



Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Évaluation préclinique du potentiel thérapeutique de molécules inhibitrices de Mcl-1 au sein de la famille des oligopyridines pour le traitement des cancers de l'ovaire chimiorésistants

**Présentée et soutenue par
Siham HEDIR**

**Thèse soutenue publiquement le 15 décembre 2017
devant le jury composé de**

Mme Bettina COUDERC	Professeur des universités. Université de Toulouse III Paul Sabatier.	Rapporteur
Mme Martine AMIOT	Directeur de recherche université de Nantes-Angers.	Rapporteur
Mme Anne-Sophie VOISIN-CHIRET	Professeur des Universités. Université de Caen Normandie	Examineur
Mr René GRÉE	Directeur de recherche émérite. Université de Rennes	Examineur
Mr Philippe JUIN	Directeur de recherche. Université de Nantes-Angers	Examineur
Mme Florence JOLY	Professeur des Universités. Université de Caen Normandie	Examineur
Mr Gaël ROUE	Chercheur. Hôpital universitaire Vall d'Hebron, Barcelone	Examineur
Mr Laurent POULAIN	Directeur de recherche. Université de Caen Normandie	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par Laurent POULAIN, Laboratoire INSERM U1086 « ANTICIPE »
Unité de recherche Interdisciplinaire pour la prévention et le traitement des cancers
Axe 2 : Biologie et Thérapie des Cancers Innovantes des Cancers de l'Ovaire (BioTICLA)**



Remerciements

... Et voilà, j'arrive à la fin de ma thèse, à la fin d'une très belle aventure pleine de bons souvenirs mais également de certains autres plus difficiles qui ont nourri mes expériences et forgé ma personnalité. Je salue vivement toutes les personnes que j'ai rencontrées et les remercie pour leur contribution dans la réalisation de cette belle aventure qui, il y a quatre ans, n'était qu'un rêve.

Dr. Laurent Poulain, mon directeur de thèse et directeur de l'axe BioFJCLL de l'unité Inserm 1086, je te remercie d'avoir supporté les harcèlements répétés que je t'ai infligés pour rejoindre ton laboratoire dans le cadre de mon stage M2R. Je te remercie également de croire en moi, de me soutenir et me donner la liberté d'exercer pleinement ce métier très noble. Je te remercie pour ton encadrement, et de m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans des conditions favorables. Merci pour le temps que tu m'as consacré et les conseils que tu m'as donnés, qui vont sûrement m'accompagner tout au long de ma carrière. Enfin je te remercie pour ta simplicité, ta présence et ta gentillesse, tu étais comme un père.

Dr. Bettina Couderc (Université de Toulouse) et Dr. Martine Amiot (Université de Nantes), je vous remercie d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail et pour l'intérêt que vous lui avez accordé. Je vous remercie également d'accepter mes excuses pour le retard dans le rendu du manuscrit.

Pr. Anne-Sophie Vaisin-Chiret, je te remercie d'avoir accepté d'être examinatrice de cette thèse. Je te remercie également pour tout le temps que tu m'as consacré, pour le savoir que tu m'as apporté dans le domaine de la chimie, pour ta compréhension, ta qualité scientifique remarquable, et ta gentillesse.

Dr. René Grée, je vous remercie d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail. Je vous remercie aussi pour tous les échanges et le savoir que vous m'avez apportés pendant notre travail collaboratif.

Dr. Gaël Roué, je te remercie pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse. Je te remercie aussi pour le temps que tu m'as consacré lors des expérimentations effectuées à Barcelone. Je te remercie pour ta simplicité, ta valeur scientifique et ta gentillesse.

Dr. Philippe Juin et Pr. Florence Joly, je vous remercie d'avoir d'accepté d'examiner et d'évaluer mon travail.

Je remercie également Pascal Gaduchon, Christophe Denoyelle, Marie Villedieu, Bernard Lambert et Monique N'diaye pour leur soutien et leur disponibilité.

Je remercie aussi tous les doctorants du laboratoire, Charlene Duboc, Mégane Vernon, Anaïs Wambecke, Romane Florent, Pierre-Marie Morice, le post-doctorant Matthieu Merget-Figuière, mais aussi tous les étudiants Pierre-Emmanuel Brachet, Enora Delivet et Hippolyte Paysant pour leur bonne humeur, leur aide, leur rire, tous les bons moments que nous avons partagés dans le labo et ailleurs, c'était une belle ambiance. Je remercie également tous les anciens doctorants Charlotte Lecerf, Abdelghanie Jebahi, Nicolas Vigneron et Cécile Pétigny-Lechartier pour leurs conseils, leur soutien et leur présence à tout moment. Pré-Dr. Marie-Laure Bonnefond, collègue de bureau et bonne amie. Merci pour tes phrases que je ne comprenais pas toujours, pour ta joie de vivre, pour tes pas si reconnaissables quand tu sautilles dans le couloir et surtout pour ta patience, ta compréhension et ton soutien. Nous avons su rester solidaires tout au long de notre thèse, sans oublier les derniers mois et les dernières nuits blanches. Je te dis par avance, félicitations pour ton doctorat.

Je remercie aussi Edwige Abillard, Marie-Hélène Louis, Mélanie Briand, Maryline Guillamin, Emilie Bratin, Florence Giffard, Nicolas Elie, Benoit Plancoulaine et Laetitia Chieu pour leur précieuse aide et leur participation à la réalisation de ce travail. Je remercie vivement et énormément Chantal pour tout ce qu'elle fait au laboratoire pour faciliter notre travail. Merci à vous tous

Marie-Hélène, je te suis reconnaissante pour tout ce que tu m'a appris dans le domaine de l'expérimentation animale. Je salue vivement ton professionnalisme et je te remercie pour tous les bons moments que nous avons pu passer dans l'animalerie

Je remercie également toute l'équipe du service d'anatomo-pathologie du Centre François Baclesse, principalement Dr. Cécile Blanc-Fournier, Coralie Bageot, et toutes les filles du service pour leur aide, leur contribution à ce travail et leur patience.

Je remercie également toutes les personnes du Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN), Camille et Martina mais aussi Jana, Aurélie, Anne Claire, Peggy, Marie. Je vous remercie pour le temps si précieux que vous m'avez consacré, pour vos conseil et votre simplicité, j'ai beaucoup appris de vous.

Louis-Bastien Weiswald, tu vois j'ai bien écrit ton prénom cette fois-ci. Que puis-je dire pour te remercier ? Une véritable entente s'est rapidement installée entre nous dès ton arrivée, nous avons su travailler efficacement et en dehors de ça nous avons pu être de bons amis. Merci pour ta présence, ton aide, ton encouragement et ta bonne humeur. Merci encore tu es une personne en or.

Mes chers parents, la prunelle de mes yeux, que dieu vous garde pour moi. Je vous remercie de m'avoir fait naître, de m'aimer, de m'éduquer, de croire en moi et de me faire confiance. Sans vous je n'aurais jamais pu réaliser ce travail. Merci

pour votre présence continue, pour vos encouragements, pour votre amour éternel sans attendre de retour. Papa, je me souviens de mon premier jour à l'école, lorsque que tu m'avais emmené. Tu m'avais porté sur tes épaules jusqu'à ma classe, j'avais eu l'impression de voler tout au long du chemin. Avec ce travail, j'espère t'apporter un honneur aussi grand et aussi haut que celui que tu m'avais fait vivre le jour de ma rentrée scolaire. Maman, tu cachais souvent ton regret de ne pas être à mes côtés dans certains moments. Tu retenais tes larmes à chaque fois que mon départ pour la France approchait, et parfois tu m'encourageais pour tenir bon, être forte et courageuse. Voilà ce que j'ai pu réaliser tout ce temps de mon absence, sois fière de moi.

Mes frères, Lamine, Toufik, mes amours. Je vous remercie pour votre présence, vos encouragements, et votre amour. Vous étiez tout le temps à mes côtés pour me soutenir dans mes démarches. Je vous aime tant.

Fayza, ma sœur chérie, merci pour tes encouragements, pour ton délire, ta joie et ta bonne humeur. Je vais être à tes côtés comme tu l'as toujours fait pour moi.

Melissa, une belle sœur pas comme les autres. Te souviens-tu de notre première rencontre ? Sacré Toufik, merci parce que sans toi je n'aurais jamais rencontré ma deuxième sœur. Merci pour tous les moments de bonheur, de joie et même de pleurs que j'ai passés avec toi. Te souviens-tu de nos préparations culinaires ? Parfois je me dit qu'on est des vrais « chefs ». Merci pour tout.

Tata Zohra, je voudrais te remercier du fond du cœur pour ce que tu as fait pour moi, pour ta présence et ton soutien tout au long de mes années ici en France.

Merci infiniment.

Seif Eddine, tu es une très belle personne. Tu étais dans les premiers jurys de mes différents travaux, tu as su être patient et compréhensif.

