothérapie, chez les patients d'indice de performance 0 ou 1. Cette méta-analyse a montré que cette chimioradiothérapie concomitante réduisait le risque de décès de 13 % (*hazard ratio :* 0,87) avec un bénéfice absolu en taux de survie de 4 % à deux ans et 2 % à cinq ans ($p = 0{,}005$) [4]. Les essais menés ces dernières années ont clairement démontré la supériorité de la chimioradiothérapie concomitante sur la chimiothérapie et la radiothérapie séquentielle dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules localement évolués chez des patients en bon état général n'ayant pas perdu significativement du poids [5–13]. L'essai de phase III 94–10 du Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) a comparé une chimioradiothérapie concomitante et une chimioradiothérapie séquentielle avec de la vinblastine et du cisplatine. Cet essai a aussi évalué dans un troisième bras une irradiation bifractionnée de 69,6 Gy par fractions de 1,2 Gy concomitante d'une chimiothérapie par cisplatine et étoposide oral. Les durées médianes de survie et les taux de survie à quatre ans étaient respectivement avec la chimioradiothérapie concomitante, la chimioradiothérapie concomitante bifractionnée et la chimioradiothérapie séquentielle de 17, 15,6 et 14,6 mois et 21, 17 et 12 %. Ces résultats étaient aussi en faveur de la chimioradiothérapie concomitante et mais non de l'hyperfractionnement. La chimioradiothérapie conformationnelle normofractionnée dont la technique a été reprise en détail par Leignel Argo et al. reste donc le standard [14]. Cependant, la majorité de ces études n'ont pas montré une toxicité (principalement œsophagienne) plus forte de la chimioradiothérapie concomitante que de la chimioradiothérapie séquentielle [5,10–12]. Les drogues les plus fréquemment testées ont été la vinorelbine, la vinblastine et l'étoposide en association au cisplatine et le paclitaxel délivré sur un mode hebdomadaire en association au carboplatine [15,16]. À ce jour, aucun essai randomisé de phase III n'a montré la supériorité d'une de ces chimiothérapies sur les autres en concomitance de la radiothérapie. De tels essais sont en cours et prennent le plus souvent en compte le type histologique, ce qui laisse espérer l'émergence de nouveaux standards plus performant dans les années à venir [17].

Tableau 1
Principales thérapies ciblées à l'étude en traitement concomitant ou séquentiel avec la radiothérapie dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules localement évolués.

Cible moléculaire	Agent pharmacologique
Voie d'EGFR	Cétuximab
	Géfitinib
	Erlotinib
Angiogénèse	ZD6474
	Bévacizumab
	SU11657
Voie de mTOR	RAD001
	Eirolimus
HSP90	Geldanamycin
HDAC	Vorinostat
Kinases Aurora	PHA680632
	AZD1152
Vaccin thérapeutique	L-BLP25

EGFR : récepteur au facteur de croissance épidermique (« *epidermal growth factor* »), mTOR : cible de la rapamycine chez les mammifères (« *mammalian target of rapamycin* »), HSP90 : protéine de choc thermique 90 (« *heat shock protein* 90 »), HDAC : histone désacétylase.

3. Association des thérapies ciblées à la radiothérapie : quelle(s) cible(s) choisir ?

À ce jour, les molécules étudiées pour leur influence sur la radiosensibilité intrinsèque tumorale sont impliquées dans la réparation de l'acide désoxyribonucléique (ADN), le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose ou la transduction du signal. D'autres approches en cours de développement, ciblent le microenvironnement afin de moduler la radiosensibilité tumorale en agissant par exemple sur l'angiogénèse ou l'hypoxie. Enfin, des stratégies plus innovantes encore étudient la réponse immunitaire anti-tumorale ou le rôle des cellules souches cancéreuses dans la radiorésistance de certaines tumeurs.

3.1. Voie de l'EGFR

L'une des voies les plus étudiées est celle de l'inhibition d'EGFR, soit par de petites molécules anti-tyrosine kinase d'action intracellulaire (erlotinib et géfitinib) soit par des anticorps monoclonaux empêchant la fixation d'EGF sur le domaine extracellulaire du récepteur (cétuximab), en association à la radiothérapie (Fig. 1). En effet, l'activation de l'EGFR induit un signal intracellulaire activant des voies de prolifération, de différenciation et de survie cellulaire. L'EGFR est exprimé dans de nombreux tissus normaux et tumoraux mais de 50 à 81 % des carcinomes bronchiques non à petites cellules surexpriment l'EGFR [18–21].

Depuis septembre 2005, l'erlotinib a l'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour le traitement des carcinomes bronchiques non à petites cellules localement évolués ou métastatiques après échec

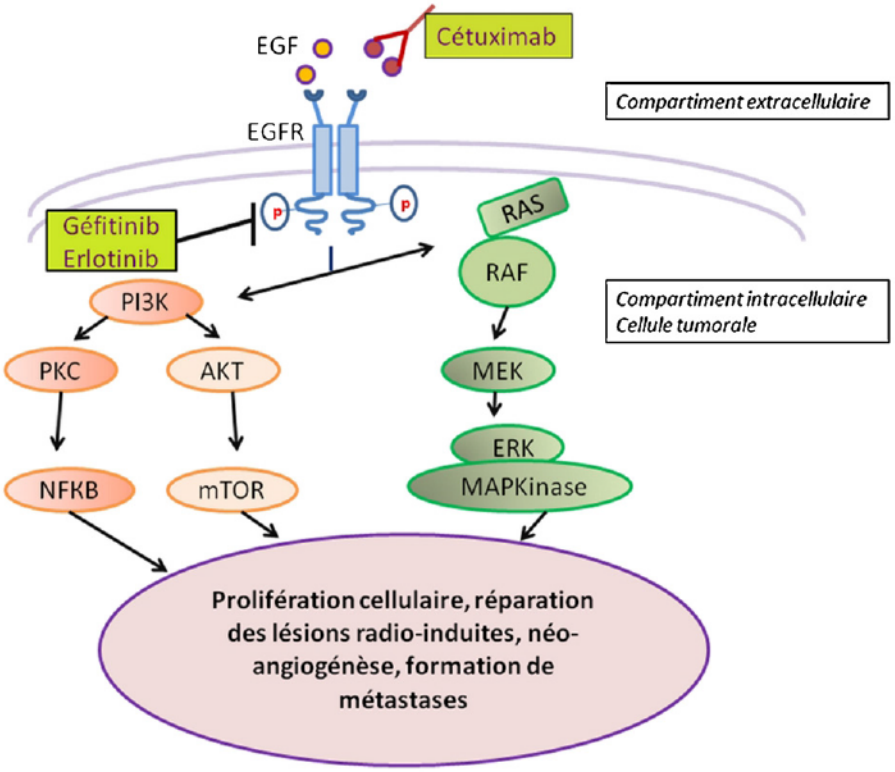


Fig. 1. Mécanismes de ciblage et d'inhibition de la voie de l'*epidermal growth factor receptor* (EGFR). EGF: *epidermal growth factor* ; PI3 K: *phosphatidyl inositol-3 kinase* ; PKC : protéine kinase C ; NFkB : *nuclear factor kappa B* ; mTOR : *mammalian target of rapamycin* ; MEK : *mitogen-activated protein kinase kinase* ; ERK : *extracellular signal-regulated kinase* ; MAP kinase : *mitogen-activated protein kinase.*

d'au moins une ligne de chimiothérapie. Cette AMM a été obtenue suite aux résultats positifs (en termes de survie et de qualité de vie) de l'essai canadien multicentrique, randomisé de phase III « BR21 » qui comparait erlotinib et un placebo dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules prétraités [22,23]. Dans cet essai, la population tirant le plus grand bénéfice de l'erlotinib était celle des femmes, des non fumeurs, des patients d'origine asiatique, de ceux atteints d'un adénocarcinomes ou d'un carcinome bronchioloalvéolaire [24]. En mars 2010, suite aux résultats de l'essai Sequencial Tarceva in Unresectable Lung Cancer (SATURN), l'erlotinib a obtenu l'AMM comme traitement de maintenance après quatre cycles de chimiothérapie à base de platine dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules localement évolués [25]. En Europe, cette AMM ne concerne que les patients en situation de stabilité tumorale (et non ceux en situation de réponse objective comme aux États-Unis) car une analyse de sous-groupe de cet essai a montré que seuls ces patients tiraient un large bénéfice de la maintenance par erlotinib. Récemment, d'importantes données ont été publiées concernant le rôle du statut mutationnel du gène d'EGFR dans le choix des traitements pour les carcinomes bronchiques non à petites cellules évolués. La réponse à l'erlotinib en première ou deuxième ligne de traitement semble corrélée au statut mutationnel d'EGFR [26]. Les mutations sont significativement plus fréquentes chez les femmes (69,7 %), les non fumeurs (66,6 %) et les patients atteints d'adénocarcinome (80,9 %) [26]. Les mutations activatrices les plus fréquentes sont les délétions de l'exon 19 (62,2 %) et de l'exon 21 L858R (37,8 %) [26]. Les durées médianes de survie sans progression et de survie globale des 217 patients recevant l'erlotinib dans cette étude étaient particulièrement longues, respectivement 14 et 27 mois respectivement [26]. En revanche, l'association de l'erlotinib à l'irradiation thoracique est quelque peu décevante bien que le concept soit séduisant sur le plan théorique. L'essai de phase I de Choong et al. a montré que l'association de l'erlotinib à deux schémas différents de chimioradiothérapie était faisable et ne majorait pas significativement la toxicité mais les durées médianes de survie décevantes n'ont pas permis d'en pousser les investigations [27].

Depuis la publication des résultats de l'étude de Mok et al. en 2009, le géfitinib a obtenu une AMM européenne dans le traitement des carcinomes bronchiques non à petites cellules localement évolués ou métastatiques avec mutation activatrice de l'EGFR. Dans cette étude de phase III comparant un traitement par géfitinib et une chimiothérapie par carboplatine et paclitaxel chez des patients asiatiques, non ou peu fumeurs, atteints d'un adénocarcinome bronchique évolué, il y avait un bénéfice de survie sans progression en faveur du géfitinib (*hazard ratio* [HR] : 0,74 ; intervalle de confiance à 95 % [IC95 %] : 0,65–0,85 ; $p < 0{,}001$) [28]. Ce bénéfice de survie sans progression est plus grand chez les patients porteurs d'une mutation activatrice d'EGFR (HR : 0,48 ; IC95 % : 0,36–0,64 ; $p < 0{,}001$) [28]. En ce qui concerne l'association à l'irradiation thoracique, Stinchcombe et al. ont montré une faisabilité de l'association du géfitinib et de la chimioradiothérapie dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules de stade III avec escalade de dose à 74 Gy. Cette étude a montré une toxicité acceptable chez un petit nombre de patients mais les taux de survie étaient décevants avec une durée médiane de survie sans progression de neuf mois (IC95 % : 7–13 mois) [29]. L'essai de phase III du SouthWest Oncology Group (SWOG) S0023 a évalué l'intérêt du géfitinib contre un placebo en maintenance après chimioradiothérapie avec platine et étoposide chez des patients atteints de carcinome bronchique non à petites cellules en réponse ou stable [30]. Une analyse intermédiaire a montré une médiane de survie globale de 23 mois dans le bras gefitinib contre 35 mois dans le bras placebo ($p = 0{,}013$) [30]. L'une des hypothèses avancées pour expliquer ces résultats pourrait être une sélection de cellules K-ras mutées par l'irradiation préalable sur lesquelles les inhibiteurs de tyrosine kinase auraient

un impact négatif [31,32]. L'essai 30106 du Cancer and Leukemia Group B (CALGB) a comparé les résultats obtenus chez des patients en bon état général après chimiothérapie suivie de chimioradiothérapie et ceux obtenus chez des patients en moins bon état général après chimiothérapie suivie d'une radiothérapie seule [33]. Le géfitinib a été ajouté pendant ou après la radiothérapie ou la chimioradiothérapie. Une bonne tolérance a été rapportée dans les deux groupes avec une durée médiane de survie globale de 19 mois dans le groupe en moins bon état général et de 12 mois dans le groupe en bon état général. L'analyse des résultats suggèrent un bénéfice accru du géfitinib dans le groupe dans lequel le pronostic était moins favorable [33].

Le cétuximab est un anticorps monoclonal humanisé chimérique de souris qui empêche la liaison de l'EGF sur son récepteur. Ainsi, l'EGFR ne peut pas se dimériser et activer les voies de signalisation intracellulaires sous-jacentes qui, notamment via la PI3 kinase et les MAP (mitogen-activated protein) kinases, aboutissent à une répression de l'apoptose et à une activation de la division cellulaire [13]. De plus, le cétuximab a un effet cytotoxique propre anticorps dépendant [34–38]. Un essai européen randomisé de phase III (FLEX) a évalué l'association du cétuximab au cisplatine et à la vinorelbine contre cette même chimiothérapie sans cétuximab en première ligne de traitement chez des patients atteints d'un carcinome bronchique non à petites cellules évolué exprimant l'EGFR. Les effets secondaires rapportés sont attendus et gérables (rash acnéiforme) et la durée médiane de survie globale était de 11,3 mois dans le bras avec cétuximab contre 10,1 mois dans le bras chimiothérapie seule (HR : 0,871) [38]. Ces résultats n'ont pas permis au cétuximab d'obtenir l'AMM en association à la chimiothérapie dans cette indication. L'irradiation active la voie d'EGFR, ce qui aboutit à une radiorésistance en favorisant la prolifération cellulaire et la réparation de l'ADN. L'inhibition de l'EGFR provoque une accumulation des cellules en phase G1, ce qui diminue la proportion de cellules en phase S, qui est une phase de radiorésistance. L'irradiation favorise le blocage des cellules en phase G2, ce qui, en théorie, pourrait établir une relation inverse entre l'expression de l'EGFR et la radio-curabilité [39]. Plusieurs modèles précliniques ont montré un effet synergique de l'association cétuximab–irradiation [40]. Les résultats in vivo de l'association du cétuximab à la chimioradiothérapie concomitante sont décevants dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules. L'essai de phase II randomisé 30407 du CALGB, mené sur des carcinomes bronchiques non à petites cellules de stade III inopérables, a évalué une chimioradiothérapie concomitante de 70 Gy avec carboplatine et pémétrexed, avec ou sans cétuximab, suivie de quatre cycles de pémétrexed. Avec un suivi médian de 19,5 mois, les taux de réponse et de survie médiane rapportés étaient respectivement 73 % et 22,3 mois dans le bras sans cétuximab contre 71 % et 18,7 mois dans le bras avec cétuximab. Les auteurs ont donc conclu à l'absence de bénéfice de l'adjonction de cétuximab dans ce schéma de chimioradiothérapie [41]. L'essai SCRATCH a évalué, chez 12 patients atteints d'un carcinome bronchique non à petites cellules de stade III, la toxicité de l'association de cétuximab et de radiothérapie thoracique de 64 Gy après une chimiothérapie d'induction à base de platine. Cet essai a montré une toxicité attendue et acceptable et a proposé une approche intéressante évitant d'accroître la toxicité de la chimioradiothérapie concomitante. L'essai de phase II du RTOG 0324 a évalué, chez 87 patients atteints d'un carcinome bronchique non à petites cellules de stade III, l'observance et la toxicité d'une chimioradiothérapie concomitante de 63 Gy avec du carboplatine et du paclitaxel, associée au cétuximab, qui était débuté une semaine avant la chimioradiothérapie et poursuivi neuf semaines après celle-ci en association à une chimiothérapie de consolidation [42]. L'analyse des résultats a montré un taux de 20 % de toxicité hématologique de grade 4, de 8 % d'œsophagite de grade 3, et de 7 % de pneumopathie de grade 3 ou 4. Les auteurs ont conclu à la faisabilité de ce schéma et aussi rapporté une durée médiane de survie de 22,7 mois et un taux de survie à 24 mois de 49,3 % très prometteur [42]. Dans d'autres types tumoraux le statut K-ras sauvage ou muté influence la réponse au cétuximab, ce qui n'était pas connu lors de la conception de la plus part des essais sur les carcinomes bronchiques non à petites cellules. Le développement des connaissances en matière de résistance aux drogues et de sélection des cancers répondeurs permettra probablement d'améliorer les résultats des traitements des carcinomes bronchiques non à petites cellules.