*Enfin, je remercie toute ma famille, tous mes amis et toutes les personnes avec qui
j'ai pu être moi-même sans me sentir jugée.*

***A toute ma famille,
aux gens que j'aime
et à la mémoire de Pascale Robichon***

Table des matières

Table des matières	10
Liste des figures	16
Liste des tableaux	18
Abréviations	20
Introduction générale.....	26
Introduction	28
Partie I : les cancers de l’ovaire et leur prise en charge	30
I.1. Généralités.....	32
I.2. Description des cancers de l’ovaire.....	33
I.2.1. Classification des cancers de l’ovaire.....	33
I.2.2. Les Carcinomes séreux de haut grade	38
I.2.2.1. Caractéristiques des carcinomes séreux de haut grade	38
I.2.2.2. Origines des carcinomes séreux de haut grade	39
I.3. Prise en charge des cancers de l’ovaire	42
I.3.1. La chirurgie.....	42
I.3.2. La chimiothérapie de première ligne	44
I.3.2.1. La chimiothérapie adjuvante	44
I.3.2.2. La chimiothérapie intrapéritonéale	45
I.3.2.3. La thérapie ciblée dans les cancers de l’ovaire : intérêt des antiangiogéniques.....	47
I.3.2.4. Chimiothérapie néoadjuvante	51
I.3.2.5. Le traitement d’entretien.....	52
I.3.3. Chimiothérapie de deuxième ligne : récurrence, chimiorésistance et traitement associés	53
I.3.3.1. Résistance aux dérivés de platine et traitement alternatifs des rechutes.....	54
I.3.3.2. Résistance aux taxanes.....	56
I.3.3.3. Traitements alternatifs des rechutes.....	57
I.3.3.3.1. Traitement des cancers de l’ovaire résistants au platine	57
I.3.3.3.2. Traitement des cancers de l’ovaire sensible au platine	58
I.3.4. La déficience de la recombinaison homologe : inhibiteur de PARP	59
Partie II : Implication de la famille Bcl-2 dans le contrôle de la (des) mort(s) cellulaire(s)....	62

II.1. Introduction de la mort par apoptose et son implication dans les processus physiologiques et pathologiques.....	64
II.2. Signaux d'induction et caractéristiques morphologiques de l'apoptose.....	65
II.3. Voies d'induction de l'apoptose	66
II.3.1. La voie extrinsèque	67
II.3.2. La voies intrinsèque.....	69
II.3.2.1. Mitochondriale.....	69
II.3.2.2. Réticulum Endoplasmique (RE).....	72
II.3.2.2.1. Implication des protéines mal repliées dans le stress du RE et l'induction de l'apoptose.....	72
II.3.2.2.2. Implication de la signalisation calcique dans le stress du RE et l'induction de l'apoptose.....	74
II.4. Modalités d'activation des caspases et conséquences	76
II.5. Contrôle de la voie mitochondriale par la famille Bcl-2.....	78
II.5.1. Généralités sur la famille Bcl-2.....	78
II.5.2. Structure des protéines de la famille Bcl-2 : importance du domaine BH3 et de la cavité hydrophobe	79
II.5.2.1. Structure du domaine BH3	80
II.5.2.2. Structure de la cavité hydrophobe	82
II.5.2.2.1. Structure de la cavité hydrophobe de Bcl-x _L et Bcl-2.....	82
II.5.2.2.2. Structure de la cavité hydrophobe de Bcl-w	83
II.5.2.2.3. Structure de la cavité hydrophobe de Mcl-1	84
II.5.2.2.4. Structure de la cavité hydrophobe de Bax et Bak	86
II.5.2.2.5. Structure de la cavité hydrophobe de Bid	87
II.5.3. Mécanisme d'action de la famille Bcl-2.....	89
II.5.3.1. BH3-only : capteurs de stress	90
II.5.3.1.1. Généralités	90
II.5.3.1.2. Modulation des BH3-only.....	91
II.5.3.1.2.1 Modulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles.....	91
II.5.3.1.2.2. Modulations post-traductionnelles	92
II.5.3.1.3. Modèle de recrutement à la membrane	94
II.5.3.1.4. Modèle d'action des BH3-only	95
II.5.3.1.4.1. Direct.....	95
II.5.3.1.4.2. Indirect ou de déplacement	95

II.5.3.1.4.3. Intégré.....	96
II.5.3.2. Bax et Bak : effecteurs de l'apoptose	96
II.5.3.2.1. Activation de Bax et Bak	96
II.5.3.2.2. Oligomérisation des effecteurs et perméabilisation mitochondriale.....	98
II.5.3.2.2.1. Modèle de dimère symétrique	98
II.5.3.2.2.2. Modèle de dimères asymétrique.....	99
II.5.3.3. Anti-apoptotiques : opposition à l'induction de l'apoptose.....	101
II.5.3.3.1. Association anti- et pro-apoptotiques	102
II.5.3.3.2. Modèle d'inhibition de l'apoptose	105
II.6. Autres types de mort cellulaire : nécrose et autophagie	106
II.6.1. La nécrose.....	106
II.6.2. L'autophagie.....	109
II.7. Implication de la famille Bcl-2 dans les processus physiologiques.....	110
II.7.1. Généralités.....	110
II.7.1. Rôle dans le développement embryonnaire	111
II.7.2. Régulation de la morphologie mitochondriale	113
II.7.3. Régulation du métabolisme au niveau de la membrane mitochondriale interne..	114
II.7.3. Régulation du métabolisme glucidique et lipidique	114
II.7.4. Régulation de l'autophagie.....	115
II.8. Altération des voies de l'apoptose dans les cancers	115
II.8.1. Mécanisme de prévention de la perméabilisation mitochondriale :.....	115
II.8.2. Mécanismes de résistance à l'apoptose situés en aval de la perméabilisation mitochondriale	116
II.9. Famille Bcl-2 et cancers : notion de “ Prime to death ”	117
II.10. Bcl-x _L et Mcl-1 : un verrou moléculaire dans les cancers de l'ovaire	119
Partie III : Modulation de l'expression et de l'activité de la famille Bcl-2.....	122
III.1. Modulation par transfert de nucléotides	124
III.1.1. Oligonucléotides anti-sens	124
III.1.2. ARN interférences	125
III.2. Modulation par les voies de signalisation.....	128
III.2.1 Impact de la voie PI3K/AKT/mTOR sur l'expression de la famille Bcl-2.....	129
III. 2.1. Impact de la voie MAPK/ERK sur l'expression de la famille Bcl-2	132
III.3. Inhibition pharmacologique directe de l'activité des protéines anti-apoptotiques par utilisation de molécules BH3-mimétiques.....	134

III.3.1. Développement des BH3-mimétiques	134
III.3.2. Les différentes catégories des BH3-mimétiques.....	135
III.3.2.1. Les peptides.....	135
III.3.2.1.1. Les peptides α / β	136
III.3.2.1.2. Les peptides stabilisés	137
III.3.2.2. Les petites molécules BH3-mimétiques	139
III.3.2.2.1. Les pan-inhibiteurs	139
III.3.2.2.1.1. Le (-)-gossypol (AT-101) et ses dérivés	139
III.3.2.2.1.2. TW37	141
III.3.2.2.1.3. S1	143
III.3.2.2.1.4. Obatoclax	143
III.3.2.2.2. Les BH3-mimétiques Bcl-2-like : ABT-737 et son analogue ABT-263.....	145
III.3.2.2.3. Les BH3-mimétiques spécifiques de Bcl-2 ou de Bcl-x _L	147
III.3.2.2.3.1 : ABT-199 : inhibiteur spécifique de Bcl-2	147
III.3.2.2.3.2 : WEHI-539 et A-1155463 : inhibiteurs spécifiques de Bcl-x _L	148
III.3.2.2.4. Mécanismes de résistance aux inhibiteurs Bcl-2/Bcl-x _L	150
III.4. Mcl-1 : une protéine unique en son genre et une potentielle cible thérapeutique	154
III.4.1. Généralités	154
III.4.2. Régulation de Mcl-1.....	156
III.4.2.1. Régulation au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel.....	156
III.4.2.2. Régulation au niveau post- traductionnel.....	157
III.4.2.2.1. Régulation par clivage protéolytique.....	157
III.4.2.2.2. Régulation par phosphorylation.....	157
III.4.2.2.3. Régulation par ubiquitination	159
III.4.3. Inhibition de l'expression et de l'activité de Mcl-1	160
III.4.3.1. Inhibition indirecte par la modulation des voies de signalisation	160
III.4.3.2. Inhibition directe par les BH3-mimétiques	162
III.4.3.2.1. MIM1 (Mcl-1 inhibitor-molecule 1).....	162
III.4.3.2.2. Marinopyrrole et ses dérivés.....	163
III.4.3.2.3. A-1210477	164
III.4.3.2.4. S63845	165
III.4.4.1. Pyridoclax : exemple d'un inhibiteur de la famille des oligopyridines.....	166
Contexte et objectifs de la thèse	168

Résultats <i>in vitro</i>	174
Partie I : Identification de nouveaux inhibiteurs de la famille des Oligopyridines.....	174
I.1. Conception des dérivés du Pyridoclax mimes de Noxa	178
I.2. Evaluation biologique des dérivés du Pyridoclax	184
I.2.1. Evaluation de l'activité pro-apoptotique	184
I.2.1.1. Effet de la MR31367 versus Pyridoclax à la concentration de 25µM	186
I.2.1.2. Effet de la MR31367 versus Pyridoclax utilisés à de faibles concentrations .	187
I.2.1.3. Evaluation de l'activité cellulaire et apoptotique en temps réel en réponse à la MR31367.....	188
I.2.1.4. Evaluation de l'effet pro-apoptotique de la MR31367 sur d'autres modèles cellulaires cancéreux et sur les cellules normales	190
I.2.1.5. La MR31367 induit une apoptose dépendante de Bak	193
I.2.1.6. Implication de Noxa, Bim et Puma dans la réponse au traitement par la MR31367.....	195
I.2.1.7. La MR31367 perturbe l'interaction de Mcl-1/Bim.....	197
I.3. Discussion et conclusions.....	200
Partie II : Evaluation de l'activité biologique des analogues de MIM1	204
II.1. Présentation de Mim1	206
II.2. Etudes antérieures : évaluation de l'effet de MIM1 sur les lignées cancéreuses ovariennes.....	206
II.3. Les analogues de MIM1 seconde génération.....	209
II.4. Evaluation biologique des analogues de MIM1 de seconde génération.	211
II.4.1. Evaluation de l'effet pro-apoptotique à 25µM.....	211
II.4.2. Evaluation de l'effet pro-apoptotique à 10µM.....	212
II.4.3. Evaluation de l'effet des analogues de MIM1 seconde génération sur les cellules A2780.....	216
II.4.4. Etablissement d'une relation structure-activité	218
II.5. Conclusion générale.....	220
Résultats <i>in vivo</i>	224
Evaluation préclinique du Pyridoclax, inhibiteur de Mcl-1	224
III.1. Effet du Pyridoclax <i>in vitro</i>	226
III.2. Les modèles de xénogreffes	228
III.3. Etude de toxicité du sel de Pyridoclax.....	229
III.4. Evaluation de l'effet du sel de Pyridoclax sur les xénogreffes de lignées tumorales ovariennes humaines.....	230

III.4.1. Effet de l'ABT-263 sur les xénogreffes de lignées tumorales ovariennes.....	230
III.4.2. Effet du sel de Pyridoclax administré par voie orale sur les différents modèles de xénogreffes.....	232
III.4.2.1. Dans les modèles de xénogreffes IGROV1-R10 et SKOV-3	232
III.4.1.2. Dans le modèle de xénogreffe A2780	234
III.4.1.3. Effet du sel de Pyridoclax administré par voie intra-tumorale sur le modèle de xénogreffe A2780.....	236
III.4.1.4. Effet du sel de Pyridoclax administré par voie intraveineuse sur les différents modèles de xénogreffes	238
III.4.1.4.1. Dans le modèle de xénogreffe A2780	238
III.4.1.1.2. Dans le modèle des IGROV1-R10	242
III.4.1.1.3. Dans le modèle SKOV-3	245
III.5. Conclusion et perspectives :	251
Discussion générale.....	256
Matériel et Méthodes.....	272
Références	292

Liste des figures

Figure 1 : Origine cellulaire des différents cancers ovariens (D'après Romero and Bast, 2012).	35
Figure 2 : Les différentes origines et sous-types histologiques associés aux tumeurs de type I et II (d'après Romero and Bast, 2012).....	37
Figure 3 : Les différents types histologiques des CSHG.....	39
Figure 4 : Modèle de transformation de l'épithélium de surface ovarien avec inclusion des kystes (Levanon et al., 2008).....	40
Figure 5 : Origine des carcinomes séreux de haut grade.....	41
Figure 6 : Impact de la taille des résidus tumoraux en fin de chirurgie sur la survie globale et la survie sans progression (du Bois et al., 2009).....	43
Figure 7 : Comparaison entre une vascularisation normale et une vascularisation tumorale.....	48
Figure 8 : L'hypothèse de la normalisation vasculaire.....	49
Figure 9 : Stratégies d'inhibition des voies de l'angiogenèse tumorale.	51
Figure 10 : Mécanisme de résistance au traitement à base des dérivés de platine (Dilruba and Kalayda, 2016).....	55
Figure 11 : Mécanismes de résistance au taxane (Kavallaris, 2010).....	56
Figure 12 : Prédiction de la réponse à la chimiothérapie des cancers ovariens récidivants en fonction de la classification clinique basée sur l'intervalle libre de platine.	57
Figure 13 : Mécanisme de réparation de l'ADN par excision de base.	60
Figure 14 : Figure 14. Illustration des changements morphologiques de la cellule en cours du processus d'apoptose (Kerr et al., 1995).	66
Figure 15 : Les différentes voies d'induction de l'apoptose.	67
Figure 16 : Les différents récepteurs de mort et plateforme moléculaire de signalisation apoptotique (Ashkenazi, 2002).	68
Figure 17 : Présentation de l'apoptose intrinsèque dépendante et indépendante des caspases (Galluzzi et al., 2012).....	70
Figure 18 : Modèle de perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (Shoshan-Barmatz et al., 2015).....	71
Figure 19 : La réponse UPR.	73
Figure 20 : Régulation de l'homéostasie calcique par la famille Bcl-2.....	75
Figure 21 : Structure des différentes caspases et leur classification basée sur leur fonction chez les mammifères. (Shalini et al., 2015)	76
Figure 22 : Processus d'exécution de l'apoptose induite par les caspases (D'après Taylor et al., 2008).	77
Figure 23 : Caractéristiques de la famille Bcl-2.	79
Figure 24 : Domaine BH3 et son interaction avec la cavité hydrophobe des anti-apoptotiques.	81
Figure 25 : Comparaison entre les structures de Bcl-x _L et Bcl-2.	82
Figure 26 : Poche hydrophobe de Bcl-w.	84
Figure 27 : Structure 3D de la protéine Mcl-1 (RMN).....	85
Figure 28 : Structure 3D de la protéine Bax (RMN).	86
Figure 29 : Structure 3D de la protéine Bak (RMN).	86
Figure 30 : Structure des protéines Bax et Bak.	87

Figure 31 : Structure de Bid en solution.....	88
Figure 32 : Réseau d'interactions fonctionnelles entre les membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.....	89
Figure 33 : Mécanismes de régulation des BH3-only.	91
Figure 34 : Mode d'action des BH3-only.....	95
Figure 35 : Modèle d'activation de Bax.	97
Figure 36 : Modèle d'activation de Bak et de son homodimérisation ou son interaction avec les anti-apoptotiques (d'après Dewson et al., 2008).	98
Figure 37 : Modèle symétrique d'activation de Bax et Bak.	99
Figure 38 : Modèle asymétrique d'activation de Bax et Bak.	100
Figure 39 : Schéma illustrant les différences entre les pores de nature protéique et les pores de nature lipidique.....	100
Figure 40 : Structure 3D du complexe Bcl-x _L /Bak (RMN).....	102
Figure 41 : Changement dans la conformation de Bcl-x _L après son interaction avec les peptides de Bim, Bak et Bad.	104
Figure 42 : Schéma récapitulatifs des différences morphologiques lors de la mort par apoptose et par nécrose.....	107
Figure 43 : Différents mécanismes d'induction de la nécrose (d'après (Proskuryakov et al., 2003)).	108
Figure 44 : Figure 44. Le processus autophagique.....	110
Figure 45 : Rôles des membres de la famille Bcl-2 dans la cellule.....	111
Figure 46 : Le modèle « Prime to death ».	120
Figure 47 : Mécanisme d'inhibition de l'expression de l'ARNm par les OAS (D'après Kole et et al, 2012).....	124
Figure 48 : Mécanisme d'action des ARNs interférents dans les cellules mammifères.....	127
Figure 49 : Exemples d'interactions permettant à la voie MAPK/ERK de réguler la voie PI3K/Akt/mTOR.	128
Figure 50 : Exemples de molécules ciblant des protéines de la voie PI3K/Akt/mTOR.....	130
Figure 51 : Exemples de molécules ciblant les différents éléments de la voie MAPK/ERK.....	133
Figure 52 Mode d'action des BH3-mimétique au niveau de la mitochondrie (Dai et al., 2016).....	134
Figure 53 : Stratégie de sensibilisation des cancers hématologiques résistants aux inhibiteurs pharmacologiques par l'utilisation de molécules BH3-mimétiques.....	138
Figure 54 : Structure chimique du (-)-gossypol (AT-101).	139
Figure 55 : Structure chimique du Sabutoclax (BI-97C).....	141
Figure 56 : Conception structurale de la molécule TW37 à partir de la structure du gossypol.....	142
Figure 57 : Structure chimique du produit S1	143
Figure 58 : Structure chimique de l'obatoclax (GX15-070).....	143
Figure 59 : Structure de l'ABT-737 et de son analogue ABT-263.	145
Figure 60 : Mécanismes de sensibilité et de résistance aux molécules d'ABT.	151
Figure 61 : Modèles de résistance à la chimiothérapie (A) et aux thérapies ciblées (B).....	153
Figure 62 : Représentation schématique de la protéine Mcl-1 humaine illustrant les régions fonctionnelles et les différents sites de modifications post-traductionnelles.....	158

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification des cancers de l’ovaire selon la Fédération Internationale de Gynécologie et Obstétrique (FIGO).	34
Tableau 2. Caractéristiques des carcinomes ovariens.	36
Tableau 3. Avantages et inconvénients de la CIP et la CHIP.....	46
Tableau 4. Tableau récapitulatif des différentes molécules et leur substitution respective.....	180
Tableau 5. Récapitulatif des différents analogues de MIM1 de seconde génération	210
Tableau 6. Récapitulatif des expériences réalisées in vivo pour évaluer l’efficacité antitumorale du sel de Pyridoclax et sa toxicité associée	250
Tableau 7. Description des différents anticorps utilisés en western-blot	279
Tableau 8. Caractéristique des différents modèles de xénogreffes de lignées tumorales ovariennes .	284
Tableau 9. Récapitulatif des différents anticorps utilisés dans l’étude immuno-histochimique	288

Abréviations

3D	Tridimensionnel
4E-BP1	eIF4E Binding Protein 1
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AIF	Apoptosis Inducing Factor
Akt / PKB	Protein Kinase B
ALT	Alanine Aminotransférase
AMBRA	Activating Molecule in Beclin-1-Regulated Autophagy
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
APAF1	Apoptotic Protease-Activating Factor 1
APE	Apurinic/apyrimidinic Endonuclease
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
AST	Aspartate Aminotransférase
ATF6	Activating Transcription Factor-6α
ATP	Adénosine TriPhosphate
ATPase	Adénosine TriPhosphate hydrolase
AUC	Area Under the Curve
AVPI	Alanine-Valine-Proline-Isoleucine
Bad	Bcl-x _L /Bcl-2 Associated Death protein
Bak	Bcl-2 homologous Antagonist-Killer protein
Bax	Bcl-2-Associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-w	Bcl-2-like 2
Bcl-x_L	B cell lymphoma x Long isoform
Bfl1/A1	Bcl-2-related protein A1
BH	Bcl-2 Homology
Bid	BH3 interacting domain death agonist protein
Bif-1	Bax-interacting factor 1
Bik	Bcl-2 interacting killer
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
Bip	Binding immunoglobulin protein
BIR	Baculoviral IAP Repeat
Blf	B-cell lymphocyte kinase
Bmf	Bcl-2-modifying factor
BNIP3	BCL2 Interacting Protein 3
Bok	Bcl-2-related ovarian killer
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
BRCA	BReast CAncer gene
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer
CA 125	Cancer Antigen 125
CARD	Caspase Recruitment Domain
Caspase	Apoptosis-related cysteine peptidase
CCC	Carcinomes à Cellules Claires
CDDP	Cis-DiamineDichloroPlatine
CDK	Cyclin Dependent Kinase
CE	Carcinome Endométrioides
CERMN	Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie
CHIP	Cimiothérapie Hyperthermique IntraPéritonéale
CHOP	CCAAT-enhancer-binding protein Homologous Protein
CIP	Chimiothérapie IntraPéritonéale
CLCC	Centre de Lutte Contre le Cancer
CM	Carcinomes Mucineux
COX	Cytochrome c OXydase