3.2. *Voie de l'angiogénèse tumorale*

L'association aux antiangiogéniques constitue une autre approche intéressante [43,44]. Les cellules tumorales produisent des facteurs de croissance qui stimulent la prolifération et la migration des cellules endothéliales et permettent la formation de néovaisseaux tumoraux. De nombreuses lignées tumorales pulmonaires surexpriment des facteurs proangiogéniques comme le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), qui jouent un rôle clé dans la prolifération tumorale et le développement de métastases. La voie du VEGF est un élément clé de ces processus [45,46]. Plusieurs agents dirigés contre le récepteur du VEGF (VEGFR) incluant des inhibiteurs de tyrosine kinase (TKi) et des anticorps monoclonaux ont été développés (Fig. 2). Le bévacizumab est un anticorps monoclonal recombinant humanisé de type IgG1 dirigé contre le VEGF qui provoque son inactivation biologique [47,48]. L'adjonction de bévacizumab à la chimiothérapie (par carboplatine et paclitaxel ou gemcitabine et cisplatine) dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules évolués a montré un bénéfice de survie globale et/ou de survie sans progression dans deux essais de phase III, le 4599 de l'Eastern Cooprative Cancer Group (ECOG) et l'étude AVAIL [49,50]. Les carcinomes épidermoïdes, les lésions centrales et les antécédents d'hémoptysie exposent à un risque hémorragique élevé sous bévacizumab et représentent donc des contre-indications à ce médicament. L'irradiation induit une mortalité cellulaire via les dommages qu'elle provoque dans l'ADN et les membranes des cellules tumorales mais aussi les cellules endothéliales microvasculaires au sein du stroma tumoral [51–53]. L'expression de facteurs pro-angiogéniques, comme le VEGF et le Fibroblast Growth Factor (FGF), est augmentée en réponse aux dommages des cellules endothéliales ainsi qu'à l'hypoxie [54,55]. C'est sur cet argument qu'ont été développées les études d'association d'agents antiangiogéniques et d'irradiation. In vitro et in vivo, Shibuya et al. ont montrés que le ZD6474, un inhibiteur du VEGFR2 et de l'EGFR, potentialise l'effet de l'irradiation en réduisant l'efficacité des mécanismes de réparation des lésions sublétales [56]. Il existe peu d'études publiées associant l'irradiation thoracique et le bévacizumab chez l'homme. Le rapport final de deux essais de phase II associant le bévacizumab à une chimioradiothérapie concomitante dans les carcinomes bronchiques à petites cellules (chez 29 patients) et ceux non à petites cellules (chez cinq patients) de stade III inopérables, précocement interrompus en mars 2007 et décembre 2007, a montré que cette association s'accompagnait d'un risque relativement important d'œsophagite sévère, d'hémorragie (une hémorragie pulmonaire létale chez un patient sur les cinq de l'essai sur les carcinomes bronchiques non à petites cellules pendant le traitement de maintenance par bévacizumab) et de fistule œsotrachéale (chez deux patients sur les cinq de l'essai sur les carcinomes bronchiques non à petites cellules pendant la chimioradiothérapie concomitante avec pémétrexed et carboplatine plus bévacizumab) [57]. Un essai de phase II en cours associe le bévacizumab et l'erlotinib à une irradiation thoracique chez 31 patients atteints d'un cancer de stade IIIA ou IIIB, toutes histologies confondues. La randomisation entre trois bras fait suite à deux cycles de chimiothérapie d'induction par pacli-

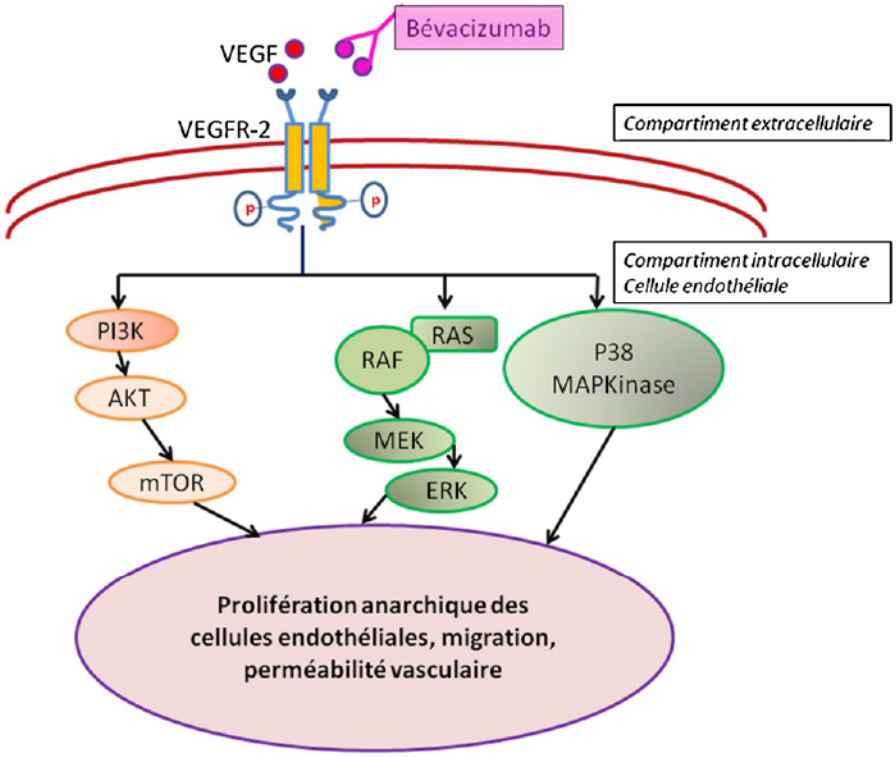


Fig. 2. Mécanismes de ciblage et d'inhibition de la voie du *vascular endothelial growth factor* (VEGF). VEGFR : récepteur du VEGF ; PI3 K : phosphatidyl inositol-3 kinase ; mTOR : *mammalian target of rapamycin* ; MEK : *mitogen-activated protein kinase kinase* ; ERK : *extracellular signal-regulated kinase* ; MAP kinase : *mitogen-activated protein kinase*.

taxel, carboplatine et bévacizumab. Tous les bras comprennent une chimioradiothérapie concomitante de 74 Gy avec carboplatine, paclitaxel mais le bras A y associe du bévacizumab, le bras B du bévacizumab et de l'erlotinib à la dose de 100 mg/j et le bras C du bévacizumab et de l'erlotinib à la dose de 150 mg/j. Durant la phase d'induction, aucune hémorragie pulmonaire n'a été rapportée. Durant la phase de chimioradiothérapie concomitante, la toxicité principale rapportée a été une œsophagite (19,2 % de cas de grade 3) ainsi que deux hémorragies pulmonaires (de grades 3 et 5) [58]. Les essais à venir doivent donc être conçus pour définir les meilleures séquences thérapeutiques et optimiser le choix des drogues à associer aux antiangiogéniques. Huber et al. ont étudié les effets d'une triple stratégie thérapeutique associant un antiangiogénique (SU11657), le pémétrexed et l'irradiation in vitro et in vivo sur des cellules A431 de carcinome épidermoïde humain, et ont montré un effet anti-tumoral supérieur lorsque le SU11657 était débuté avant l'irradiation [59]. Toutefois, quoique ces agents soient souvent très actifs en phase préclinique, il est nécessaire d'établir des schémas d'administration pertinents en clinique en association à la radiothérapie sur un groupe de patients appropriés pour pouvoir mettre en évidence un bénéfice potentiel [60]. En effet, l'optimisation du schéma d'association des anti-angiogéniques à la radiothérapie doit tenir compte du fait que paradoxalement les agents antiangiogéniques réduisent la densité vasculaire mais augmentent l'oxygénation tumorale. Initialement, la pression partielle en oxygène (pO_2) au sein de la tumeur après un traitement anti-angiogénique diminue. Mais la pO_2 augmente ensuite jusqu'à un niveau supérieur au niveau initial. L'une des explications possible de cette amélioration de l'oxygénation des tissus tumoraux est la normalisation vasculaire. Ce phénomène correspond à la formation de capillaires tumoraux moins tortueux, qui peuvent contribuer à une meilleure oxygénation et donc à une plus grande radiosensibilité tumorale [13,61].

3.3. Voie du « *mammalian Target Of Rapamycin* » (*mTOR*)

La voie de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 K)/Akt est activée par la mutation de Ras ou des éléments de cette voie. L'activation de la voie de signalisation de Ras augmente la survie des cellules exposées aux agents provoquant des cassures des brins d'ADN. Le blocage d'EGFR/PI3 K augmente la radiosensibilité des cellules tumorales humaines présentant une mutation K-*ras* [62,63]. L'inhibition de l'expression de l'oncogène Ras diminue la fraction cellulaire survivante après irradiation dans de nombreuses lignées cellulaires dont A549 (lignée humaine d'adénocarcinome pulmonaire) et H460 (lignée humaine de carcinome pulmonaire à grandes cellules) [64]. En effet, il a été montré qu'en cas de mutation activatrice de l'oncogène Ras, ses trois isoformes H-*ras*, K-*ras* et N-*ras* contribuent à la survie après irradiation [65]. Le mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) est un effecteur clé de la voie PI3 K/Akt. La voie de mTOR joue un rôle central dans la régulation de la synthèse protéique et la croissance cellulaire. La fonction la mieux caractérisée de mTOR est la régulation de la synthèse protéique mais mTOR est également impliqué dans la dégradation des protéines, leur stabilisation, l'organisation du cytosquelette d'actine et l'angiogénèse [66,67]. L'inhibition de mTOR bloque la réponse radio-induite des cellules tumorales qui habituellement permet la protection de la microvascularisation tumorale contre l'irradiation. L'inhibition de mTOR au sein des cellules tumorales entraîne une diminution de l'expression de facteurs proangiogéniques. Les cellules endothéliales semblent être plus radiosensibles lorsque mTOR est inhibé. L'effet additif d'un inhibiteur de mTOR, le RAD001 et de l'irradiation sur des expériences de retard de croissance tumorale in vivo pourrait reposer sur l'association d'un effet antiangiogénique et antivasculaire [68]. Un essai de phase I évaluant une radiothérapie thoracique trdidimensionnelle conformationnelle standard de 60 Gy associée à du cisplatine à la dose de 25 mg/m^2 chaque semaine et à des doses

croissantes de sirolimus oral a été menée chez sept patients atteints de cancer bronchique de stade III. Aucun des quatre patients du premier palier de dose n'a souffert de toxicité dose-limitante. Un des trois patients traités au palier supérieur (5 mg/j de sirolimus) a souffert d'une dysphagie de grade III considérée comme dose-limitante. Un autre essai de phase I en cours en France évalue l'association RAD001 et irradiation thoracique avec chimiothérapie séquentielle dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules de stade IIIB. Les modulations génétiques de cette voie peuvent probablement modifier les résultats cliniques de ce type de traitement et doivent certainement être prises en compte pour construire un modèle thérapeutique ciblé personnalisé.

3.4. *Inhibiteurs des histones désacétylases (HDACi)*

Les processus épigénétiques sont des éléments clés de la cancérogénèse et de la progression tumorale qui aboutissent à une modulation de l'expression de gènes sans modification de leur séquence d'ADN [69]. L'acétylation des histones est un mécanisme de régulation épigénétique de la transcription. Les histones désacétylases (HDAC) favorisent la condensation de la chromatine et agissent comme des inhibiteurs de la transcription en empêchant l'accès des facteurs transcriptionnels à l'ADN, ce qui freine le niveau d'expression des gènes correspondants. La répression de la transcription de gènes suppresseurs de tumeur par les HDAC joue un rôle important dans la cancérogénèse et certaines tumeurs présentent une surexpression des HDAC. Les inhibiteurs de HDAC favorisent l'arrêt du cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose des cellules tumorales. En plus de leur pouvoir de décompaction du complexe histone/ADN, les inhibiteurs de HDAC agissent sur l'acétylation et le fonctionnement de protéines non histones comme P53, Bcl-6, STAT3, HSP90, NF-KB, Ku70, Ku86, Rad51 ou EGFR [70]. C'est sur cette base que des inhibiteurs de HDAC ont été développés et testés ces dernières années. Le vorinostat et d'autres HDACi ont donné des résultats prometteurs dans divers type de tumeurs in vitro et in vivo [71]. Des essais de phase I associant inhibiteurs d'HDACs et irradiation du site métastatique sont en cours, en particulier dans les métastases osseuses des carcinomes bronchiques non à petites cellules.

3.5. *Inhibiteurs de heat shock protein 90 (HSP90)*

La «*heat shock protein* 90» (HSP90) est une protéine chaperonne impliquée dans le repli, l'activation et la dégradation de nombreuses protéines comme Akt, HER2, Bcr-Abl, c-Kit, EGFR ou le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR)-α (Fig. 3) [72]. Une étude récente a montré pour la première fois que la majoration radio-induite de l'activité de HSP90 jouait un rôle clé dans l'augmentation de la concentration de VEGF et de facteur inductible par l'hypoxie (HIF)-1α, qui favorisent la survie cellulaire et le potentiel angiogénique [73]. L'irradiation augmente la concentration de HIF-1α dans différentes cellules de cancer bronchique radiorésistantes par deux mécanismes : l'activation de PI3 K/Akt/mTOR (qui stimule la synthèse de novo d'HIF-1α) et l'augmentation de l'activité d'HSP90 (qui conduit à la stabilisation d'HIF-1α). De ce fait les agents bloquant la voie PI3 K/Akt/mTOR ainsi que la fonction de HSP90 sont d'excellents candidats pour reverser la radiorésistance tumorale en réduisant l'expression de VEGF et la concentration d'HIF-1α, ce qui pourrait inhiber la survie et le potentiel angiogénique des cellules tumorales pulmonaires [44]. L'inhibiteur de HSP90 dont le développement est le plus avancé dans le cancer bronchique est la geldanamycin, dont la toxicité semble acceptables [74].