CPT	Carnitine Palmitoyl-Transferase
CREB	C-AMP Response Element-Binding protein
CSBG	Carcinome Séreux de Bas Grade
CSHG	Carcinome Séreux de Haut Grade
CTNA	ChimioThérapie Néoadjuvante
CTNNB1	Catenin Beta 1
CTR1	Copper Transporter 1
DAPI	4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole
DED	Death Effector Domain
DIABLO	Direct IAP Binding protein with LOw isoelectric point
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DMSO	DiMethylSulfOxide
DR	Death Receptor
DRP	Dynamin-Related Protein
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
eIF2α	eukaryotic Initiation Factor 2
ENDO G	Endonucléase G
ERAD	Endoplasmic Reticulum Associated Degradation
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
Elk-1	E26-transformation-specific-like transcription factor 1
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
exo-siRNA	Exogenous small interfering RNA
Fc	Fragment crystallizable
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie Obstétrique
cFLIP	(FADD-Like IL-1 β -converting enzyme)-Inhibitory Protein
FoxO	Forkhead Box Transcription factor
FPA	Test de polarisation de fluorescence
GM-CSF	Granulocytes Macrophage Colony-Stimulating Factor
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
GSH	Glutathion
HER	Human Epidermal Receptor
HES	Hématoxyline Eosine Safran
HIF	Hypoxia-Inducible Factor
HNSCC	Head and Neck Squamous-Cell Carcinoma
HGSOC	High-Grade Serous Ovarian Carcinoma
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HRD	Homologous Recombination Deficiency
Hrk/DP5	Harakiri
HTRA2	High Temperature Requirement protein A2
IAP	Inhibitor of Apoptosis Proteins
cIAP	cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins
IHC	ImmunoHistoChimie
IL	Interleukine
ILP2	Insulin-Like Peptide 2
INCa	Institut National du Cancer
IP	IntraPéritonéale
IP3R	Inositol 1,4,5 triphosphate
IPP	Interactions Protéine-Protéine
IRE-1α	Inositol-Requiring Enzyme-1 α

IRM	Imagerie à Résonnance Magnétique
IV	IntraVeineux
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
K_a	Constante d'association
K_d	Constante de dissociation
KD	Constante d'affinité
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LBD	Lipid Binding Domains
LC3	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3
MAP	Microtubule Associated Protein
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
MCU1	Calcium Uniporter Protein, Mitochondrial
MDM2	Murine Double Minute 2
MDS	Simulation de Dynamique Moléculaire
MEK	MAPK kinase
c-Met	Hepatocyte Growth Factor Receptor
MFN	MitoFusiN
MIM-1	Mcl-1 Inhibitor Molecule 1
MIMP	Met-Induced Mitochondrial Protein
miRNA	micro RNA
ML-IAP	MeLanoma Inhibitor of Apoptosis Protein
MMR	MisMatch Repair
MRP2	Multi-drug Resistance Protein 2
MTCH2	MiTochondrial Carrier Homologue 2/)
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
mTORC1	mTOR Complex 1
mTORC2	mTOR Complex2
MULE	Mcl-1 Ubiquitine Ligase E3
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
NAIP	Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein
NER	Nucleotide Excision Repair
NFκB	Nuclear Factor kappa B
NK	Natural Killer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate
Noxa	NADPH Oxidase Activator
OAS	Oligonucléotides Anti-Sens
OPA	OPtic Atrophy
p53	protein of 53 kDa
PACT	PKA ACTivaing protein
PALB2	PARTner and Localizer of BRCA2
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymerase
PAX8	PAired boX gene 8
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PDX	Patient-Derived Xenograft
PE	PhosphatidylEthanolamine
PERK	Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase
PEST	Proline (P), Acide glutamique (E), Sérine (S), Thréonine (T)
PI3K	PhosphoInositide-3-Kinase
PI	PhosphoInositide

PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-3-kinase, catalytic subunit alpha
pi-RNA	PIWI-associated RNA
PLCγ	PhosphoLipase C γ
PLD	Pegylated Liposomal Doxorubicin
PPP2R1A	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform
PS	Phosphatédylesérine
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
PTP	Permeability Transition Pore
Puma	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
Ras	Rat sarcoma
Raptor	Regulatory-associated <i>protein</i> of mTOR
RE	Réticulum endoplasmique
RET	Transfert d'Energie de Résonance
RH	Recombinaison Homologue
RISC	RNA-induced silencing complex
RING	Really Interesting New Gene
RLC	RISC-Loading Complex
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RNase	RiboNucléase
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RU	Unité de Résonance
S6K1/p70S6K	S6 Kinase 1 protein
SAHB	Stabilized α -Helices of Bcl-2 domain
SERCA	Sarco/endoplasmic reticulum ATPase
shRNA	Small hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
SMAC	Second Mitochondrial Activator of Caspases
SPR	Surface Plasmon Resonance
SRF	Serum Response Factor
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STIC	Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma
TEP	Tomographie par Emission de Positons
TM	TransMembrane
TNF	Tumor Necrosis Factor
TOM	Translocase of Outer Membrane
TP53	Tumor Protein P53
TRADD	(Tumor necrosis factor Receptor 1)-Associated Death Domain
TRAIL	Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand
TRBP	TAR RNA Binding Protein
Trim	TRipartite Motif containing
ULK	Unc-51-Like Kinases
UPR	Unfolded Protein Response
USP9X	Ubiquitin Specific Peptidase 9, X-linked
UTR	UnTranslated Region
UVRAG	UV Radiation Resistance Associated Gene
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein
XRCC	X-Ray Repair Cross-Complementing protein
YFP	Yellow Fluorescent Protein

Introduction générale

Le cancer de l'ovaire est parmi les maladies gynécologiques les plus agressives. En France, 4600 nouveau cas et plus de 3200 décès sont enregistrés chaque année. Ce sombre pronostic est dû au caractère asymptomatique de la maladie, la plupart des patientes voyant leur maladie diagnostiquée à un stade tardif. Le traitement de référence est la chirurgie suivie d'une chimiothérapie à base de platine et de paclitaxel. Une bonne réponse à la première ligne de traitement est généralement observée, malheureusement suivie à relativement court terme d'une récurrence de la maladie souvent associée à une résistance au traitement et responsable d'une survie à 5 ans inférieure à 30%.

A ce jour, il n'existe pas de traitement alternatif satisfaisant. Il est donc urgent de développer de nouvelles stratégies pour améliorer la prise en charge des patientes atteintes d'un cancer ovarien.

Dans ces cancers, notre unité a mis en évidence l'implication des protéines anti-apoptotiques Bcl-x_L et Mcl-1 dans la survie des cellules cancéreuses ovariennes, et montré que leur inhibition concomitante est nécessaire et suffisante pour entraîner leur mort par apoptose. Ces protéines constituent donc des cibles pertinentes pour le traitement des cancers de l'ovaire.

Différentes stratégies ont été développées pour induire l'inhibition de l'expression de ces protéines, telles que l'utilisation d'oligonucléotides antisens ou de siARN. Cependant leur utilisation *in vivo* est limitée par leur instabilité sérique et intracellulaire, par l'absence de méthodes de vectorisation satisfaisantes et parfois du fait de leur toxicité. L'expression des protéines Bcl-x_L et Mcl-1 peut aussi être ciblée par utilisation d'inhibiteurs des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de leur expression. Ces stratégies sont en cours d'évaluation y compris dans notre unité, mais la toxicité des associations d'inhibiteurs envisagées peut constituer un frein à leur développement. Au cours de cette dernière décennie, une nouvelle stratégie a émergé pour contrecarrer l'activité de ces anti-apoptotiques, basée sur l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques directs de ces protéines, mimes du domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques et de ce fait qualifiées de BH3-mimétiques.

L'ABT-737 ou son analogue administrable par voie orale l'ABT-263 (Navitoclax), développé par le laboratoire pharmaceutique Abbvie, est l'une des premières molécules BH3-mimétique à avoir été créée pour inhiber Bcl-x_L. Toutefois elle ne manifeste aucune affinité pour Mcl-1,

qui constitue ainsi l'une des principales protéines responsables de la résistance à cette molécule.

L'inhibition de Mcl-1 représente un enjeu majeur pour la sensibilisation aux molécules ciblant Bcl-2 et/ou Bcl-x_L, ou pour induire l'apoptose dans les cellules qui dépendent strictement de Mcl-1 pour leur survie.

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon projet de thèse réalisé au sein de l'Axe « Biologie et Thérapies Innovantes des Cancers de l'Ovaire » (BioTICLA) de l'unité ANTICIPE. L'objectif de mon travail a donc porté sur deux volets différents.

Le premier volet a consisté à cribler des molécules appartenant à différentes familles chimiques (Oligopyridines dérivées du Pyridoclax, ou analogues de MIM1) dans le but d'identifier de nouveaux inhibiteurs de Mcl-1 plus actifs que les molécules dont ils sont issus. Nous avons évalué l'activité biologique de ces molécules sur les lignées cancéreuses ovariennes chimiorésistantes IGROV1-R10, A2780 et SKOV-3.

Le deuxième volet a consisté en l'évaluation préclinique du sel de Pyridoclax, « Lead » de la première génération des oligopyridines précédemment identifié par notre équipe. Nous avons étudié l'effet de différentes doses de Pyridoclax administrées par différentes voies d'administration *in vivo*, en agent seul ou en combinaison avec l'ABT-263 sur différents modèles tumoraux établis à partir des lignées chimiorésistantes de cancers ovariens.

Mon manuscrit de thèse contient une introduction bibliographique qui présente les cancers de l'ovaire et leur prise en charge thérapeutique, l'apoptose et l'implication de la famille Bcl-2 et enfin les possibilités de modulation de l'activité des protéines anti-apoptotiques. Il présente ensuite les différents résultats obtenus sur l'évaluation *in vitro* des différentes familles de molécules évaluées, ainsi que l'effet anti-tumoral du sel de Pyridoclax administré *in vivo*. L'ensemble des résultats est suivi d'une discussion générale présentant les perspectives de ce travail. Le matériel et méthode est également inclus en fin de manuscrit, suivi des références bibliographiques.