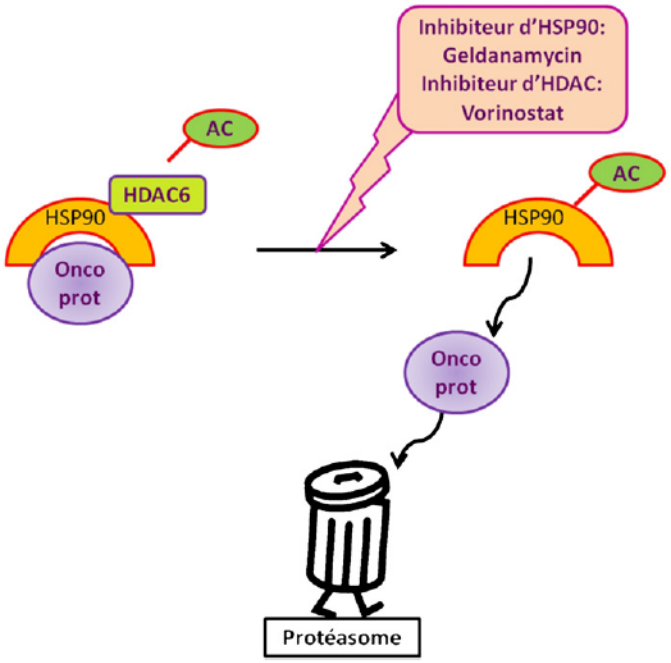


Fig. 3. Interaction entre les inhibiteurs de « heat shock protein 90 » (HSP90), les inhibiteurs d'histone désacétylase (HDAC) et HSP90. HSP90 est une protéine chaperonne qui protège de nombreuses protéines issues d'oncogènes (Akt, HER2, Bcr-Abl, c-KIT, EGFR. . .) de la dégradation par le protéasome. La fonction d'HSP90 peut être inhibée par acétylation sur un résidu lysine. Le traitement par un inhibiteur d'HDAC bloque l'activité HDAC6, HSP90 est alors hyperacétylée et la protéine cliente est dégradée par le protéasome. Les inhibiteurs de HSP90 (comme la geldanamycine) provoquent le même phénomène.

3.6. *Inhibiteurs des Aurora kinases*

La famille de protéines kinases serine/thréonine humaines Aurora comporte trois membres qui agissent de concert avec de nombreuses autres protéines pour contrôler la ségrégation et l'assemblage des chromosomes lors de la mitose [75]. Les kinases Aurora sont exprimées dans de nombreux types tumoraux [76,77]. Aurora A est nécessaire à la bonne séparation des chromosomes après la formation du fuseau mitotique. Aurora A est aussi impliquée dans l'organisation et l'alignement des chromosomes lors de la prométaphase. En l'absence d'Aurora A, le fuseau mitotique ne se sépare pas [78]. Aurora B est également impliqué dans la ségrégation chromosomique. De nombreuses tumeurs expriment fortement Aurora B en parallèle d'Aurora A. Leur concentration est corrélée avec une instabilité génétique accrue ainsi qu'un pronostic clinique moins favorable [79]. De nombreuses petites molécules inhibitrices d'Aurora sont en cours d'essais précliniques [80,81]. Les effets de la combinaison irradiation et inhibiteurs d'Aurora A sont encore peu connus. Tao et al. ont évalué l'effet d'un inhibiteur d'Aurora A, le PHA680632, en association à l'irradiation in vitro et in vivo [82]. In vivo, des expériences de retard de croissance tumorale sur xénogreffes de cellules HCT116 $P53^{-/-}$ sur souris nude ont montré un effet additif mais non supra-additif de radiosensibilisation [82]. L'AZD1152 est un inhibiteur d'Aurora B qui est une pro-substance de la quinazoline dont le métabolite actif plasmatique (l'AZD1152-HQPA) a une forte affinité pour Aurora B et C. In vitro, l'association de l'AZD1152 et d'irradiation a un effet additif. Cet effet antitumoral est plus marqué dans les cellules p53 déficientes. In vivo, des études de xénogreffes ont confirmé cet effet additif, qui est ici encore plus marqué sur les cellules HCT116$p53^{-/-}$ et les xénogreffes de cellules p53 mutées [83]. Il semble donc intéressant de poursuivre le développement clinique de l'AZD1152, en particulier pour les tumeurs P53 déficientes.

4. Vaccination antitumorale

Ces dernières années d'importantes données ont été publiées concernant la capacité du système immunitaire à éradiquer des cellules cancéreuses. L'identification d'antigènes associés aux tumeurs a ouvert de nombreuses pistes thérapeutiques en immunothérapie anti tumorale avec le développement de vaccins thérapeutiques. L'un des points cruciaux en immunologie tumorale est de comprendre comment est générée la réponse immune à un antigène spécifique car les cellules tumorales utilisent différents mécanismes pour échapper au système immunitaire. En effet, la tumeur provient de l'hôte lui-même et est donc faiblement immunogène. De plus, les cellules tumorales peuvent réguler négativement l'expression d'antigènes, diminuer l'expression du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I, interagir avec les cellules présentatrices d'antigène et secréter des cytokines qui favorisent la tolérance immunitaire et l'immunosuppression [84,85]. Plusieurs vaccins thérapeutiques ont été testés dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules localisés et évolués. Les résultats les plus prometteurs concernent les traitements adjuvants des cancers localement évolués. Le L-BLP25 est un vaccin liposomal ciblant la partie extracellulaire de MUC-1. Muc-1 est une protéine exprimée à la surface apicale des cellules normales muco-secrétantes pulmonaires. Dans les tissus tumoraux, MUC-1 est associée à une apoptose réduite, une immunosupression, une chimiorésistance et un pronostic défavorable [86]. Un essai randomisé de phase IIB dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules de stade IIIB et IV chez les patients en situation de réponse ou de stabilité après une première ligne de traitement a comparé le L-BLP25 et des soins de support. Il n'a pas été rapporté de différence significative de survie globale mais l'analyse de sous-groupes à montré pour les patients atteints de cancer de stade IIIB une durée médiane de survie globale de 30,6 mois contre 13,3 mois ($p = 0{,}09$) avec le vaccin [86]. À partir de ces données, l'essai de phase III Stimulating Targeted Antigenic Responses to Non-Small Cell Lung Cancer (START) évaluant le L-BLP25 contre un placebo après une chimioradiothérapie dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules de stades IIIA et IIIB a été débuté et prévoit l'inclusion de 1322 patients. L'effet de ces immunothérapies anti-tumorales en concomitance de la radiothérapie reste à ce jour très peu étudié mais pourrait constituer une piste thérapeutique d'avenir.

5. Cellules souche cancéreuses pulmonaires et radiothérapie

Des données récentes soutiennent l'hypothèse selon laquelle les cellules souche cancéreuses constituent une sous-population relativement rare de cellules au sein de la tumeur qui auraient la capacité d'initier et de perpétuer la prolifération tumorale [87]. Le modèle des cellules souche cancéreuses est basé sur le fait que la tumeur est constituée de cellules fonctionnellement hétérogènes et que seules les cellules souche cancéreuses ont la capacité de proliférer indéfiniment et de former de nouvelles tumeurs ad integrum, dans toute leur hétérogénéité phénotypique [88,89]. Les cellules souche cancéreuses ont été identifiées et isolées dans différentes tumeurs solides comme les carcinomes bronchopulmonaires [90–95]. Les cellules souche cancéreuses partagent de nombreuses caractéristiques des cellules souche embryonnaires et somatiques comme les capacités d'auto-renouvellement et de différenciation multipotente [96,97]. Plusieurs études suggèrent une résistance intrinsèque des cellules souche cancéreuses à la chimiothérapie ainsi qu'à la radiothérapie. La fraction survivante de cellules cancéreuses après chimiothérapie ou radiothérapie est faible et pourrait contenir des cellules souche cancéreuses. Ces cellules résiduelles pourraient être responsables de récidives. Ces cellules doivent donc être éradiquées pour permettre une survie sans récidive à long terme [98]. Des traitements associant des drogues cytotoxiques et des thérapies ciblées sont probablement nécessaires pour supprimer toutes les cellules cancéreuses [87]. Les populations de cellules souche non tumorales sont regroupées en niches, définies comme des régions spécifiques régulant la participation de ces cellules au renouvellement tissulaire, à sa maintenance et à sa réparation [99]. La dépendance des cellules souche vis-à-vis de leur niche limite leur expansion. Les cellules souche cancéreuses pourraient provenir de cellules souche non tumorales mutées capables d'échapper au contrôle de leur niche [100]. In vivo, le microenvironnement peut avoir un effet de régulation positive ou négative de la radiosensibilité extrinsèque de ces cellules souche cancéreuses. Ainsi, si les cellules souche cancéreuses sont situées dans des régions hypoxiques, le taux d'espèces réactives de l'oxygène produites sous l'effet de l'irradiation sera plus faible conduisant à moins de dommages sur l'ADN et donc une moindre radiosensibilité. Des études complémentaires permettant de préciser la distribution des cellules souche cancéreuses au sein de la tumeur, leur regroupement en niche ou au contraire leur répartition homogène, pourraient avoir un impact majeur sur la stratégie balistique et dosimétrique en radiothérapie. En effet, le développement de techniques d'imagerie fonctionnelle et moléculaire pourrait permettre d'identifier et de localiser les cellules souche cancéreuses afin d'optimiser leur irradiation par des technique de « dose-painting » de haute précision [98].

6. Conclusion

En dépit des nombreuses stratégies thérapeutiques testées ces dernières années, les carcinomes bronchiques non à petites cellules localement évolués gardent un pronostic sombre. La chimioradiothérapie concomitante à base de platine reste le traitement standard. Les récidives locales et à distance sont cependant nombreuses. Il est donc impératif de développer de nouvelles modalités thérapeutiques permettant d'accroître non seulement le contrôle général de la maladie mais également son contrôle local. Il semble donc fondamental d'associer des thérapies ciblées potentiellement radiosensibilisantes à la radiothérapie ou à la chimioradiothérapie. L'une des voies les plus prometteuses est celle de l'inhibition de la voie de l'EGFR. Toutefois certains résultats cliniques décevants montrent qu'il faut probablement mieux cibler les populations pouvant tirer bénéfice de tels traitements. Les antiangiogéniques constituent la seconde piste la plus étudiée à l'heure actuelle. Ces agents peuvent réduire la densité vasculaire tumorale tout en augmentant l'oxygénation tumorale ce qui pourrait potentialiser l'effet de la radiothérapie. De plus amples études sont nécessaires pour valider ces concepts, préciser l'efficacité et les schémas optimaux d'administration de ces nouvelles drogues explorer de nouvelles voies prometteuses.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. CA Cancer J Clin 2009;59:225–49.
[2] Bossard N, Velten M, Remontet L, Belot A, Maarouf N, Bouvier AM, et al. Survival of cancer patients in France : a population-based study from The Association of the French Cancer Registries (FRANCIM). Eur J Cancer 2007;43:149–60.
[3] Rami-Porta R, Crowley JJ, Goldstraw P. The revised TNM staging system for lung cancer. Ann Thorac Cardiovasc Surg 2009;15:4–9.
[4] Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. BMJ 1995;311:899–909.

[5] Jett JR, Schild SE, Keith RL, Kesler KA. Treatment of non-small cell lung cancer, stage IIIB: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). Chest 2007;132:266S–76S.
[6] Blackstock AW, Govindan R. Definitive chemoradiation for the treatment of locally advanced non small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2007;25:4146–52.
[7] Zatloukal P, Petruzelka L, Zemanova M, Havel L, Janku F, Judas L, et al. Concurrent versus sequential chemoradiotherapy with cisplatin and vinorelbine in locally advanced non-small cell lung cancer: a randomized study. Lung Cancer 2004;46:87–98.
[8] Huber RM, Flentje M, Schmidt M, Pollinger B, Gosse H, Willner J, et al. Simultaneous chemoradiotherapy compared with radiotherapy alone after induction chemotherapy in inoperable stage IIIA or IIIB non-small-cell lung cancer: study CTRT99/97 by the Bronchial Carcinoma Therapy Group. J Clin Oncol 2006;24:4397–404.
[9] Clamon G, Herndon J, Cooper R, Chang AY, Rosenman J, Green MR. Radiosensitization with carboplatin for patients with unresectable stage III non-small-cell lung cancer: a phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B and the Eastern Cooperative Oncology Group. J Clin Oncol 1999;17:4–11.
[10] Fournel P, Robinet G, Thomas P, Souquet PJ, Lena H, Vergnenegre A, et al. Randomized phase III trial of sequential chemoradiotherapy compared with concurrent chemoradiotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer: Groupe Lyon-Saint-Étienne d'Oncologie Thoracique-Groupe Français de Pneumo-Cancérologie NPC 95-01 Study. J Clin Oncol 2005;23:5910–7.
[11] Furuse K, Fukuoka M, Kawahara M, Nishikawa H, Takada Y, Kudoh S, et al. Phase III study of concurrent versus sequential thoracic radiotherapy in combination with mitomycin, vindesine, and cisplatin in unresectable stage III non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 1999;17:2692–9.
[12] Auperin A, Le Péchoux C, Rolland E, Curran WJ, Furuse K, Fournel P, et al. Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol;28:2181–90.
[13] Chargari C, Deutsch É, Le Péchoux C, Magné N. État des lieux des associations chimioradiothérapeutiques et place potentielle des thérapies ciblées dans les cancers bronchiques non à petites cellules. Cancer Radiother 2009;13:114–22.
[14] Leignel Argo D, Giraud P. Cancer bronchique non à petites cellules. Cancer Radiother 2010;14(Suppl. 1):S61–73.
[15] Belani CP, Choy H, Bonomi P, Scott C, Travis P, Haluschak J, et al. Combined chemoradiotherapy regimens of paclitaxel and carboplatin for locally advanced non-small-cell lung cancer: a randomized phase II locally advanced multi-modality protocol. J Clin Oncol 2005;23:5883–91.
[16] Gandara DR, Chansky K, Albain KS, Leigh BR, Gaspar LE, Lara PN, et al. Consolidation docetaxel after concurrent chemoradiotherapy in stage IIIB non-small-cell lung cancer: phase II Southwest Oncology Group Study S9504. J Clin Oncol 2003;21:2004–10.
[17] Vokes EE, Senan S, Treat JA, Iscoe NA. PROCLAIM: A phase III study of pemetrexed, cisplatin, and radiation therapy followed by consolidation pemetrexed versus etoposide, cisplatin, and radiation therapy followed by consolidation cytotoxic chemotherapy of choice in locally advanced stage III non-small-cell lung cancer of other than predominantly squamous cell histology. Clin Lung Cancer 2009;10:193–8.
[18] Ritter CA, Arteaga CL. The epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase: a promising therapeutic target in solid tumors. Semin Oncol 2003;30: 3–11.
[19] Fontanini G, De Laurentiis M, Vignati S, Chine S, Lucchi M, Silvestri V, et al. Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors and receptors and of neoangiogenesis in completely resected stage I-IIIA non-small-cell lung cancer: amphiregulin and microvessel count are independent prognostic indicators of survival. Clin Cancer Res 1998;4:241–9.
[20] Rusch V, Klimstra D, Venkatraman E, Pisters PW, Langenfeld J, Dmitrovsky E. Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression. Clin Cancer Res 1997;3:515–22.
[21] Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. Crit Rev Oncol Hematol 1995;19:183–232.
[22] Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 2005;353:123–32.
[23] Bezjak A, Tu D, Seymour L, Clark G, Trajkovic A, Zukin M, et al. Symptom improvement in lung cancer patients treated with erlotinib: quality of life analysis of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. J Clin Oncol 2006;24:3831–7.
[24] Clark GM, Zborowski DM, Santabarbara P, Ding K, Whitehead M, Seymour L, et al. Smoking history and epidermal growth factor receptor expression as predictors of survival benefit from erlotinib for patients with non-small-cell lung cancer in the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group study BR.21. Clin Lung Cancer 2006;7:389–94.
[25] Cappuzzo F, Ciuleanu T, Stelmakh L, Cicenas S, Szczesna A, Juhasz E, et al. Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study. Lancet Oncol;11:521–9.
[26] Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. N Engl J Med 2009;361:958–67.
[27] Choong NW, Mauer AM, Haraf DJ, Lester E, Hoffman PC, Kozloff M, et al. Phase I trial of erlotinib-based multimodality therapy for inoperable stage III non-small cell lung cancer. J Thorac Oncol 2008;3:1003–11.
[28] Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. N Engl J Med 2009;361:947–57.
[29] Stinchcombe TE, Morris DE, Lee CB, Moore DT, Hayes DN, Halle JS, et al. Induction chemotherapy with carboplatin, irinotecan, and paclitaxel followed by high dose three-dimension conformal thoracic radiotherapy (74 Gy) with concurrent carboplatin, paclitaxel, and gefitinib in unresectable stage IIIA and stage IIIB non-small cell lung cancer. J Thorac Oncol 2008;3:250–7.
[30] Kelly K, Chansky K, Gaspar LE, Albain KS, Jett J, Ung YC, et al. Phase III trial of maintenance gefitinib or placebo after concurrent chemoradiotherapy and docetaxel consolidation in inoperable stage III non-small-cell lung cancer: SWOG S0023. J Clin Oncol 2008;26:2450–6.
[31] Keedy VL, Arteaga CL, Johnson DH. Does gefitinib shorten lung cancer survival? Chaos redux. J Clin Oncol 2008;26:2428–30.
[32] Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, Goddard AD, Heldens SL, Herbst RS, et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. J Clin Oncol 2005;23:5900–9.
[33] Ready N, Janne PA, Bogart J, Dipetrillo T, Garst J, Graziano S, et al. Chemoradiotherapy and gefitinib in stage III non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor and KRAS mutation analysis: cancer and leukemia group B (CALEB) 30106, a CALGB-stratified phase II trial. J Thorac Oncol 2010;5:1382–90.
[34] Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, Ferguson KM. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. Cancer Cell 2005;7:301–11.
[35] Mendelsohn J. Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. Clin Cancer Res 1997;3:2703–7.
[36] Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. Clin Cancer Res 1995;1:1311–8.
[37] Raben D, Helfrich B, Chan DC, Ciardiello F, Zhao L, Franklin W, et al. The effects of cetuximab alone and in combination with radiation and/or chemotherapy in lung cancer. Clin Cancer Res 2005;11:795–805.
[38] Pirker R, Pereira JR, Szczesna A, von Pawel J, Krzakowski M, Ramlau R, et al. Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. Lancet 2009;373:1525–31.
[39] Akimoto T, Hunter NR, Buchmiller L, Mason K, Ang KK, Milas L. Inverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas. Clin Cancer Res 1999;5:2884–90.
[40] Huang SM, Harari PM. Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. Clin Cancer Res 2000;6:2166–74.
[41] Govindan R, Bogart J, Stinchcombe T, Wang X, Hodgson L, Kratzke R, et al. Randomized Phase II study of pemetrexed, carboplatin, and thoracic radiation with or without cetuximab in patients with locally advanced unresectable non-small-cell lung cancer: Cancer and Leukemia Group B Trial 30407. J Clin Oncol 2011; doi:10.1200/JCO.2010.33.4979.
[42] Blumenschein Jr GR, Paulus R, Curran WJ, Robert F, Fossella F, Werner-Wasik M, et al. Phase II study of cetuximab in combination with chemoradiation in patients with Stage IIIA/B non-small-cell lung cancer: RTOG 0324. J Clin Oncol 2011;29:2312–8.
[43] Sacco PC, Maione P, Rossi A, Bareschino MA, Schettino C, Guida C, et al. Combination of radiotherapy and targeted therapies in the treatment of locally advanced non-small cell lung cancer. Target Oncol. 2011; doi:10.1007/s11523-011-0169-6.
[44] Provencio M, Sánchez A, Garrido P, Valcárcel F. New molecular targeted therapies integrated with radiation therapy in lung cancer. Clin Lung Cancer 2010;11:91–7.
[45] Herbst RS, Onn A, Sandler A. Angiogenesis and lung cancer: prognostic and therapeutic implications. J Clin Oncol 2005;23:3243–56.
[46] Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. J Clin Oncol 2005;23:1011–27.
[47] Jain RK, Duda DG, Clark JW, Loeffler JS. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. Nat Clin Pract Oncol 2006;3:24–40.
[48] Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. Nat Rev Cancer 2002;2:727–39.
[49] Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 2006;355:2542–50.
[50] Reck M, von Pawel J, Zatloukal P, Ramlau R, Gorbounova V, Hirsh V, et al. Overall survival with cisplatin-gemcitabine and bevacizumab or placebo as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: results from a randomised phase III trial (AVAiL). Ann Oncol 2010;21:1804–9.
[51] O'Reilly MS. Radiation combined with antiangiogenic and antivascular agents. Semin Radiat Oncol 2006;16:45–50.
[52] Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, Lyden D, Rafii S, Haimovitz-Friedman A, et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. Science 2003;300:1155–9.

[53] Vaupel P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. Semin Radiat Oncol 2004;14:198–206.
[54] Lee CG, Heijn M, di Tomaso E, Griffon-Etienne G, Ancukiewicz M, Koike C, et al. Anti-Vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. Cancer Res 2000;60:5565–70.
[55] Abdollahi A, Lipson KE, Han X, Krempien R, Trinh T, Weber KJ, et al. SU5416 and SU6668 attenuate the angiogenic effects of radiation-induced tumor cell growth factor production and amplify the direct anti-endothelial action of radiation in vitro. Cancer Res 2003;63:3755–63.
[56] Shibuya K, Komaki R, Shintani T, Itasaka S, Ryan A, Jurgensmeier JM, et al. Targeted therapy against VEGFR and EGFR with ZD6474 enhances the therapeutic efficacy of irradiation in an orthotopic model of human non-small-cell lung cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2007;69:1534–43.
[57] Spigel DR, Hainsworth JD, Yardley DA, Raefsky E, Patton J, Peacock N, et al. Tracheoesophageal fistula formation in patients with lung cancer treated with chemoradiation and bevacizumab. J Clin Oncol 2010;28:43–8.
[58] Socinski MA, Halle JS ST. Incorporation of bevacizumab and erlotinib with induction and concurrent carboplatin/paclitaxel and 74 Gy of thoracic radiotherapy in stage III non-small cell lung cancer. J Clin Oncol 2009;27:7528 [abstract].
[59] Huber PE, Bischof M, Jenne J, Heiland S, Peschke P, Saffrich R, et al. Trimodal cancer treatment: beneficial effects of combined antiangiogenesis, radiation, and chemotherapy. Cancer Res 2005;65:3643–55.
[60] Citrin D, Menard C, Camphausen K. Combining radiotherapy angiogenesis inhibitors: clinical trial design. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2006;64:15–25.
[61] Hennequin C. Les thérapeutiques ciblées en association avec la radiothérapie dans le cancer bronchique. Cancer Radiother 2007;11:77–83.
[62] Toulany M, Kasten-Pisula U, Brammer I, Wang S, Chen J, Dittmann K, et al. Blockage of epidermal growth factor receptor-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling increases radiosensitivity of K-*ras* mutated human tumor cells in vitro by affecting DNA repair. Clin Cancer Res 2006;12:4119–26.
[63] Meric-Bernstam F, Gonzalez-Angulo AM. Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. J Clin Oncol 2009;27:2278–87.
[64] Choi EJ, Ryu YK, Kim SY, Wu HG, Kim JS, Kim IH, et al. Targeting epidermal growth factor receptor-associated signaling pathways in non-small cell lung cancer cells: implication in radiation response. Mol Cancer Res 2010;8:1027–36.
[65] Kim IA, Bae SS, Fernandes A, Wu J, Muschel RJ, McKenna WG, et al. Selective inhibition of Ras, phosphoinositide 3 kinase, and Akt isoforms increases the radiosensitivity of human carcinoma cell lines. Cancer Res 2005;65:7902–10.
[66] Huang S, Houghton PJ. Targeting mTOR signaling for cancer therapy. Curr Opin Pharmacol 2003;3:371–7.
[67] Inoki K, Corradetti MN, Guan KL. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. Nat Genet 2005;37:19–24.
[68] Manegold PC, Paringer C, Kulka U, Krimmel K, Eichhorn ME, Wilkowski R, et al. Antiangiogenic therapy with mammalian target of rapamycin inhibitor RAD001 (Everolimus) increases radiosensitivity in solid cancer. Clin Cancer Res 2008;14:892–900.
[69] Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. Cell 2007;128:683–92.
[70] Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. Nat Rev Drug Discov 2002;1:287–99.
[71] Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. Nat Rev Cancer 2006;6:38–51.
[72] Neckers L, Kern A, Tsutsumi S. Hsp90 inhibitors disrupt mitochondrial homeostasis in cancer cells. Chem Biol 2007;14:1204–6.
[73] Kim WY, Oh SH, Woo JK, Hong WK, Lee HY. Targeting heat shock protein 90 overrides the resistance of lung cancer cells by blocking radiation-induced stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha. Cancer Res 2009;69:1624–32.
[74] Shimamura T, Shapiro GI. Heat shock protein 90 inhibition in lung cancer. J Thorac Oncol 2008;3:S152–9.
[75] Teicher BA. Newer cytotoxic agents: attacking cancer broadly. Clin Cancer Res 2008;14:1610–7.
[76] Gautschi O, Heighway J, Mack PC, Purnell PR, Lara Jr PN, Gandara DR. Aurora kinases as anticancer drug targets. Clin Cancer Res 2008;14:1639–48.
[77] Lapenna S, Giordano A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. Nat Rev Drug Discov 2009;8:547–66.
[78] Mora-Bermudez F, Gerlich D, Ellenberg J. Maximal chromosome compaction occurs by axial shortening in anaphase and depends on Aurora kinase. Nat Cell Biol 2007;9:822–31.
[79] Guan Z, Wang XR, Zhu XF, Huang XF, Xu J, Wang LH, et al. Aurora-A, a negative prognostic marker, increases migration and decreases radiosensitivity in cancer cells. Cancer Res 2007;67:10436–44.
[80] Harrington EA, Bebbington D, Moore J, Rasmussen RK, Ajose-Adeogun AO, Nakayama T, et al. VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. Nat Med 2004;10:262–7.
[81] Soncini C, Carpinelli P, Gianellini L, Fancelli D, Vianello P, Rusconi L, et al. PHA-680632, a novel Aurora kinase inhibitor with potent antitumoral activity. Clin Cancer Res 2006;12:4080–9.
[82] Tao Y, Zhang P, Frascogna V, Lecluse Y, Auperin A, Bourhis J, et al. Enhancement of radiation response by inhibition of Aurora-A kinase using siRNA or a selective Aurora kinase inhibitor PHA680632 in p53-deficient cancer cells. Br J Cancer 2007;97:1664–72.
[83] Tao Y, Zhang P, Girdler F, Frascogna V, Castedo M, Bourhis J, et al. Enhancement of radiation response in p53-deficient cancer cells by the Aurora-B kinase inhibitor AZD1152. Oncogene 2008;27:3244–55.
[84] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature 1998;392:245–52.
[85] Ribas A, Butterfield LH, Glaspy JA, Economou JS. Current developments in cancer vaccines and cellular immunotherapy. J Clin Oncol 2003;21:2415–32.
[86] Vlad AM, Kettel JC, Alajez NM, Carlos CA, Finn OJ. MUC1 immunobiology: from discovery to clinical applications. Adv Immunol 2004;82:249–93.
[87] Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. Nat Rev Cancer 2008;8:755–68.
[88] Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea–a paradigm shift. Cancer Res 2006;66:1883–90, discussion 1895–1886.
[89] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature 2001;414:105–11.
[90] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:3983–8.
[91] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. Nature 2004;432:396–401.
[92] Collins AT, Maitland NJ. Prostate cancer stem cells. Eur J Cancer 2006;42:1213–8.
[93] Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. Cell Stem Cell 2007;1:313–23.
[94] Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. Nature 2007;445:111–5.
[95] Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. Cell Death Differ 2008;15:504–14.
[96] Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. N Engl J Med 2006;355:1253–61.
[97] Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. Annu Rev Cell Dev Biol 2007;23:675–99.
[98] Rivera S, Rivera C, Loriot Y, Hennequin C, Vozenin MC, Deutsch É. Cellules souches cancéreuses : nouvelle cible thérapeutique dans le traitement des cancers bronchopulmonaires. Cancer Radiother 2011; doi:10.1016/j.canrad.2011.03.003.
[99] Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. Nature 2006;441:1075–9.
[100] Zhu X, Zhou X, Lewis MT, Xia L, Wong S. Cancer stem cell, niche and EGFR decide tumor development and treatment response: a bio-computational simulation study. J Theor Biol 2010;269:138–49.

- **“Lung Cancer Stem Cell : New Insights on Experimental Models and Preclinical Data”**

Hindawi Publishing Corporation
Journal of Oncology
Volume 2011, Article ID 549181, 10 pages
doi:10.1155/2011/549181

Review Article

Lung Cancer Stem Cell: New Insights on Experimental Models and Preclinical Data

Caroline Rivera, Sofia Rivera, Yohann Loriot, Marie-Catherine Vozenin, and Eric Deutsch

Laboratoire UPRES EA 27-10 "Radiosensibilité des Tumeurs et Tissus Sains", Institut Gustave Roussy, 39 rue Camille Desmoulins, 94800 Villejuif, France

Correspondence should be addressed to Marie-Catherine Vozenin, marie-catherine.vozenin@igr.fr

Received 1 October 2010; Accepted 15 November 2010

Academic Editor: Bo Lu

Copyright © 2011 Caroline Rivera et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Lung cancer remains the leading cause of cancer death. Understanding lung tumors physiopathology should provide opportunity to prevent tumor development or/and improve their therapeutic management. Cancer stem cell (CSC) theory refers to a subpopulation of cancer cells, also named tumor-initiating cells, that can drive cancer development. Cells presenting these characteristics have been identified and isolated from lung cancer. Exploring cell markers and signaling pathways specific to lung CSCs may lead to progress in therapy and improve the prognosis of patients with lung cancer. Continuous efforts in developing *in vitro* and *in vivo* models may yield reliable tools to better understand CSC abilities and to test new therapeutic targets. Preclinical data on putative CSC targets are emerging by now. These preliminary studies are critical for the next generation of lung cancer therapies.