Introduction

Partie I : les cancers de l’ovaire et leur prise en charge

I.1. Généralités

Le cancer de l'ovaire est le 7^{ème} cancer le plus fréquent dans le monde et la 8^{ème} cause de décès par cancer chez la femme. Chaque année, environ 240.000 cas sont diagnostiqués et près de 150.000 cas de décès sont enregistrés (Ferlay et al., 2015). En France, selon le rapport 2015 de l'Institut National du Cancer (INCa), le cancer de l'ovaire constitue la première cause de décès par cancer gynécologique (3132 décès/an). Avec près de 4580 nouveaux cas/an, la fréquence du cancer de l'ovaire reste relativement faible au regard des autres cancers tels que le cancer du côlon-rectum ou celui du sein. Cependant, le rapport mortalité/incidence est nettement plus élevé, preuve évidente de la gravité de ce cancer.

Certaines femmes peuvent présenter un risque plus élevé que la moyenne d'être atteintes d'un cancer de l'ovaire et cela est lié à plusieurs facteurs dont certains sont essentiels tels que l'âge, l'hérédité et les facteurs hormonaux. L'âge contribue à l'apparition de plusieurs cancers dont le cancer de l'ovaire par accumulation progressive des altérations géniques dans les cellules. Ces altérations peuvent également être transmises d'une génération à une autre, conduisant à l'apparition des cancers chez les membres de la même famille. Dans les cancers de l'ovaire, 5 à 10% des cancers de type épithélial sont d'origine héréditaire dont neuf sur dix sont liés à la mutation des gènes BRCA1 et BRCA2 impliqués dans le contrôle de la réplication d'ADN. Les personnes prédisposées génétiquement bénéficieront d'une consultation oncogénétique afin d'identifier des mutations suspectées comme étant à l'origine du risque familial et leur offrir une surveillance particulière. L'historique hormonal de la femme influence également le risque de cancers de l'ovaire. En effet, les grossesses répétées, l'allaitement et les contraceptions réduisent le nombre d'ovulations et diminuent le risque des cancers. A l'inverse, la puberté précoce, la ménopause tardive et l'hormonothérapie souvent utilisée pour contrôler les symptômes de la ménopause augmentent les risques de cancers de l'ovaire. D'autres facteurs de risque sont aussi suspectés de favoriser l'apparition de cancers de l'ovaire tels que l'obésité, le tabagisme et des facteurs environnementaux.

Le caractère asymptomatique de cette maladie et le manque de moyens de dépistage sont les raisons pour lesquelles le cancer de l'ovaire est souvent diagnostiqué à un stade avancé (stade III ou IV). Le traitement standard consiste en une exérèse chirurgicale suivie d'un traitement par chimiothérapie associant un dérivé du platine (carboplatine) et un taxane (paclitaxel). Malgré de bons taux de réponse à ce traitement initial, les rechutes fréquentes et l'acquisition d'une chimiorésistance sont responsables des échecs thérapeutiques. De ce fait, la survie

globale des patientes à 5 ans, tous stades confondus, n'atteint que 45%. L'identification de nouvelles stratégies pour traiter les cancers de l'ovaire sont indispensables.

I.2. Description des cancers de l'ovaire

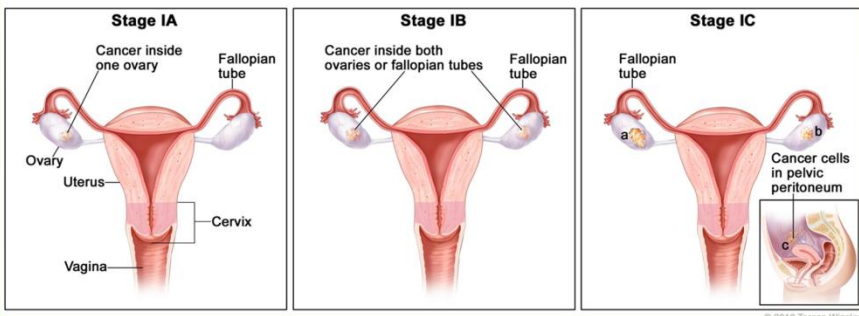
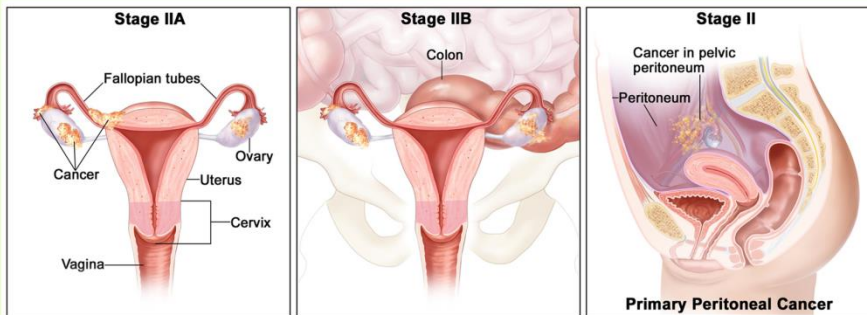
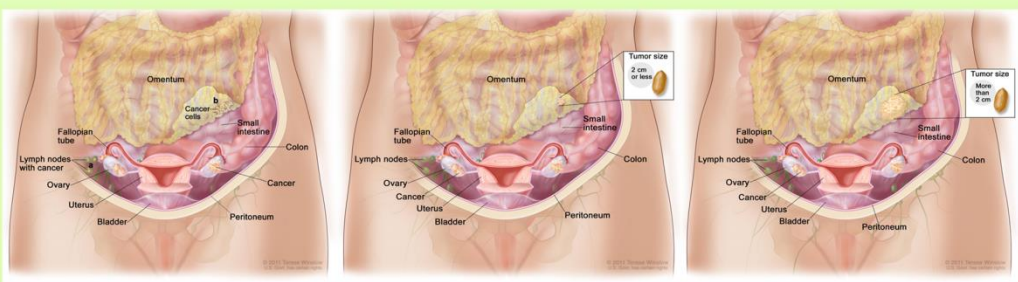
Le cancer de l'ovaire est une maladie très hétérogène sur le plan histologique et moléculaire et se présente sous différentes formes dans la cavité pelvienne. Elle se trouve localisée sous forme de tumeur primaire au niveau des ovaires ou disséminée par les voies lymphatique et sanguine vers les ganglions et les parenchymes des organes distants, mais également à travers la cavité abdominale formant ainsi des nodules tumoraux à la surface péritonéale et favorisant l'accumulation de liquide péritonéal (ascite). Cette caractéristique des cancers de l'ovaire augmente leur degré d'agressivité. Ainsi, la classification de ces cancers représente une étape importante pour assigner les patientes et leurs tumeurs à des groupes de pronostic aboutissant à un traitement individuel et spécifique pour chaque pathologie (Prat, 2014).

I.2.1. Classification des cancers de l'ovaire

La classification établie par la Fédération Internationale de la Gynécologie et Obstétrique (FIGO), établie en 1988 à Rio de Janeiro et actualisée en 2014, permet de définir le stade de dissémination de la tumeur et de décider de la prise en charge de ces cancers. Cette classification est principalement basée sur des critères chirurgicaux établis en fonction de l'étendue de la maladie et de l'histopathologie déterminée en fonction du type cellulaire constituant la tumeur (grade) (Mutch and Prat, 2014). En fonction de la dissémination de la tumeur, les cancers de l'ovaire sont classés en 4 stades différents, allant du stade I où la tumeur primaire est confinée au niveau des ovaires, jusqu'au stade IV où la tumeur est disséminée en dehors de la cavité abdominale. Le stade tumoral est donc un facteur majeur pronostique des cancers de l'ovaire. Les différents critères correspondants à chacun des stades sont représentés dans le Tableau 1.

Le grade des cancers de l'ovaire définit l'agressivité de la maladie en se basant sur les observations microscopiques des biopsies. Les cancers sont donc classés en bas grade, lorsque les tumeurs sont composées de cellules cancéreuses semblables aux cellules normales et peu prolifératives, ou bien en haut grade lorsque les cellules cancéreuses sont très différentes des cellules normales et très proliférantes (Shih and Kurman, 2004).

Tableau 1. Classification des cancers de l'ovaire selon la Fédération Internationale de Gynécologie et Obstétrique (FIGO).

Stades	Description
I (T1-N0-M0)	Tumeur limitée aux ovaires ou aux trompes de Fallope
IA (T1a-N0-M0)	La tumeur est limitée à un des deux ovaires (capsule intacte) ou aux trompes de Fallope. Absence de tumeurs au niveau de la surface épithéliale ovarienne ou tubaire. Absence de cellules cancéreuses dans l'ascite et le liquide péritonéal.
IB (T1b-N0-M0)	La tumeur est limitée aux deux ovaires (capsule intacte) ou aux trompes de Fallope. Absence de tumeurs à la surface épithéliale ovarienne ou tubaire. Absence de cellules cancéreuses dans l'ascite ou dans le liquide péritonéal.
IC (T1c1-N0-M0)	La tumeur est limitée dans l'un ou les deux ovaires ou aux trompes de Fallope avec les caractéristiques suivantes:
IC1 (T1c1-N0-M0)	Déversement chirurgical
IC2 (T1c2-N0-M0)	Rupture de la capsule ovarienne avant chirurgie conduisant au développement tumorale à la surface épithéliale ovarienne ou tubaire
IC3 (T1c3-N0-M0)	Présence de cellules cancéreuses dans l'ascite ou dans le liquide péritonéal
	
II (T2-N0-M0)	Tumeur impliquant l'un ou les deux ovaires ou les trompes de Fallope avec une extension pelvienne ou tumeur péritonéale primaire
IIA (T2a-N0-M0)	Extension et/ou implantation au niveau de l'utérus, trompes de Fallope et/ou les ovaires
IIB (T2b-N0-M0)	Extension vers d'autres tissus pelviens intrapéritonéaux
	
III (T1/T2-N1-M0)	Tumeur impliquant l'un ou les deux ovaires ou les trompes de Fallope ou tumeur péritonéale primaire avec une propagation au péritoine extra-pelvien confirmés cytologiquement et histologiquement avec ou sans métastases aux niveaux des ganglions lymphatiques rétro-péritonéaux
IIIA (T1/T2-N1-M0)	Métastases restreintes aux ganglions lymphatiques rétro-péritonéaux :
IIIA1(i) : Métastases jusqu'à 10mm de diamètre	
IIIA1(ii) : Métastases ≥ 10mm de diamètre	
IIIA2 (T3a2-N0/N1-M0)	Métastases microscopiques extra-pelviennes impliquant la cavité péritonéale avec ou sans métastases aux niveaux des ganglions lymphatiques rétro-péritonéaux
IIB (T3b-N0/N1-M0)	Métastase péritonéales macroscopiques extra-pelvienne ≤ 2cm de diamètre avec ou sans métastases aux niveaux des ganglions lymphatiques rétro-péritonéaux
IIIC (T3c-N0/N1-M0)	Métastases péritonéales macroscopiques extra-pelvienne ≥ 2cm de dimension avec ou sans métastases au niveau des ganglions lymphatiques (impliquant l'extension au niveau des capsules du foie et de la rate sans métastases parenchymateuses dans les organes)
	
IV (T1/T2-N1-M0)	Métastases à distance impliquant la métastases péritonéales
IVA (T1/T2-N0/N1-M1)	Epanchement pleural avec une cytologie positive
IVB (T1/T2-N0/N1-M1)	Métastases parenchymateuses et métastases aux niveaux des organes extra-abdominaux (impliquant les ganglions lymphatiques hors cavité abdominale).