1. Introduction

Despite important improvements in therapies over the last decades, lung cancer prognosis remains very poor. After apparent successful initial therapy, development of secondary tumors often leads to a lethal relapse. Substantial growing experimental evidence has suggested that many cancers, including lung cancer, may be driven by a small subpopulation of self-renewing cells that could sustain malignant growth [1]. Innovative therapy could target this specific population of "cancer stem cells" (CSCs) or "tumor-initiating cells" in order to improve patients' outcome, with complete eradication of tumor growth. This review summarizes what is known about lung CSCs and focuses on potential clinical implications based on preclinical data obtained through new *in vitro* and *in vivo* models.

2. Cancer Stem Cells

Two major models have been described for tumor propagation: the clonal evolution model, involving a stochastic component, and the CSC model defined as hierarchical. According to the clonal evolution model, neoplasm arise from a single cell of origin, and tumor progression results from acquired genetic variability within the original clone allowing sequential selection of more aggressive sublines [2]. CSC model sustains that tumor cells are heterogeneous and only the CSC subset has the ability to proliferate extensively and form new tumors [1, 3]. These models are not mutually exclusive [4]. Recent data provide support for the CSC hypothesis, which suggests that a relatively rare subpopulation of tumor cells have the unique ability to initiate and perpetuate tumor growth [5]. CSCs have been identified and isolated in various malignancies including solid tumors [6–10] such as lung cancer [11]. These cells can be defined as cancer cells that specifically possess the ability to give rise to all cell types found in a particular cancer sample. CSCs share various characteristics with embryonic and somatic stem cells including self-renewal and multipotent differentiation [12, 13]. Self-renewal is defined as the ability to go through unlimited cycles of cell division while maintaining the undifferentiated state. Stem cells are characterized by the capacity to renew themselves through mitotic cell division and differentiate into a diverse range of specialized cell

types. Indeed, self-renewal, which drives tumorigenesis, and differentiation albeit aberrant that contributes to cellular heterogeneity of the tumor, are considered the key properties of the CSC.

Stem cell populations are established in niches, which are defined as specific locations that regulate how these cells participate in tissue regeneration, maintenance, and repair [14]. The stem cell niche represents the microenvironment that interacts with stem cells to regulate stem cell self-renewal and differentiation. The dependence of normal stem cells on the niche limits their expansion. CSCs might arise from normal stem cells that have acquired mutations that enable them to escape from niche control [15]. There is increasing evidence of the importance of the tumor and the host microenvironment in conditioning the stem cell status itself [16]. The expansion of the niche cells may be driven by alterations in the CSCs or in the niche cells themselves. In either case, there is an expansion of the self-renewing CSC pool that gives rise to aberrantly differentiated cancer cells, which comprise the bulk of the tumor [17]. Alterations in CSCs may enable them to commandeer alternative niche cells to provide them with self-renewal signals. Vascular niche in brain tumors has been shown to contribute directly to the generation of CSCs and tumor growth [18]. Although some stem cells are perivascular, others may occupy hypoxic niches and be regulated by O_2 gradients [19]. However, the underlying mechanisms remain unclear. O_2 availability may have a direct role in stem cell regulation through HIF-1α modulation of Wnt/β-catenin signaling [20]. If CSCs depend upon aberrant niche microenvironments, then these niches might represent targets for treatments.

Some fundamental characteristics are needed to recognize CSCs. The term CSC is frequently referred to as "cancer initiating cells", since serial transplantation of CSCs into animal models re-establishes part of the phenotypic heterogeneity of the primary tumor [21]. Xenotransplantation in immunocompromised mice, followed by serial transplantation, is now regarded as an essential criterion in defining CSCs. This preponderant characteristic might represent the mechanistic parallel of regenerating a tissue or an organ in normal stem cell. These cells can be grown *in vitro* as tumor spheres under nonadherent conditions [22]. Self-renewal capacity also has to be documented.

CSCs have been shown in *in vitro* models to be highly resistant to radiation [23] and chemotherapy [24], potentially resulting in residual disease that can lead to recurrence. However, radioresistance of CSCs remains controversial. Inconsistent experimental results could be related to difficulty in correctly isolating the CSC subpopulation within a tumor [25]. CSCs may be less vulnerable to treatments because of intrinsic properties of radio and chemoresistance [26]. One hypothesis is that CSCs could be more resistant to DNA damages induced by these treatments [27, 28]. They may have enhanced capacities of DNA repair [29].

The frequency of CSCs appears to be highly variable, reflecting biological diversity among cancer models as well as technical issues. This subpopulation of cells was identified utilizing flow-cytometer-based cell sorting, enabling isolation of a "side population" (SP) defined by Hoechst 33342 dye exclusion [30]. This test is based on ABCG2 transporter, which is the second member of the G subfamily of ATP binding cassette (ABC) transporters. ABCG2 is one of the most important multidrug-resistance transporters and its substrates include Hoeschst 33342 [31]. This transporter is highly expressed in the SP containing stem cells [32]. CSCs are capable of self-renewal and production of differentiated progenitors. Progenitors are engaged in a differentiation pathway that progressively generates the different mature cells. CSCs express tissue-specific cell surface markers, such as CD34 in several kinds of leukemia [33] and CD44 in breast cancer [6]. None of these markers are specific to CSCs: CD34 is expressed by endothelial and hematologic normal cells, while CD44 is expressed by endothelial and mesenchymal cells. CD133 has been observed in a wide spectrum of malignant tumors including lung cancer [11, 34]. The function of CD133 is still unknown. CD133 may have a role in stem cell activation/maintenance [35], and potential regulatory activity of cell-cell contacts [36]. The CSC phenotype may not necessarily be uniform between cancer subtypes or even tumors of the same subtype [37]. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) metabolizes a wide variety of endogenous and exogenous aldehydes [38]. High ALDH activity has been detected in stem and progenitor cells in various lineages [39–41], suggesting that strong ALDH activity and/or antigen expression can be used as a marker for CSC in a variety of cancers, including lung cancer [42].

3. Does the Cancer Stem Cell Concept Remain Disputed?

In the stochastic model, transformation results from a random mutation and subsequent clonal selection. But this model may not be sufficient to fully explain biology of carcinogenesis. The conceptual gap left by this model could be filled in by CSC hypothesis which becomes very attractive in this context. Indeed carcinogenesis involves acquisition and accumulation of genetic mutations and epigenetic regulations that may take many years. Since the normal lung epithelium turns over fairly rapidly, there must be some very long-lived cell type that serves as the repository to safeguard all these accumulating mutations. This can fit with CSC hypothesis and therefore explain both heterogeneity of cancer cells and events of metastasis. This theory may bring fundamental bases for understanding resistance to chemotherapy or radiation treatment, tumor promotion and progression, as well as important clinical implications for detection, prevention, and treatment [3]. However, some controversies still remain [43–45]. Tumor growth may not need to be driven by rare cancer stem cells. Cancer stem cell theory may not be an absolute requisite to explain chemo-radio resistance. This characteristic may be related to multiple drug resistance (mdr) phenotype [46]. Metabolic flexibility may generate adaptive changes in cells of the residual disease that can lead to tumor growth [47] and relapse. Tumor progression and recurrence may be explained by a state of cancer dormancy [48]. CSC may not be a real entity. CSC theory could be the simple transposition

of normal tissue development to cancer. Although the CSC hypothesis still has to be fully validated in lung cancer, its applicability would provide an improvement in our understanding of carcinogenesis.

4. Lung Cancer

Lung cancer is one of the most intractable cancers with a five-year overall survival of around 15% all stages merged. Lung cancer has a poor prognosis, because of extra thoracic dissemination and frequent disease relapse. The main types of lung cancer are small cell lung carcinoma SCLC and nonsmall cell lung carcinoma NSCLC, which includes three major histological types: adenocarcinoma, squamous cell carcinoma (SCC), and large cell carcinoma [49]. About 15% of the tumors are SCLCs and arise in the larger airways, grow rapidly, and have a neuroendocrine component. Adenocarcinomas represent about 40% of NSCLCs and usually start in peripheral lung tissue. SCCs account for 25% and commonly originate near a central bronchus. Large cell carcinomas are believed to derive from neuroendocrine cells and may be observed in combination with other types of NSCLC. These neuroendocrine lung tumors appear to be epithelial tumors characterized by their preferential neuroendocrine differentiation as indicated by neuroendocrines granules, mucin granules, microvilli, and tonofilaments [50].

It is estimated that smoking causes 90% of lung cancers. However, different types of genetic modifications have been described in lung cancer cells such as recurrent chromosome abnormalities [51], upregulation of telomerase activity [52], and mutations of oncogenes or tumor suppressor genes (TP53, RB1, CDKN2A, KRAS, EGFR). Some may be markers of disease progression, others may have a direct role in lung cancer genesis in the context of gene-environment interactions [53]. The link between mutations and stem cellness is an important issue that needs to be explored. It is not clear whether mutations leading to CSCs occur in stem cells or in differentiated cells. These data strongly suggest that a deep knowledge of each tumor should improve patient outcome thanks to personalized therapy.

5. Normal Lung Stem Cells

The respiratory system arises from the ventral foregut endoderm with development of a tree-like system of epithelial tubules and vascular structures, which ultimately gives rise to the mature airways and alveoli. Precise sequence and pattern of branching events lead to highly ramified tubular networks possibly driven by a stereotyped hierarchical and modular branching program [54] which molecular regulation remains under study [55]. Lung mesenchymal development is crucially influenced by signals from the epithelium and the pleura that, in concert, appear to maintain a balance of differentiated and proliferating multipotent progenitors while the lung grows [56]. During lung branching morphogenesis, the transcription factor *Sox2* is associated with the epithelium that is less morphogenetically active. *Sox2* expression is lost at sites where nascent buds arise [57, 58]. As epithelial cells in branching airways continue to differentiate, it is crucial to maintain and expand a pool of uncommitted progenitor cells for continuous growth. It has been proposed that this pool resides in the distal lung, as a population of proliferating immature epithelial cells that expresses high levels of the proto-oncogene *Mycn* [59].

Mature respiratory epithelium consists of multiple cell types. Ciliated, neuroendocrine, and secretory cells are located in the proximal region of the respiratory system. Alveolar type 1 (AT1) and 2 (AT2) cells are typical of the distal alveolar region of the lung (Figure 1). Lineage analysis suggests that progenitor cells lining the trachea and proximal lung have a different origin from those lining the distal region of the lung [60]. The activity of the different pools of progenitor cells account for spatially restricted regional specificities in both proximal and distal cell lineages specifications during lung development and cellular composition of tracheobronchial and bronchiolar airways [61]. Basal cells have been proposed as a multipotent progenitor cell population of bronchial airways. They have the capacity for restoration of a fully differentiated epithelium [62, 63]. Lung CSCs and airway normal stem cells may use common pathways in development.

6. Lung Cancer Stem Cells

Altered composition of airway epithelial cell that is associated with acute or chronic lung injury has the potential to significantly increase risk for developing lung cancer [64, 65]. It is currently unknown whether airway stem cells contribute significantly to normal epithelial maintenance and repair [66]. Clara cells participate in maintenance of both secretory and ciliated cell types after oxidant-mediated damage [67]. Meanwhile a population of pollutant-resistant stem cells localized in the bronchoalveolar duct junction (BADJ) contributes to restoration of a phenotypically diverse epithelium after clara cell depletion [68]. These cells are named bronchoalveolar stem cells (BASCs) (Figure 1). Both pulmonary neuroendocrine cells (PNEC) and Clara cells have been proposed as progenitors for the genesis of SCLC and NSCLC [69]. PNEC are specialized airway epithelial cells that produce specific neuropeptides and that are grouped in clusters termed neuroepithelial bodies (NEBs). Repair from airway injury is associated with PNEC hyperplasia [70]. Cells with Clara-like characteristics but reduced secretory protein expression have been identified in association with preneoplastic lesions [71]. These data suggest that cells engaged in differentiation could reactivate genes of immaturity. In this context, CSCs may arise from restricted progenitors or more differentiated cells that have reacquired self-renewing capacity [5]. This phenomenon could have direct bearing on the issue of stem cell plasticity, which is defined as the ability to cross lineage barriers and adopt cell-differentiated phenotypes [72]. It also may raise a parallel with transdifferentiation from differentiated cell to CSC that leads to cancer cell phenotypic diversification [73]. BASCs at the BADJ of adult airways have been proposed as an initiating cell source for lung adenocarcinoma [74]. Stem cells and

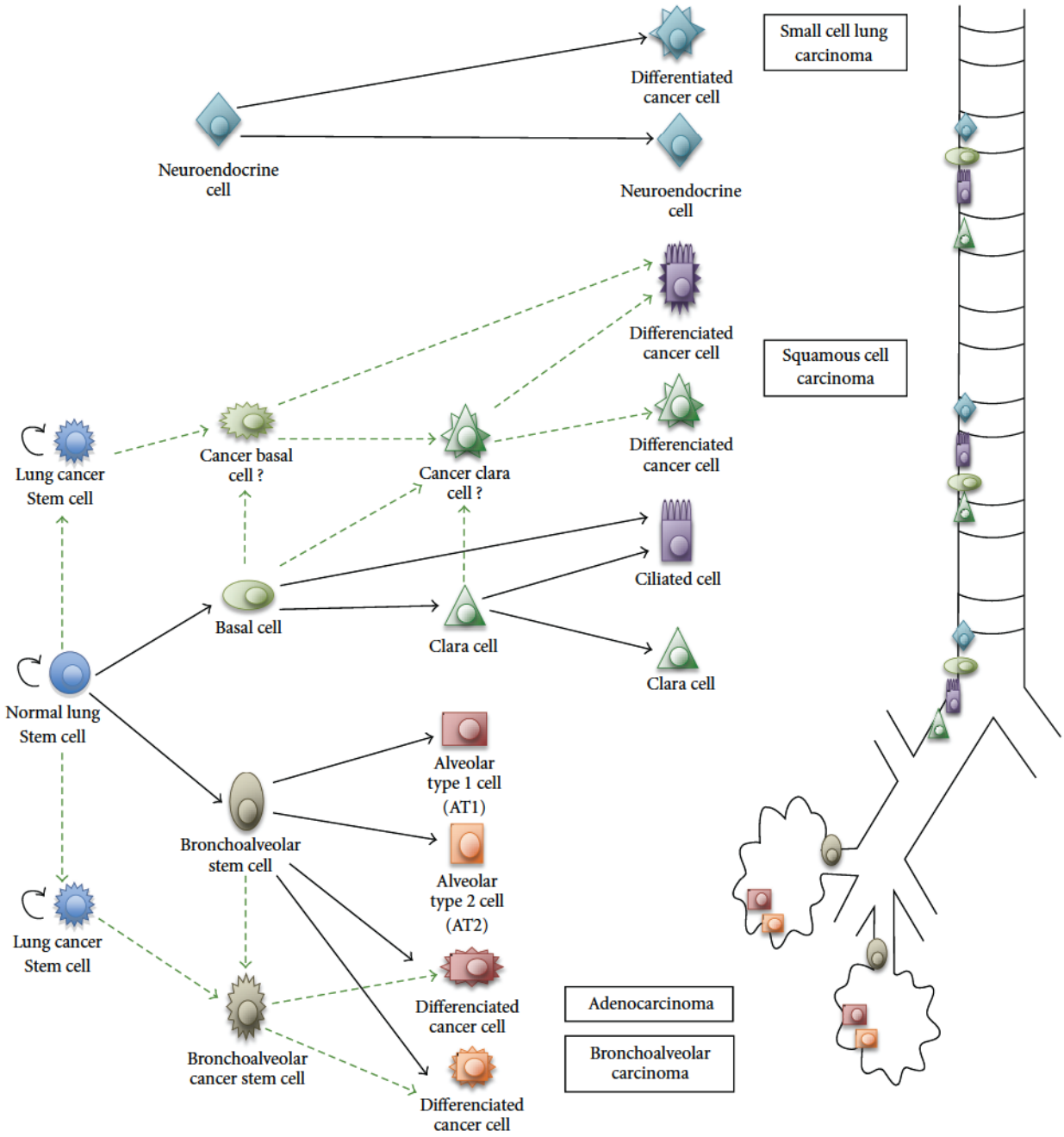


Figure 1: Lung CSCs and progenitors which differentiation leads to heterogeneity of associated human carcinomas. Normal and tumor cellular hierarchy progressively generates progenitor cells and differentiated mature cells in both proximal and distal airways. Hypotheses are represented with discontinuous lines.

progenitors could be considered ideal tumor initiating candidates, because dysregulation of proliferative capacity through mutation may rapidly cause dysplastic tumor-like growth. The deviation from a common endodermic stem cell could also be responsible for the multidirectional differentiation in lung tumors, including neuroendocrine phenotype in NSCLC and squamous or glandular signs of differentiation in authenticated neuroendocrine tumors [75].