Les cancers de l’ovaire sont composés de plusieurs types histologiques issus de 3 différents types cellulaires : épithéliales, germinales ou stromales (Figure 1). Les cancers de type épithélial appelés aussi « carcinomes » sont les cancers ovariens les plus fréquents (90%). Ils sont constitués d’au moins cinq principaux sous-types de carcinomes ovariens : les Carcinome Séreux de Haut Grade (CSHG) (70%), les Carcinomes Séreux de Bas Grade (CSBG) (5%), les Carcinome Endométrioides (CE) (10%), les Carcinomes à Cellules Claires (CCC) (10%) et les Carcinomes Mucineux (CM) (3%). D’autres tumeurs telles que les tumeurs de cellules germinales, celles du cordon sexuel et de stroma sont beaucoup moins fréquentes que les carcinomes et ne représentent que 10% des cancers de l’ovaire (Figure 1). Contrairement aux cancers épithéliaux, ces tumeurs sont bénignes et se développent à partir des cellules ovariennes d’origine non épithéliale (Shih and Kurman, 2004 ; Karnezis et al., 2016).

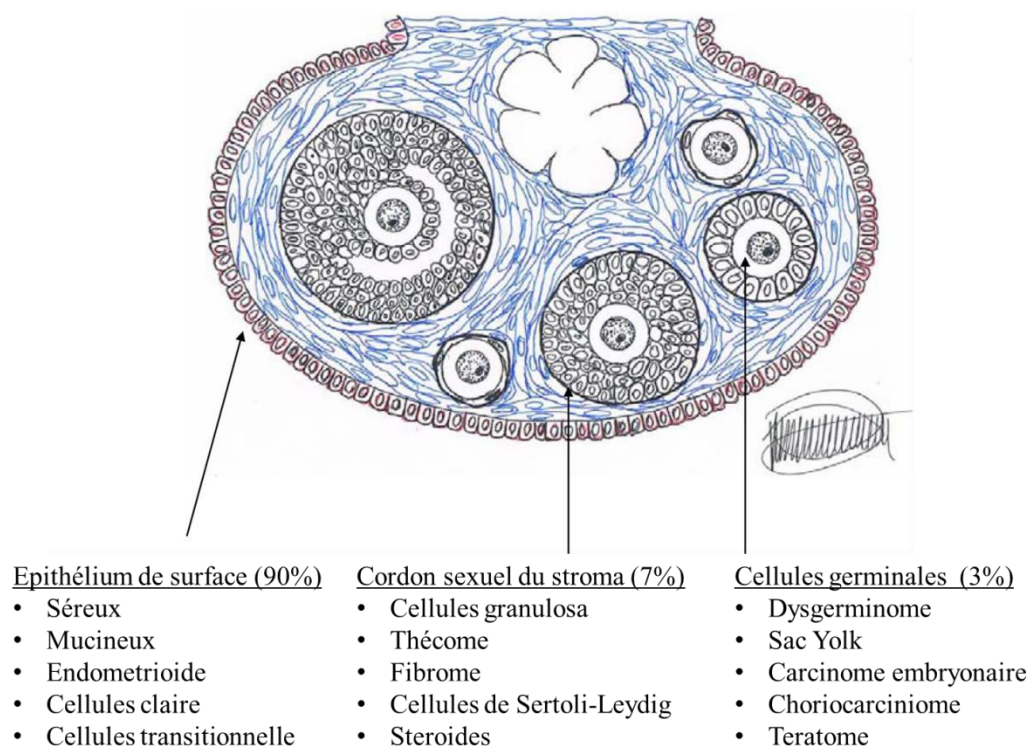


Figure 1 : Origine cellulaire des différents cancers ovariens (D’après Romero and Bast, 2012).

Les cancers épithéliaux représentent une très grande diversité de par leur épidémiologie, leurs facteurs génétiques, leur origine et modèle de dissémination, leur oncogénèse, leur réponse aux traitements et leur pronostic (Prat, 2012 ; Gilks and Prat, 2009) (Tableau 2).

Tableau 2. Caractéristiques des carcinomes ovariens.

	Carcinomes Séreux Haut Grade (CSHG)	Carcinomes Endométrioïdes (ED)	Carcinomes à Cellules Claires (CCCC)	Carcinomes Mucineux (CM)	Carcinomes Séreux Bas Grade (CSBG)
Epidémiologie	70% Stade III ou IV	10% stade I et II	10% stade I et II	3%	5%
Facteurs de risque	BRCA1, BRCA2, RAD51C et RAD51D	HNPCC (Syndrome de Lynch)	HNPCC (Syndrome de Lynch)	?	?
Tissus d'origine	Extrémité distale des trompes de Fallope (Fimbria) Kystes d'inclusion corticale ovarienne	Endométriose ou Adénofibrome Endométrioïde	Endométriose ou Adénofibrome Endométrioïde	?	Endosalpingiose, hyperplasie papillaire tubaire
Lésions précurseurs	Carcinome intrapéritonéale tubaire Séreux (CITS)	Endométriose	Endométriose	Cystadénome/ tumeurs borderlines	Tumeurs séreux borderlines
Modèles de dissémination	Une métastase Trans-péritonéale précoce	Localisé au niveau de la cavité pelvienne	Localisé au niveau de la cavité pelvienne	Localisé au niveau des ovaires	Métastase trans-péritonéale
Anomalies moléculaires	<i>TP53, BRCA1/2 (instabilité chromosomique)</i>	<i>PTEN, PIK3CA, CTNNB1</i>	<i>HNFI, ARID1A, PTEN</i>	<i>KRAS, HER2</i>	<i>BRAF, KRAS, ERBB2</i>
Pléomorphisme nucléaire, et Activité mitotique	Fort niveau de nucléo-morphisme et forte activité mitotique	Nucléomorphisme modéré et faible activité mitotique	Pléomorphisme faible et activité mitotique rare	?	Uniformité nucléaire et faible activité mitotique
Stratégies de prévention	Contraception orale, ligature des trompes de Fallope, salpingectomie opportuniste, salpingo-oophorectomie	Ligature des trompes de Fallope, Salpingectomie opportuniste, contraception orale	Ligature des trompes de Fallope, Salpingectomie opportuniste ou contraception orale	Ligature des trompes de Fallope, contraception orale	?
chimio –sensibilité (platine/taxane)	Forte	Forte	Faible	Faible	Faible
Pronostic	Mauvais	Favorable	Intermédiaire	Favorable	Intermédiaire

Une nouvelle classification établie en 2014 a permis de distinguer deux grandes catégories de cancers épithéliaux de l'ovaire ; les tumeurs de type I et de type II (Shih and Kurman, 2004). Ces deux catégories de tumeurs ont été classées selon leurs caractéristiques morphologiques (origine), immunohistochimiques, leur altération génétique et leur tumorigenèse (Figure 2). Ce modèle de classification a été réactualisé très récemment par les mêmes auteurs (Kurman and Shih, 2016).