Observed phenotypic heterogeneity between distinct tumor types suggests that the tumor's local pulmonary environment deeply impacts the fate of cancer cells [76]. Developmental programs of cells initially engaged in a specific lineage pathway can be altered by changing the type of signals in the local environment [77]. The different lung tumors could arise from regiospecific cancer stem cell niches that are still debated [78, 79].

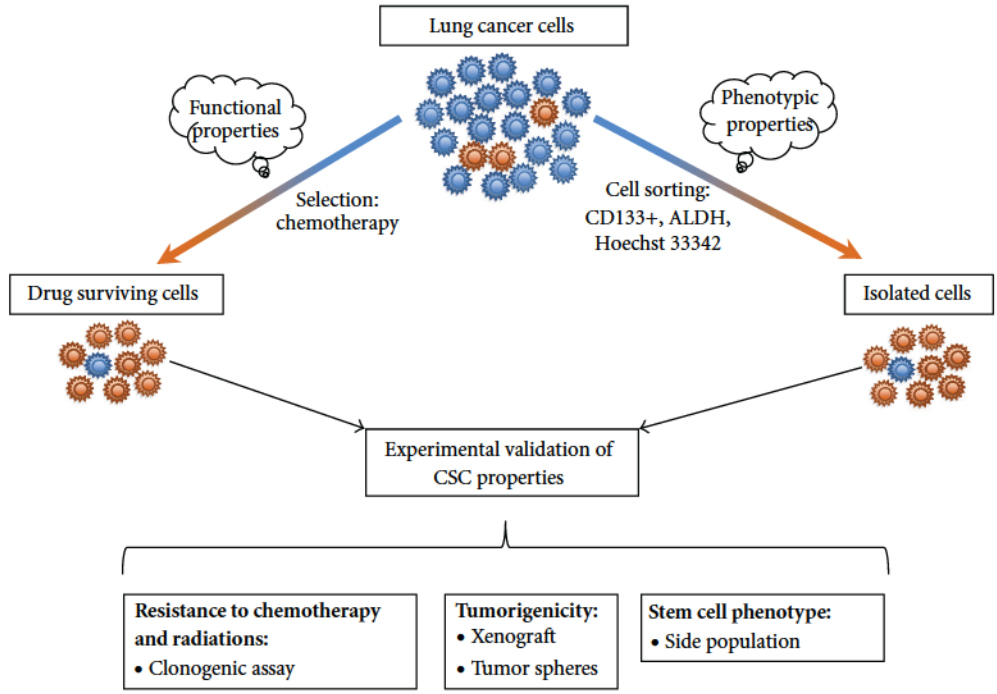


FIGURE 2: *In vitro* models of lung CSCs. Experimental models of lung CSCs are based on the functional properties of chemoresistance of these cells or on their phenotypic characteristics. Populations enriched in CSCs obtained after treatment or cell sorting need to present all the stemcellness properties to be considered as lung CSC models.

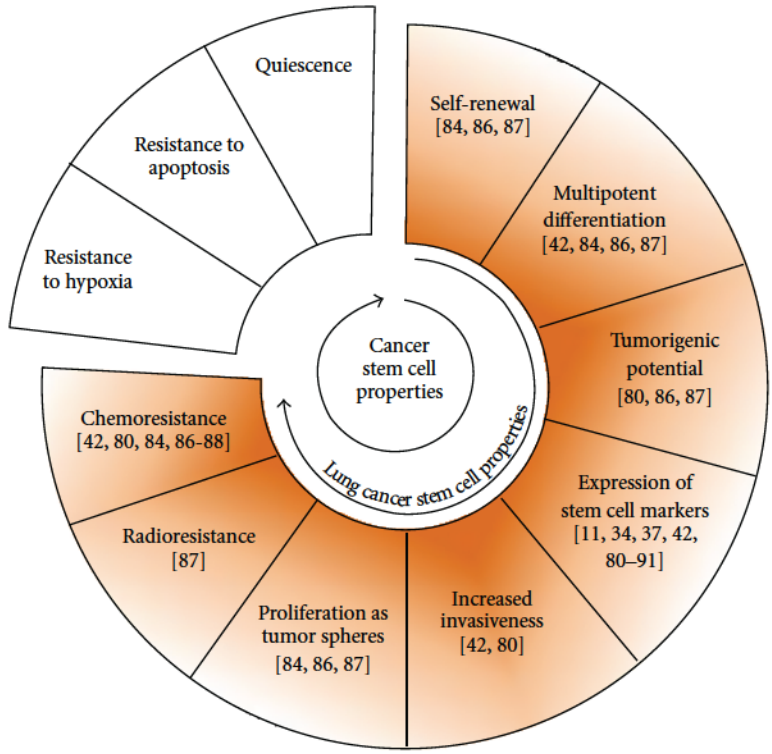


FIGURE 3: CSC and lung CSC properties. CSC characteristics verified on lung CSC models are presented with the references of the corresponding reports.

7. Lung Cancer Stem Cell Models

Tumorigenic human lung cancer cells have been isolated using different approaches from both cell lines and primary tumors. CSC models from lung cancer cell lines are based on the phenotype or on the functional characteristics of these cells (Figure 2). SP has showed repopulating ability and resistance to multiple chemotherapeutic drugs in lung cancer. In addition, human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression is higher in SP, suggesting that this fraction may represent an enriched source of lung tumor initiating cells with unlimited proliferative potential [80–83]. CSCs can be identified and isolated by flow-cytometry-based cell sorting using the cell surface marker CD133 [37] (Figure 2). The lack of early markers for lung progenitors represents a clear gap of knowledge. The known markers are not always ideal to sort for the CSC population [84]. In line with tumor heterogeneity, the phenotype of CSCs is not uniform, underlying the necessity to find more specific single markers or to define new marker combinations to potentially recognize the putative CSCs (Table 1). Isolation of lung CSCs based on increased ALDH activity was obtained using the Aldefluor assay followed by fluorescent-activated cell sorting (FACS) (Figure 2) [42, 85]. The second approach leading to the isolation of lung CSCs was based on their inherent functional resistance to chemotherapy (Figure 2). Drug-surviving cells were isolated after an *in vitro* treatment with cisplatin, doxorubicin, or etoposide. These cells present the phenotypic characteristics previously described [86]. These different CSC models developed on cancer cell lines can be grown *in vitro* as tumor spheres under nonadherent conditions using a serum-free medium that is supplemented with growth factors. They also exhibit high clonogenic potential, capacities for self-renewal, generation of differentiated progeny, and high *in vivo* tumorigenicity (Figure 3).

The first isolation and expansion of lung CSCs from primary patient tumors was based on their ability to survive under serum-free conditions and proliferate as cellular tumor spheres [11]. CD133 cells isolated from primary tumors displayed features of CSCs both *in vitro* and *in vivo* [87, 88]. The expression of CD133 in tumors was linked to shorter progression-free survival in patients treated with platinum-based chemotherapies, but this point remains controversial [88–91].

In vivo limiting dilution consists of injection of decreasing number of cells. This method used for subcutaneous tumor xenograft may prove enrichment of CSCs in an isolated subpopulation of cells [27, 92] (ratio to obtain a tumor from CSCs compared to tumor cells: 1/100). To date, there is no consistent data published on this method in lung CSC models that determine the minimal number of tumor-initiating cells necessary and sufficient to regenerate a tumor.

A few mouse models of lung cancer-initiating cells have been developed [74, 93]. However the frequency of CSCs in these models is highly variable. To date, there is no evidence of a subpopulation isolated from an animal model able to restore the tumor initial heterogeneity in secondary and tertiary hosts [84].

8. Preclinical Data on Lung Cancer Stem Cells

The surviving fraction of tumor cells after chemotherapy is low and may contain CSCs. These cells "left behind" may be responsible for recurrence. These cells need to be eradicated in order to provide long-term disease-free survival. Combinatorial treatments involving both cytotoxic and targeted therapies will probably be required to suppress all cancer cells [5]. Preclinical data on putative CSCs targets are emerging by now.

Oncogenes and tumor-suppressor genes are the 2 types of genes involved in carcinogenesis. Oncogenes are dominant genes [94] whereas tumor suppressor genes are recessive. Activating mutations or transcriptional deregulation can lead from proto-oncogenes to oncogenes. The *Runx* genes can present characteristics of both oncogenes and tumor suppressor genes. These genes encode transcription factors involved in normal development with tissue specific expression. Many chromosomal translocations involving *Runx* genes and leading to oncogenic fusion proteins have been reported [95]. These fusion proteins may have a tissue-restricted oncogenic spectrum [96] in accordance with the concept of lineage-specific oncogenes. This concept applied to CSCs could suggest that some specific oncogenes could select and maintain a particular malignant phenotype characteristic of a cell lineage. *Runx3* is an essential transcription factor for the late phase of lung development. *Runx3* is required for the control of differentiation and proliferation of bronchiolar epithelium [97]. The frequent silencing of *Runx3* by promoter hypermethylation in the preneoplastic stage of the lung adenocarcinoma has been observed [98, 99]. *Runx3* downregulation has been proposed as an early event in the development of the lung carcinoma interfering in the differentiation of progenitor cells [97]. Moreover, there are some data suggesting that in lung cancer TITF1 could be an adenocarcinoma lineage specific oncogene [100] and *BRF2* a squamous cell lineage specific oncogene [101].

BASC possesses the potential to differentiate into Clara or AT2 cells, presenting coexpression of Clara cell secretory protein (CCSP) and surfactant protein C (SPC) (Figure 1) [74]. These cells also exhibit the capacity of self-renewal and the expression of *Oct4*. *Oct4* is a transcriptional factor of the embryonic stem cells which expression was found to be associated with a poor prognosis [87, 102, 103]. In addition, knock down of *Oct4* might lead to apoptosis of a CSC-like population of lung cancer cells [104].

Sox2 is a critical transcription regulator of embryonic stem cells [105]. *Sox2* controls self-renewal and differentiation processes [106]. It is also implicated in lung branching morphogenesis during pulmonary development as previously evocated [57, 58]. *Sox2* has been proposed to be an oncogene which expression is essential to lung SCC carcinogenesis and which is capable of transforming and conferring tumor initiating properties to human lung squamous cells [107]. Additionally, tumors with *Sox2* overexpression seem to have a worse prognosis [108].

Oct4 and *Sox2* are two of the four crucial transcription factors capable of cooperating to reprogram differentiated cells into an induced pluripotent stem cell-like phenotype

Table 1: Molecular characterization of putative human lung CSCs.

Molecular characterization	References
Surface markers and transporters:	
CD133	[11, 34, 37, 87–91]
Side population—ABCG2	[80–83, 91]
ALDH activity	[42, 85]
Transcription factors:	
Runx3	[97–99]
Sox2	[107, 108]
Oct4	[87, 102–104]
c-kit	[111, 115]

[109, 110]. Nuclear transplantation of *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc*, and *Klf4* can reprogram a somatic genome back into an embryonic stem cell status. Is there a comparable way for cancer cells to reacquire an immature profile with properties of self-renewal? *Oct4* and *Sox2* may participate to a similar process leading to lung CSCs.

Stem Cell Factor (SCF) is a mitogenic and angiogenic factor involved in carcinogenesis. Human *c-kit* has been shown to operate as a SCF receptor promoting tumor growth [111–113]. Patients with either mutation or overexpression of *c-kit* have lower survival rates and show resistance to chemotherapy [114]. Blocking SCF/*c-kit* signaling pathway inhibits CSC proliferation and survival after chemotherapy exposure in human lung cancer cell lines [115]. Exposure to SCF/*c-kit* axis blockade by SCF-neutralizing antibodies or by imatinib (Gleevec), an inhibitor of c-kit, combined to cisplatin therapy might lead to inhibition of both non-CSCs and CSCs.

Differences between normal stem cells and CSCs may provide novel antigenic and molecular targets for therapy (Table 1). It is important to design new therapeutic approaches to selectively hit CSC-specific pathways, while sparing normal stem cells. Further identification of lung cancer stem cell-specifics target could allow for promising more effective combined therapies. In our view, the most important matter to address in a near future is to better characterize and isolate lung CSCs from patients' tumors combining marker studies and functional assays. Lung CSCs probably include a heterogeneous population of cells with different therapeutic resistance profiles. Identifying lineage specific oncogenes or their fusion proteins could bring new targets for specific therapeutic approaches selectively aimed at specific CSCs. In contrast to chemotherapy or radiotherapy on mature tumor cells, therapies against CSCs might have a slow but sustainable effect. Therefore experimental models will certainly have to be redrawn including longer observation periods and intermediate analysis.

9. Conclusion

CSC is central to cancer cell biology and cancer therapy. The knowledge of CSC signaling pathways may lead to new therapies able to eradicate lung CSC or induce differentiation of these cells. Promising models have recently been developed to isolate the subpopulation of CSCs within the lung-differentiated cells of the tumor mass. These models are useful tools to better characterize lung CSCs. Targeting the CSC or its microenvironmental niche could inhibit self-renewing and overcome chemo-radio resistance. Some consistent preclinical data are emerging on the role of transcriptional factors such as *Runx3*, *Oct4*, *Sox2*, and *c-kit* in lung tumor differentiation and treatment resistance. Further *in vitro* and *in vivo* studies are needed to design combined therapies in order to determine whether these candidates are potential targets for new therapeutic strategies against lung cancer. Moreover, the prognostic and predictive value of CSCs identification from tumor biopsies or among circulating tumor cells remains to be determined.

References

[1] T. Reya, S. J. Morrison, M. F. Clarke, and I. L. Weissman, "Stem cells, cancer, and cancer stem cells," *Nature*, vol. 414, no. 6859, pp. 105–111, 2001.

[2] P. C. Nowell, "The clonal evolution of tumor cell populations," *Science*, vol. 194, no. 4260, pp. 23–28, 1976.

[3] M. S. Wicha, S. Liu, and G. Dontu, "Cancer stem cells: an old idea—a paradigm shift," *Cancer Research*, vol. 66, no. 4, pp. 1883–1890, 2006.

[4] L. L. Campbell and K. Polyak, "Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution?" *Cell Cycle*, vol. 6, no. 19, pp. 2332–2338, 2007.

[5] J. E. Visvader and G. J. Lindeman, "Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions," *Nature Reviews Cancer*, vol. 8, no. 10, pp. 755–768, 2008.

[6] M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison, and M. F. Clarke, "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 7, pp. 3983–3988, 2003.

[7] S. K. Singh, C. Hawkins, I. D. Clarke et al., "Identification of human brain tumour initiating cells," *Nature*, vol. 432, no. 7015, pp. 396–401, 2004.

[8] A. T. Collins and N. J. Maitland, "Prostate cancer stem cells," *European Journal of Cancer*, vol. 42, no. 9, pp. 1213–1218, 2006.

[9] P. C. Hermann, S. L. Huber, T. Herrler et al., "Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer," *Cell Stem Cell*, vol. 1, no. 3, pp. 313–323, 2007.

[10] L. Ricci-Vitiani, D. G. Lombardi, E. Pilozzi et al., "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells," *Nature*, vol. 445, no. 7123, pp. 111–115, 2007.

[11] A. Eramo, F. Lotti, G. Sette et al., "Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population," *Cell Death and Differentiation*, vol. 15, no. 3, pp. 504–514, 2008.

[12] C. T. Jordan, M. L. Guzman, and M. Noble, "Cancer stem cells," *The New England Journal of Medicine*, vol. 355, no. 12, pp. 1253–1261, 2006.

[13] N. A. Lobo, Y. Shimono, D. Qian, and M. F. Clarke, "The biology of cancer stem cells," *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 23, pp. 675–699, 2007.

[14] D. T. Scadden, "The stem-cell niche as an entity of action," *Nature*, vol. 441, no. 7097, pp. 1075–1079, 2006.

[15] X. Zhu, X. Zhou, M. T. Lewis, L. Xia, and S. Wong, "Cancer stem cell, niche and EGFR decide tumor development and treatment response: a bio-computational simulation study," *Journal of Theoretical Biology*, vol. 269, no. 1, pp. 138–149.

[16] A. E. Cesana and D. M. Noonan, "Cancer stem cells: soloists or choral singers within the tumor micro-environment?" *Current Pharmaceutical Biotechnology*. Nov 2, 2010. PMID:21044010.

[17] M. F. Clarke and M. Fuller, "Stem cells and cancer: two faces of eve," *Cell*, vol. 124, no. 6, pp. 1111–1115, 2006.

[18] C. Calabrese, H. Poppleton, M. Kocak et al., "A perivascular niche for brain tumor stem cells," *Cancer Cell*, vol. 11, no. 1, pp. 69–82, 2007.

[19] K. Parmar, P. Mauch, J. A. Vergilio, R. Sackstein, and J. D. Down, "Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 13, pp. 5431–5436, 2007.

[20] J. Mazumdar, W. T. O'Brien, R. S. Johnson et al., "O2 regulates stem cells through Wnt/β-catenin signalling," *Nature Cell Biology*, vol. 12, no. 10, pp. 1007–1013, 2010.

[21] T. Lapidot, C. Sirard, J. Vormoor et al., "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice," *Nature*, vol. 367, no. 6464, pp. 645–648, 1994.

[22] B. A. Reynolds and R. L. Rietze, "Neural stem cells and neurospheres—re-evaluating the relationship," *Nature Methods*, vol. 2, no. 5, pp. 333–336, 2005.

[23] B. G. Debeb, W. Xu, and W. A. Woodward, "Radiation resistance of breast cancer stem cells: understanding the clinical framework," *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, vol. 14, no. 1, pp. 11–17, 2009.

[24] X. Li, M. T. Lewis, J. Huang et al., "Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 100, no. 9, pp. 672–679, 2008.

[25] O. Al-Assar, R. J. Muschel, T. S. Mantoni, W. G. McKenna, and T. B. Brunner, "Radiation response of cancer stem-like cells from established human cell lines after sorting for surface markers," *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, vol. 75, no. 4, pp. 1216–1225, 2009.

[26] M. Baumann, M. Krause, and R. Hill, "Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance," *Nature Reviews Cancer*, vol. 8, no. 7, pp. 545–554, 2008.

[27] M. Zhang, R. L. Atkinson, and J. M. Rosen, "Selective targeting of radiation-resistant tumor-initiating cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 8, pp. 3522–3527, 2010.

[28] L. P. Martin, T. C. Hamilton, and R. J. Schilder, "Platinum resistance: the role of DNA repair pathways," *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 5, pp. 1291–1295, 2008.

[29] S. Bao, Q. Wu, R. E. McLendon et al., "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response," *Nature*, vol. 444, no. 7120, pp. 756–760, 2006.

[30] M. A. Goodell, K. Brose, G. Paradis, A. S. Conner, and R. C. Mulligan, "Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 183, no. 4, pp. 1797–1806, 1996.

[31] XI. W. Ding, J. H. Wu, and C. P. Jiang, "ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy," *Life Sciences*, vol. 86, no. 17-18, pp. 631–637, 2010.

[32] S. Zhou, J. D. Schuetz, K. D. Bunting et al., "The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype," *Nature Medicine*, vol. 7, no. 9, pp. 1028–1034, 2001.

[33] D. H. Ryan, C. W. Chapple, S. A. Kossover, A. S. Sandberg, and H. J. Cohen, "Phenotypic similarities and differences between CALLA-positive acute lymphoblastic leukemia cells and normal marrow CALLA-positive B cell precursors," *Blood*, vol. 70, no. 3, pp. 814–821, 1987.

[34] V. Tirino, R. Camerlingo, R. Franco et al., "The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer," *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, vol. 36, no. 3, pp. 446–453, 2009.

[35] Y. Yu, A. Flint, E. L. Dvorin, and J. Bischoff, "AC133-2, a novel isoform of human AC133 stem cell antigen," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 23, pp. 20711–20716, 2002.

[36] N. Taïeb, M. Maresca, X. J. Guo, N. Garmy, J. Fantini, and N. Yahi, "The first extracellular domain of the tumour stem cell marker CD133 contains an antigenic ganglioside-binding motif," *Cancer Letters*, vol. 278, no. 2, pp. 164–173, 2009.

[37] T. Klonisch, E. Wiechec, S. Hombach-Klonisch et al., "Cancer stem cell markers in common cancers—therapeutic implications," *Trends in Molecular Medicine*, vol. 14, no. 10, pp. 450–460, 2008.

[38] A. Yoshida, A. Rzhetsky, L. C. Hsu, and C. Chang, "Human aldehyde dehydrogenase gene family," *European Journal of Biochemistry*, vol. 251, no. 3, pp. 549–557, 1998.

[39] R. J. Jones, J. P. Barber, M. S. Vala et al., "Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells," *Blood*, vol. 85, no. 10, pp. 2742–2746, 1995.

[40] C. Ginestier, M. H. Hur, E. Charafe-Jauffret et al., "ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome," *Cell Stem Cell*, vol. 1, no. 5, pp. 555–567, 2007.

[41] E. H. Huang, M. J. Hynes, T. Zhang et al., "Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis," *Cancer Research*, vol. 69, no. 8, pp. 3382–3389, 2009.

[42] F. Jiang, Q. Qiu, A. Khanna et al., "Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer," *Molecular Cancer Research*, vol. 7, no. 3, pp. 330–338, 2009.

[43] P. N. Kelly, A. Dakic, J. M. Adams, S. L. Nutt, and A. Strasser, "Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells," *Science*, vol. 317, no. 5836, p. 337, 2007.

[44] M. H. Yoo and D. L. Hatfield, "The cancer stem cell theory: is it correct?" *Molecules and Cells*, vol. 26, no. 5, pp. 514–516, 2008.

[45] K. Rowan, "Are cancer stem cells real? After four decades, debate still simmers," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 101, no. 8, pp. 546–547, 2009.

[46] B. C. Baguley, "Multiple drug resistance mechanisms in cancer," *Molecular Biotechnology*, vol. 46, no. 3, pp. 308–316, 2010.

[47] M. V. Berridge, P. M. Herst, and A. S. Tan, "Metabolic flexibility and cell hierarchy in metastatic cancer," *Mitochondrion*, vol. 10, no. 6, pp. 584–588, 2010.

[48] J. A. Aguirre-Ghiso, "The problem of cancer dormancy: understanding the basic mechanisms and identifying therapeutic opportunities," *Cell Cycle*, vol. 5, no. 16, pp. 1740–1743, 2006.

[49] L. G. Collins, C. Haines, R. Perkel, and R. E. Enck, "Lung cancer: diagnosis and management," *American Family Physician*, vol. 75, no. 1, pp. 56–63, 2007.

[50] E. Brambilla, D. Veale, D. Moro, F. Morel, F. Dubois, and C. Brambilla, "Neuroendocrine phenotype in lung cancers: comparison of immunohistochemistry with biochemical determination of enolase isoenzymes," *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 98, no. 1, pp. 88–97, 1992.

[51] M. Yanada, T. Yaoi, J. Shimada et al., "Frequent hemizygous deletion at 1p36 and hypermethylation downregulate RUNX3 expression in human lung cancer cell lines," *Oncology Reports*, vol. 14, no. 4, pp. 817–822, 2005.

[52] K. Hiyama, E. Hiyama, S. Ishioka et al., "Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 87, no. 12, pp. 895–902, 1995.

[53] C. I. Amos, W. Xu, and M. R. Spitz, "Is there a genetic basis for lung cancer susceptibility?" *Recent Results in Cancer Research*, vol. 151, pp. 3–12, 1999.

[54] R. J. Metzger, O. D. Klein, G. R. Martin, and M. A. Krasnow, "The branching programme of mouse lung development," *Nature*, vol. 453, no. 7196, pp. 745–750, 2008.

[55] W. V. Cardoso and J. Lü, "Regulation of early lung morphogenesis: questions, facts and controversies," *Development*, vol. 133, no. 9, pp. 1611–1624, 2006.

[56] M. Weaver, L. Batts, and B. L. M. Hogan, "Tissue interactions pattern the mesenchyme of the embryonic mouse lung," *Developmental Biology*, vol. 258, no. 1, pp. 169–184, 2003.

[57] Y. Ishii, M. Rex, P. J. Scotting, and S. Yasugi, "Region-specific expression of chicken Sox2 in the developing gut and lung epithelium: regulation by epithelial-mesenchymal interactions," *Developmental Dynamics*, vol. 213, no. 4, pp. 464–475, 1998.

[58] C. Gontan, A. de Munck, M. Vermeij, F. Grosveld, D. Tibboel, and R. Rottier, "Sox2 is important for two crucial processes in lung development: branching morphogenesis and epithelial cell differentiation," *Developmental Biology*, vol. 317, no. 1, pp. 296–309, 2008.

[59] T. Okubo, P. S. Knoepfler, R. N. Eisenman, and B. L. M. Hogan, "Nmyc plays an essential role during lung development as a dosage-sensitive regulator of progenitor cell proliferation and differentiation," *Development*, vol. 132, no. 6, pp. 1363–1374, 2005.

[60] A. K. T. Perl, S. E. Wert, A. Nagy, C. G. Lobe, and J. A. Whitsett, "Early restriction of peripheral and proximal cell lineages during formation of the lung," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 16, pp. 10482–10487, 2002.

[61] R. J. Pack, L. H. Al-Ugaily, G. Morris, and J. G. Widdicombe, "The distribution and structure of cells in the tracheal epithelium of the mouse," *Cell and Tissue Research*, vol. 208, no. 1, pp. 65–84, 1980.

[62] K. U. Hong, S. D. Reynolds, S. Watkins, E. Fuchs, and B. R. Stripp, "In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations," *American Journal of Physiology*, vol. 286, no. 4, pp. L643–L649, 2004.

[63] K. U. Hong, S. D. Reynolds, S. Watkins, E. Fuchs, and B. R. Stripp, "Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium," *American Journal of Pathology*, vol. 164, no. 2, pp. 577–588, 2004.

[64] K. Nakanishi, S. Hiroi, T. Kawai, M. Suzuki, and C. Torikata, "Argyrophilic nucleolar-organizer region counts and DNA status in bronchioloalveolar epithelial hyperplasia and adenocarcinoma of the lung," *Human Pathology*, vol. 29, no. 3, pp. 235–239, 1998.

[65] D. Trichopoulos, F. Mollo, L. Tomatis et al., "Active and passive smoking and pathological indicators of lung cancer risk in an autopsy study," *Journal of the American Medical Association*, vol. 268, no. 13, pp. 1697–1701, 1992.

[66] A. Giangreco, E. N. Arwert, I. R. Rosewell, J. Snyder, F. M. Watt, and B. R. Stripp, "Stem cells are dispensable for lung homeostasis but restore airways after injury," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 23, pp. 9286–9291, 2009.

[67] M. J. Evans, L. J. Cabral Anderson, and G. Freeman, "Role of the clara cell in renewal of the bronchiolar epithelium," *Laboratory Investigation*, vol. 38, no. 6, pp. 648–655, 1978.

[68] A. Giangreco, S. D. Reynolds, and B. R. Stripp, "Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction," *American Journal of Pathology*, vol. 161, no. 1, pp. 173–182, 2002.

[69] S. D. Reynolds, A. Giangreco, J. H. T. Power, and B. R. Stripp, "Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration," *American Journal of Pathology*, vol. 156, no. 1, pp. 269–278, 2000.

[70] T. P. Stevens, J. T. Mcbride, J. L. Peake, K. E. Pinkerton, and B. R. Stripp, "Cell proliferation contributes to PNEC hyperplasia after acute airway injury," *American Journal of Physiology*, vol. 272, no. 3, pp. L486–L493, 1997.

[71] R. I. Linnoila, S. M. Jensen, S. M. Steinberg, J. L. Mulshine, J. C. Eggleston, and A. F. Gazdar, "Peripheral airway cell marker expression in non-small cell lung carcinoma. Association with distinct clinicopathologic features," *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 97, no. 2, pp. 233–243, 1992.

[72] L. M. Eisenberg and C. A. Eisenberg, "Stem cell plasticity, cell fusion, and transdifferentiation," *Birth Defects Research Part C*, vol. 69, no. 3, pp. 209–218, 2003.

[73] S. J. Forbes, P. Vig, R. Poulsom, N. A. Wright, and M. R. Alison, "Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible," *Clinical Science*, vol. 103, no. 4, pp. 355–369, 2002.

[74] C. F. Kim, E. L. Jackson, A. E. Woolfenden et al., "Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer," *Cell*, vol. 121, no. 6, pp. 823–835, 2005.

[75] N. Onuki, I. I. Wistuba, W. D. Travis et al., "Genetic changes in the spectrum of neuroendocrine lung tumors," *Cancer*, vol. 85, no. 3, pp. 600–607, 1999.