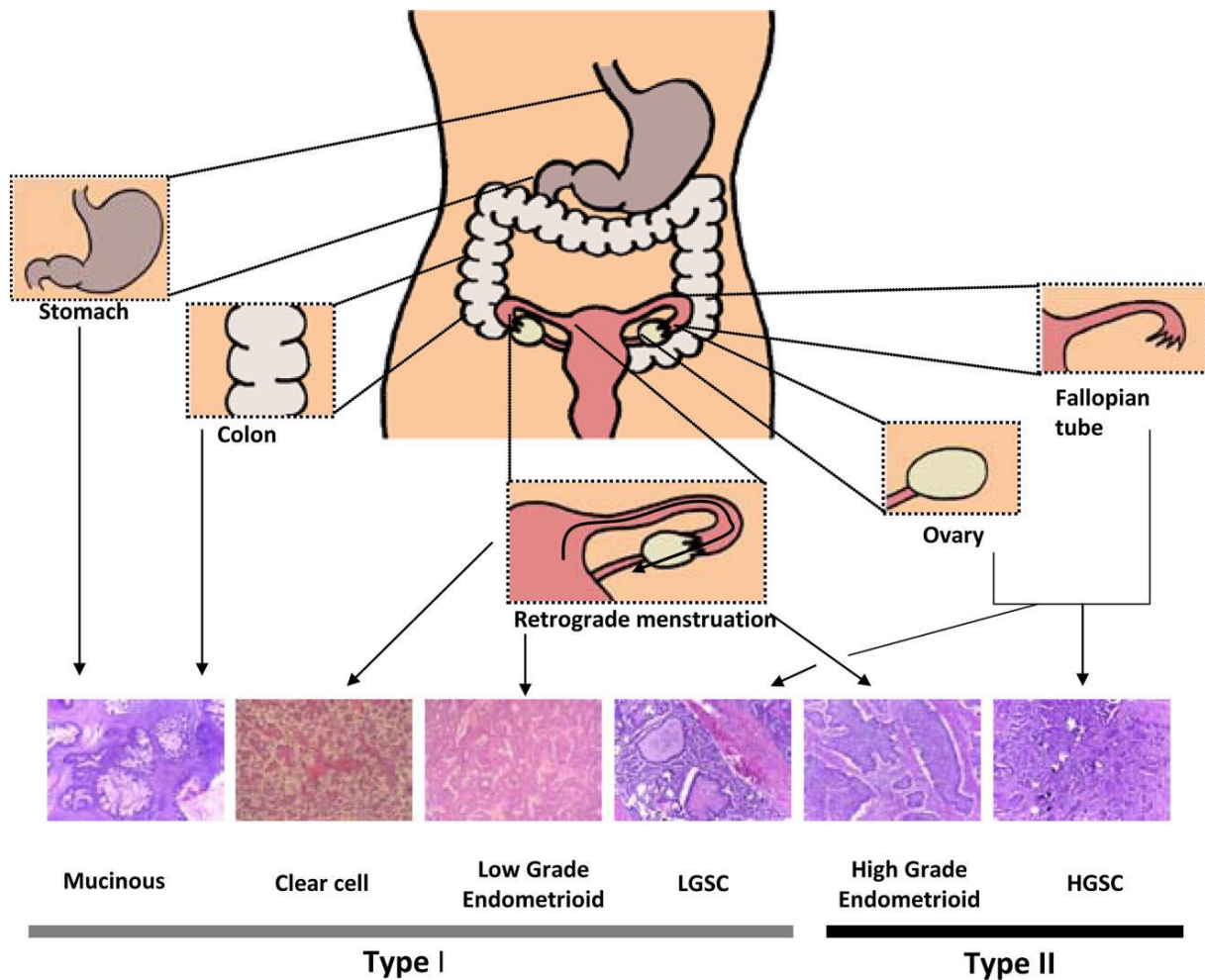


Figure 2 : Les différentes origines et sous-types histologiques associés aux tumeurs de type I et II (d'après Romero and Bast, 2012)

Les tumeurs de type I sont cliniquement indolentes, souvent diagnostiquées dans les premiers stades de la maladie (stade I ou II). Elles sont très différentes sur le plan histologique à cause de leur origine distincte ce qui permet une classification facile par le pathologiste en carcinomes séreux et endométrioides de bas grade, carcinomes à cellules claires et carcinomes mucineux (Figure 2). Ces tumeurs sont caractérisées par une stabilité chromosomique avec une fréquente altération des grandes voies de signalisation telles que ; l'activation constitutive de la voie PI3K/AKT et/ou MAPK (mutations gain de fonction de *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, mutations perte de fonction des régulateurs négatifs comme *PTEN* et *PPP2R1A*), l'activation de la voie Wnt- β -caténine (mutation du gène *CTNNB1* codant pour la β -caténine) ou la voie de l'instabilité des microsatellites. Ces tumeurs sont originaires de lésions précurseurs telles que les fibromes (cystadénomes), les tumeurs borderlines et l'endométriose (Kurman and Shih, 2011).

Les tumeurs de type II ont des différences histologiques très subtiles établies en fonction du modèle cellulaire prédominant (papillaire, glandulaire ou kystique) en carcinomes séreux de haut grade, carcinomes endométrioides de haut grade ou carcinomes indifférenciés (Figure 2). Les tumeurs mixtes müllériennes (tumeurs rares et agressives de l'utérus) sont également incluses dans cette catégorie. Ces tumeurs présentent une instabilité chromosomique majeure (avec fréquentes pertes / gains de locus chromosomiques), secondaire à l'inactivation des gènes impliqués dans l'intégrité génomique comme *TP53* et *BRCA1/2*, mais elles arborent rarement les mutations retrouvées dans les tumeurs de type I. L'histogenèse de ces tumeurs semble être très différente, expliquant leur profil moléculaire et leur comportement clinique différent (Kurman and Shih, 2011).

Les carcinomes séreux de haut grade sont les cancers épithéliaux de l'ovaire les plus fréquents et les plus agressifs et c'est à eux que notre unité s'intéresse particulièrement.

I.2.2. Les Carcinomes séreux de haut grade

I.2.2.1. Caractéristiques des carcinomes séreux de haut grade

Les carcinomes séreux de haut grade (CSHG ou plus communément HGSO) sont de loin les cancers ovariens les plus fréquents et les plus meurtriers. Approximativement 80% de ces cancers sont diagnostiqués à des stades très avancés de la maladie. Ils sont composés de cellules de tailles différentes, généralement organisées selon une architecture histologique micropapillaire contenant des espaces en fonte typiques et un important pléomorphisme nucléaire caractéristique de cette catégorie de tumeurs. Ce dernier critère est souvent utilisé par les pathologistes pour distinguer les carcinomes séreux de haut grade de ceux de bas grade. Cependant, à un degré d'atypies nucléaires équivalent, l'index mitotique, largement supérieure dans les CSHG, peut être utilisé comme un critère distinctif de ces deux types tumoraux (Gilks and Prat, 2009). Les tumeurs CSHG sont souvent associées à des composantes glandulaires, micro-cystiques ou solides qui sont à l'origine de confusions avec les carcinomes endométrioides, à cellules claires ou indifférenciés (Figure 3). Dans tous ces cas de figure, la présence d'au moins une caractéristique des CSHG suffit à éliminer toutes les autres possibilités.

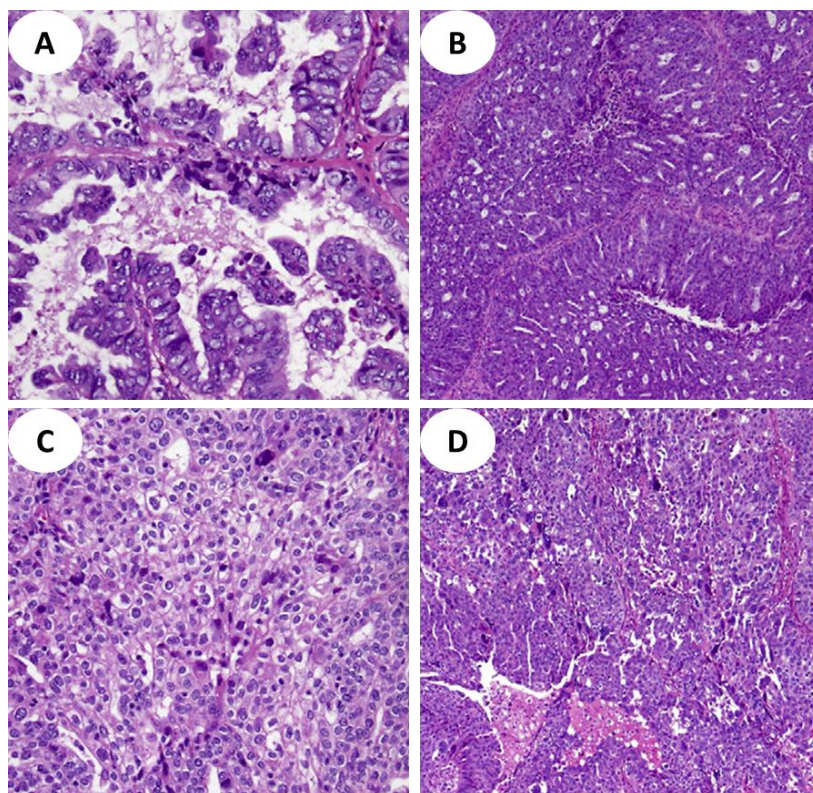


Figure 3 : Les différents types histologiques des CSHG.

(A) Architecture papillaire ou micropapillaire avec un *ratio* noyaux/cytoplasme très élevé et un pléomorphisme nucléaire important ;

(B) Architecture glandulaire semblable à celle du carcinome endométriode ;

(C) CSHG avec une composante à cytoplasme clair et un pléomorphisme nucléaire très important ;

(D). Architecture solide prédominante avec des espaces en fonte très marqués et un nucléo-morphisme important.

Ces confusions sont aussi résolues par une caractérisation moléculaire de ces tumeurs. En effet, les CSHG arborent souvent des altérations des gènes de réparation de l'ADN tels que la mutation *TP53* (>90%) ou *BRCA1/2* (30-45%), conduisant à une instabilité chromosomique et à une aneuploïdie. D'autres mutations beaucoup moins fréquentes sont aussi observées telles que la délétion du gène de régulation *PTEN* et l'hyper-méthylation de *RAD51* (Gurung et al., 2013).

I.2.2.2. Origines des carcinomes séreux de haut grade

Il a longtemps été considéré que les carcinomes séreux sont exclusivement originaires de l'épithélium ovarien de surface. Cette théorie a été remise en cause ces dernières décennies suite à l'identification d'une lésion précurseur au niveau des trompes de Fallope lors de chirurgies salpingo-ovariectomie prophylactiques chez des patientes prédisposées aux cancers de l'ovaire (portantes des mutations germinales ou sporadiques du gène *BRCA1/2* ou bien ayant un syndrome familial de cancer de l'ovaire) (Callahan et al., 2007).

La théorie la plus répandue sur l'origine des cancers de l'ovaire serait que le cancer de l'ovaire dériverait des cellules de l'épithélium de surface ovarien (Figure 4).

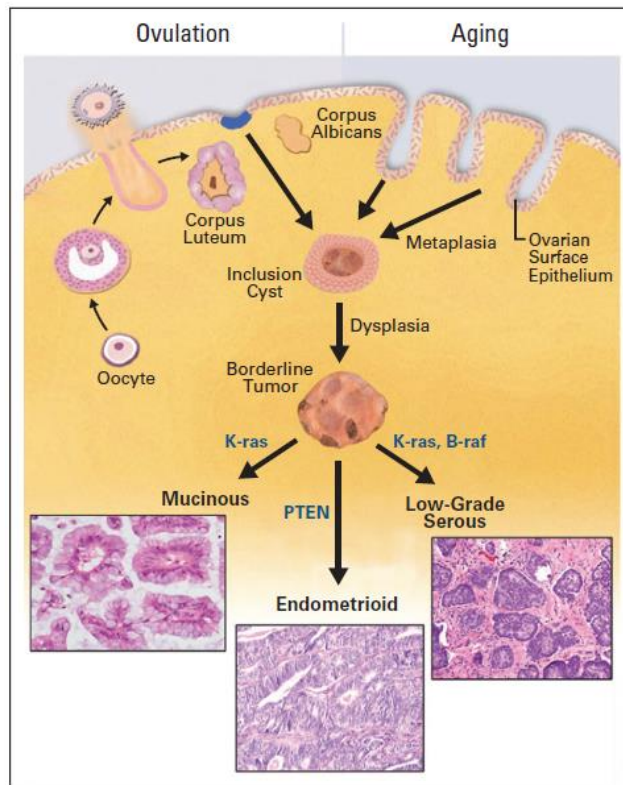


Figure 4 : Modèle de transformation de l'épithélium de surface ovarien avec inclusion des kystes (Levanon et al., 2008).