[76] R. Meuwissen and A. Berns, "Mouse models for human lung cancer," *Genes and Development*, vol. 19, no. 6, pp. 643–664, 2005.

[77] N. Ohtsuka, K. Urase, T. Momoi, and H. Nogawa, "Induction of bud formation of embryonic mouse tracheal epithelium by fibroblast growth factor plus transferrin in mesenchyme-free culture," *Developmental Dynamics*, vol. 222, no. 2, pp. 263–272, 2001.

[78] A. Giangreco, K. R. Groot, and S. M. Janes, "Lung cancer and lung stem cells: strange bedfellows?" *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 175, no. 6, pp. 547–553, 2007.

[79] L. Li and W. B. Neaves, "Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters," *Cancer Research*, vol. 66, no. 9, pp. 4553–4557, 2006.

[80] M. M. Ho, A. V. Ng, S. Lam, and J. Y. Hung, "Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells," *Cancer Research*, vol. 67, no. 10, pp. 4827–4833, 2007.

[81] R. Summer, D. N. Kotton, X. Sun, B. Ma, K. Fitzsimmons, and A. Fine, "Side population cells and Bcrp1 expression in lung," *American Journal of Physiology*, vol. 285, no. 1, pp. L97–L104, 2003.

[82] J. M. Sung, H. J. Cho, H. Yi et al., "Characterization of a stem cell population in lung cancer A549 cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 371, no. 1, pp. 163–167, 2008.

[83] C. D. Salcido, A. Larochelle, B. J. Taylor, C. E. Dunbar, and L. Varticovski, "Molecular characterisation of side population cells with cancer stem cell-like characteristics in small-cell lung cancer," *British Journal of Cancer*, vol. 102, no. 11, pp. 1636–1644, 2010.

[84] A. Eramo, T. L. Haas, and R. De Maria, "Lung cancer stem cells: tools and targets to fight lung cancer," *Oncogene*, 2010.

[85] S. Deng, X. Yang, H. Lassus et al., "Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers," *PLoS One*, vol. 5, no. 4, Article ID e10277, 2010.

[86] V. Levina, A. M. Marrangoni, R. DeMarco, E. Gorelik, and A. E. Lokshin, "Drug-selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties," *PLoS One*, vol. 3, no. 8, Article ID e3077, 2008.

[87] Y. C. Chen, H. S. Hsu, Y. W. Chen et al., "Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells," *PLoS One*, vol. 3, no. 7, Article ID e2637, 2008.

[88] G. Bertolini, L. Roz, P. Perego et al., "Highly tumorigenic lung cancer CD133 cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 38, pp. 16281–16286, 2009.

[89] V. Tirino, V. Desiderio, R. D'Aquino et al., "Detection and characterization of CD133 cancer stem cells in human solid tumours," *PLoS One*, vol. 3, no. 10, Article ID e3469, 2008.

[90] A. V. Salnikov, J. Gladkich, G. Moldenhauer, M. Volm, J. Mattern, and I. Herr, "CD133 is indicative for a resistance phenotype but does not represent a prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients," *International Journal of Cancer*, vol. 126, no. 4, pp. 950–958, 2010.

[91] F. Li, H. Zeng, and K. Ying, "The combination of stem cell markers CD133 and ABCG2 predicts relapse in stage I non-small cell lung carcinomas," *Medical Oncology*. Aug 18, 2010. PMID:20717756.

[92] T. Bonnefoix, P. Bonnefoix, P. Verdiel, and J. J. Sotto, "Fitting limiting dilution experiments with generalized linear models results in a test of the single-hit Poisson assumption," *Journal of Immunological Methods*, vol. 194, no. 2, pp. 113–119, 1996.

[93] E. L. Jackson, N. Willis, K. Mercer et al., "Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras," *Genes and Development*, vol. 15, no. 24, pp. 3243–3248, 2001.

[94] J. M. Bishop, "The molecular genetics of cancer," *Science*, vol. 235, no. 4786, pp. 305–311, 1987.

[95] E. R. Cameron and J. C. Neil, "The Runx genes: lineage-specific oncogenes and tumor suppressors," *Oncogene*, vol. 23, no. 24, pp. 4308–4314, 2004.

[96] C. G. de Guzman, A. J. Warren, Z. Zhang et al., "Hematopoietic stem cell expansion and distinct myeloid developmental abnormalities in a murine model of the AML1-ETO translocation," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 22, no. 15, pp. 5506–5517, 2002.

[97] K. S. Lee, Y. S. Lee, J. M. Lee et al., "Runx3 is required for the differentiation of lung epithelial cells and suppression of lung cancer," *Oncogene*, vol. 29, no. 23, pp. 3349–3361, 2010.

[98] Q. L. Li, H. R. Kim, W. J. Kim et al., "Transcriptional silencing of the RUNX3 gene by CpG hypermethylation is associated with lung cancer," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 314, no. 1, pp. 223–228, 2004.

[99] J. D. F. Licchesi, W. H. Westra, C. M. Hooker, E. O. Machida, S. B. Baylin, and J. G. Herman, "Epigenetic alteration of wnt pathway antagonists in progressive glandular neoplasia of the lung," *Carcinogenesis*, vol. 29, no. 5, pp. 895–904, 2008.

[100] K. A. Kwei, Y. H. Kim, L. Girard et al., "Genomic profiling identifies TITF1 as a lineage-specific oncogene amplified in lung cancer," *Oncogene*, vol. 27, no. 25, pp. 3635–3640, 2008.

[101] W. W. Lockwood, R. Chari, B. P. Coe et al., "Integrative genomic analyses identify BRF2 as a novel lineage-specific oncogene in lung squamous cell carcinoma," *PLoS Medicine*, vol. 7, no. 7, Article ID e1000315, 2010.

[102] X. Zhang, B. Han, J. Huang et al., "Prognostic significance of OCT4 expression in adenocarcinoma of the lung," *Japanese Journal of Clinical Oncology*, vol. 40, no. 10, pp. 961–966, 2010.

[103] G. Karoubi, M. Gugger, R. Schmid, and A. Dutly, "OCT4 expression in human non-small cell lung cancer: implications for therapeutic intervention," *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*, vol. 8, no. 4, p. 397, 2009.

[104] T. Hu, S. Liu, D. R. Breiter, F. Wang, Y. Tang, and S. Sun, "Octamer 4 small interfering RNA results in cancer stem cell-like cell apoptosis," *Cancer Research*, vol. 68, no. 16, pp. 6533–6540, 2008.

[105] L. A. Boyer, I. L. Tong, M. F. Cole et al., "Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells," *Cell*, vol. 122, no. 6, pp. 947–956, 2005.

[106] N. Ivanova, R. Dobrin, R. Lu et al., "Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference," *Nature*, vol. 442, no. 7102, pp. 533–538, 2006.

[107] T. Hussenet, S. Dali, J. Exinger et al., "SOX2 is an oncogene activated by recurrent 3q26.3 amplifications in human lung squamous cell carcinomas," *PLoS One*, vol. 5, Article ID e8960, 15 pages, 2010.

[108] Y. Lu, C. Futtner, J. R. Rock et al., "Evidence that SOX2 overexpression is oncogenic in the lung," *PLoS One*, vol. 5, no. 6, Article ID e11022, 2010.

[109] K. Takahashi and S. Yamanaka, "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors," *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 663–676, 2006.

[110] M. Wernig, A. Meissner, R. Foreman et al., "In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state," *Nature*, vol. 448, no. 7151, pp. 318–324, 2007.

[111] G. W. Krystal, S. J. Hines, and C. P. Organ, "Autocrine growth of small cell lung cancer mediated by coexpression of c-kit and stem cell factor," *Cancer Research*, vol. 56, no. 2, pp. 370–376, 1996.

[112] S. J. Hines, C. Organ, M. J. Kornstein, and G. W. Krystal, "Coexpression of the c-kit and stem cell factor genes in breast carcinomas," *Cell Growth and Differentiation*, vol. 6, no. 6, pp. 769–779, 1995.

[113] A. Yasuda, H. Sawai, H. Takahashi et al., "Stem cell factor/c-kit receptor signaling enhances the proliferation and invasion of colorectal cancer cells through the PI3K/Akt Pathway," *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 52, no. 9, pp. 2292–2300, 2007.

[114] H. T. Hassan, "c-Kit expression in human normal and malignant stem cells prognostic and therapeutic implications," *Leukemia Research*, vol. 33, no. 1, pp. 5–10, 2009.

[115] V. Levina, A. Marrangoni, T. Wang et al., "Elimination of human lung cancer stem cells through targeting of the stem cell factor-c-kit autocrine signaling loop," *Cancer Research*, vol. 70, no. 1, pp. 338–346, 2010.

Résumé

Les résultats insuffisants de la radio chimiothérapie conventionnelle dans les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) ont motivé l'évaluation d'une nouvelle stratégie de modulation pharmacologique de la radiosensibilité tumorale basée sur les modifications épigénétiques. Pour cela nous avons évalué la combinaison de la radiothérapie et d'un nouvel pan-inhibiteur des histones désacétylases (HDACi), l'abexinostat en préclinique *in vitro* et *in vivo* sur deux modèles de CBNPC puis en phase clinique précoce chez l'homme dans le cadre d'un essai de phase I.

Nous avons d'abord montré que l'abexinostat augmente la radiosensibilité des cellules de CBNPC de manière dépendante de la séquence thérapeutique en normoxie et en hypoxie en augmentant l'apoptose caspase dépendante ainsi que les cassures doubles brins radio-induites et en réduisant la signalisation et la réparation de ces dommages de l'ADN. L'abexinostat potentialise également le retard de croissance tumorale induit par la radiothérapie *in vivo* dans des xénogreffes sous-cutanées de CBNPC avec un profil de toxicité acceptable. Nous avons également montré pour la première fois que la triple combinaison de radiothérapie, abexinostat et cisplatine potentialise le retard de croissance tumorale *in vivo*. Les premiers résultats *in vitro* et *in vivo* confortant le rationnel pour la combinaison abexinostat-radiothérapie nous avons réalisé étude de phase I exploratoire d'escalade de dose combinant l'abexinostat à la radiothérapie palliative hypo fractionnée standard délivrant 30 Gy en 10 fractions pour des tumeurs solides métastatiques. Parmi les 58 patients traités, d'âge médian 61 ans (20-82), on note 71 % de stade M1 et 88 % de patients ayant déjà reçu des traitements préalables par chimiothérapie et/ou radiothérapie et/ou chirurgie. La dose recommandée pour un essai de phase 2 que nous avons établie est de 90 mg/m². Sur les 51 patients évaluables, on observe un taux de réponse globale de 7,8 % (1 réponse complète (RC) et 3 réponses partielles (RP)) et un taux de réponse locorégionale de 11,8% (1 RC et 5 RP) avec un suivi médian de 16 semaines. Les patients présentant des lésions (cibles ou non) cérébrales ont présenté des taux de réponse encourageant avec notamment un patient en RC. Nous avons retrouvé peu d'effets secondaires de grade ≥3, les plus fréquents étant la thrombopénie (17,2 %), la lymphopénie (12,1 %) et l'hypokaliémie (6,9 %). Au total, 6 patients (10%) ont interrompu leur traitement du fait des effets secondaires. Nous n'avons pas observé de prolongation de l'intervalle QTc de grade ≥ 3 et il n'y a pas eu d'interruption de traitement en rapport avec cet effet secondaire. Dans l'ensemble, nos données *in vitro* et *in vivo* montrent une potentialisation de l'effet anti tumoral par la combinaison d'abexinostat et radiothérapie. Chez les patients présentant des tumeurs solides avancées l'abexinostat oral en combinaison à la radiothérapie est bien toléré. Cette combinaison pourrait avoir un potentiel particulièrement intéressant dans le traitement des métastases cérébrales. De plus, nos travaux précliniques suggèrent pour la première fois un effet prometteur d'une triple combinaison avec HDACi, cisplatine et radiothérapie qui justifie de plus amples investigations et pourrait guider de nouvelles stratégies thérapeutiques dans les CBNPC.

Nos travaux s'inscrivent dans une stratégie de recherche translationnelle et montrent l'importance de la recherche préclinique pour les études d'association aux rayonnements ionisants. Seuls un développement préclinique rationnel et un développement clinique méthodique permettront l'émergence de combinaisons modulant la radiosensibilité tumorale de manière suffisamment efficace pour modifier nos standards de traitement et améliorer le pronostic de nos patients.

Mots clés : Epigénétique, radiosensibilité tumorale, HDAC inhibiteur, cancer bronchique non à petites cellules, radiothérapie

Abstract

Insufficient results of conventional chemoradiotherapy in non-small cell lung carcinomas (NSCLC) have encouraged assessment of new pharmacological strategies for modulation of radiosensitization based on epigenetic changes. We have investigated the combination of radiotherapy and a novel pan-histone deacetylase inhibitor (HDACi), abexinostat in vitro and in vivo in two NSCLC models and in an early phase clinical trial.

Our findings demonstrate that abexinostat enhances radiosensitivity of NSCLC cells in a time dependent way in vitro in normoxia and hypoxia increasing radio-induced caspase dependent apoptosis and persistent DNA double strand breaks associated with decreased DNA damage signaling and repair. Interestingly, abexinostat potentiates tumor growth delay in vivo in combined modality treatments associating not only abexinostat and irradiation but also in the triplet combination of abexinostat, irradiation and cisplatin. We conducted an exploratory phase 1, dose-escalation study of abexinostat in combination with standard hypofractionated radiotherapy (30 Gy in 10 fractions) in patients with advanced solid tumors treated in a palliative setting. Among 58 treated patients, the median age was 61.5 years (range, 20-82); 47 % of the patients had M1 stage disease, and 95% had received previous chemotherapy alone or chemotherapy in combination with surgery and/or radiotherapy. The recommended phase 2 dose was determined to be 90 mg/m2. Of the 51 patients evaluable for response, best overall response was 8 % (1 complete response [CR], 3 partial responses [PRs]), and best loco-regional response was 12 % (1 CR and 5 PRs) at a median follow-up of 16 weeks. Of note, patients with target or non-target brain lesions showed encouraging responses, with 1 patient achieving a best loco-regional response of CR. Treatment-emergent grade ≥ 3 adverse events (AEs) were few, with most common being thrombocytopenia (17 %), lymphopenia (12 %), and hypokalemia (7 %). Six patients (10 %) discontinued treatment due to AEs. No grade ≥ 3 prolongation of the QTc interval was observed, with no treatment discontinuations due to this AE. Altogether, our data demonstrate in vitro and in vivo a potentiation of anti-tumor effect by abexinostat in combination with irradiation in NSCLC. Oral abexinostat combined with radiotherapy was well tolerated in patients with advanced solid tumors. The combination may have potential for treatment of patients with brain lesions. Moreover, our work suggest for the first time to our knowledge promising triple combination opportunities with HDACi, irradiation and cisplatin which deserves further investigations and could be of major interest in the treatment of NSCLC.

Our studies which are part of a translational research strategy highlight the importance of preclinical investigations in the area of radiotherapy and drug combination research. Only rationale preclinical development and methodologically well conducted clinical development will allow new standards of treatment to emerge and improve patient's prognostic.

Keywords : abexinostat, histone deacetylase inhibitor, radiotherapy, solid tumors, brain lesions