Au cours du processus de l'ovulation, l'épithélium de surface des ovaires se rompt et le mécanisme de réparation contribue à l'accumulation de mutations de *TP53* et à la transformation de ces cellules en cellules malignes. Ainsi, les kystes d'inclusion corticales se forment à partir de l'épithélium contenant les cellules transformées (Figure 4). Ces cellules vont être exposées à un environnement du stroma ovarien qui pourra, en présence d'inflammations dues à la survenue du cycle d'ovulation, entraîner leur transformation maligne (Kurman and Shih, 2011).

Dans la seconde théorie, les cancers de l'ovaire se développent à partir de la muqueuse des trompes de Fallope où ils restent confinés sous forme de carcinomes intraépithéliaux tubaires séreux (STIC), souvent localisés au niveau du Fimbria (extrémité distale des trompes de Fallope ; Morrison et al., 2015). Différentes observations ont supporté l'idée que le microenvironnement tubaire exerçait une inhibition de la progression du cancer au niveau des trompes de Fallope. Ces tumeurs sont non-invasives, leur présence au niveau des ovaires se fait par exfoliation des cellules cancéreuses et leur implantation sur la surface ovarienne conduisent à la formation d'une masse tumorale au niveau de l'ovaire, laissant croire qu'il est le site d'initiation des CSHG (Figure 5A) (Piek et al., 2003 ; Karnezis et al., 2016 ; Kurman and Shih, 2011).

Ces cellules qui s'exfolient du Fimbria vers la surface de l'ovaire peuvent se disposer au niveau des sites de rupture de l'épithélium de surface ovariens suite à l'ovulation et forment ainsi les kystes d'inclusion. Ceci suggère que les tumeurs ovariennes peuvent se développer à partir de ces kystes d'inclusion comme envisagé précédemment, mais dont l'origine est tubaire plutôt qu'épithéliale (Figure 5B).

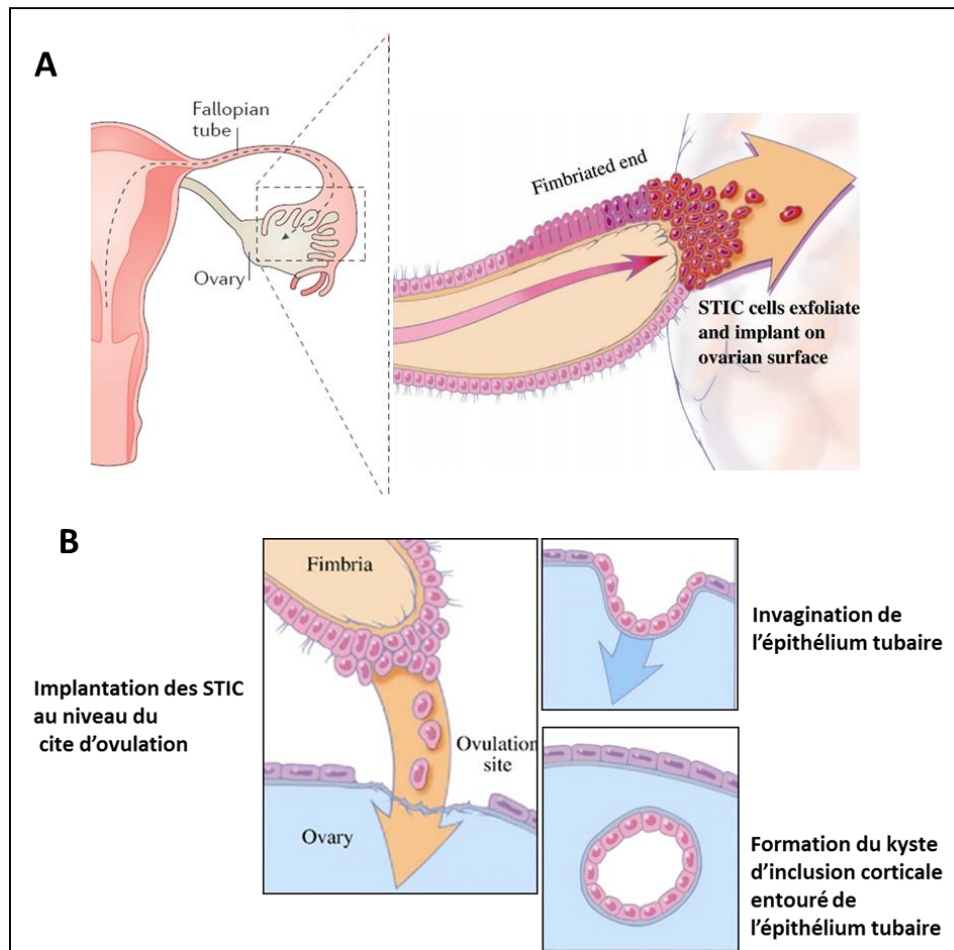


Figure 5 : Origine des carcinomes séreux de haut grade.

A) Dissémination des STIC à partir de la Fimbria vers l'épithélium ovarien. (B) Transmission des cellules épithéliales tubaires vers l'ovaire au niveau du site dénudé après ovulation (Kurman and Shih, 2011).

Plusieurs études ont confirmé la théorie selon laquelle les carcinomes intraépithéliaux tubaires séreux sont les précurseurs des CSHG. En effet, les analyses génétiques ont démontré que le profil génétique des CSHG est semblable à celui de l'épithélium des trompes de Fallope et non à l'épithélium ovarien de surface (Marquez, 2005). De plus, les analyses d'immunohistochimie ont démontré que les CSHG n'expriment pas de marqueurs spécifiques de l'épithélium ovarien de surface mais de préférence la protéine PAX8, marqueur müllerien présent dans la muqueuse des trompes de Fallope. La corrélation dans l'expression des

protéines p53, p16 et Ki-67 entre les CSHG et leurs lésions précurseurs est une preuve supplémentaire qui vient appuyer la théorie de l'origine tubaire des CSHG.

I.3. Prise en charge des cancers de l'ovaire

Le cancer de l'ovaire est une maladie silencieuse surnommée « le tueur silencieux » car aucun symptôme ne se manifeste dans les premiers stades de cette maladie. Certains symptômes non distinctifs peuvent cependant se manifester et la patiente peut se souvenir de les avoir eus pendant la période précédant le diagnostic. Parmi ces signes, on peut distinguer une fatigue chronique, des ballonnements, des douleurs pelviennes ou abdominales et des saignements urinaires (Alvarez et al., 2016). Cette maladie est donc souvent diagnostiquée de manière inattendue lors d'une consultation médicale de routine. Une fois le diagnostic de cancer de l'ovaire établi, la patiente passera une IRM (imagerie de résonnance magnétique) pour définir la malignité de la maladie. En cas de suspicion de malignité, les cliniciens auront recours au scanner puis à une coelioscopie exploratrice afin d'évaluer l'étendue de la maladie (stadification). Dans la plupart des cas, les patientes sont diagnostiquées à des stades tardifs de la maladie (présence de métastases). Selon l'étendue et la propagation de la tumeur et l'état de santé de la patiente, cette dernière sera opérée avant qu'une chimiothérapie lui soit prescrite, ou une chimiothérapie néo-adjuvante sera prescrite afin de réduire l'étendue de la maladie avant la résection des nodules tumoraux.

Il existe par ailleurs des marqueurs tumoraux circulants tels que le CA125 (Cancer Antigen 125) qui permettent de suivre l'évolution de la maladie. Néanmoins, son augmentation ayant été constatée dans d'autres types de cancers, il ne représente donc pas un marqueur spécifique des cancers ovariens.

La chirurgie et la chimiothérapie sont les traitements habituellement recommandés pour les carcinomes ovariens. La prise en charge est principalement basée sur l'état général de la patiente, le type histologique de la tumeur et son stade d'évolution.

I.3.1. La chirurgie

La chirurgie de réduction fait partie intégrante du traitement de référence des cancers de l'ovaire. Pour les patientes désirant garder leur fertilité, une chirurgie conservatrice (une annexectomie unilatérale) peut être proposée pour les stades I. Dans le cas des tumeurs présentant un stade de dissémination élevé, l'objectif principal de la chirurgie est la résection

complète de la carcinose macroscopique disséminée sur les tissus et les organes de la cavité abdominale des patientes. Elle inclut une hystérectomie totale, une salpingo-oophorectomie bilatérale, une appendicectomie (principalement les tumeurs mucineuses), et une péritonectomie. Une dissection systématique des ganglions para-aortiques et pelvienne est nécessaire pour les stades avancés de la maladie.

Le moment auquel est proposé le geste chirurgical dépend de l'âge et de l'état général des patientes ainsi que de l'étendue de la maladie. Elle peut être pratiquée en traitement initial suivie d'une chimiothérapie ou au contraire en traitement d'intervalle après une chimiothérapie néoadjuvante lorsque la coelioscopie exploratoire suggère que la masse tumorale n'est pas opérable d'emblée. En fonction du niveau d'exérèse tumorale, la chirurgie est qualifiée d'optimale (résidus tumoraux ≤ 1 cm de diamètre) ou sub-optimale (résidus tumoraux > 1 cm de diamètre). La qualité de la résection tumorale est un facteur pronostique important pour la qualité de vie des patientes et leur réponse au traitement (du Bois et al., 2009) (Figure 6).

Le pronostic des patientes présentant une tumeur de stade précoce où le cancer est de bas grade et confiné au niveau des ovaires (stade IA et IB) est excellent, leur survie à 5 ans sans chimiothérapie étant supérieure à 90%. Cependant, chez les patientes avec une composante cancéreuse dans l'ascite, le liquide péritonéale (stade IC) ou présentant une extension pelvienne avec une histologie de haut grade (stade II), le risque de récurrence est élevé et une chimiothérapie adjuvante est recommandée.

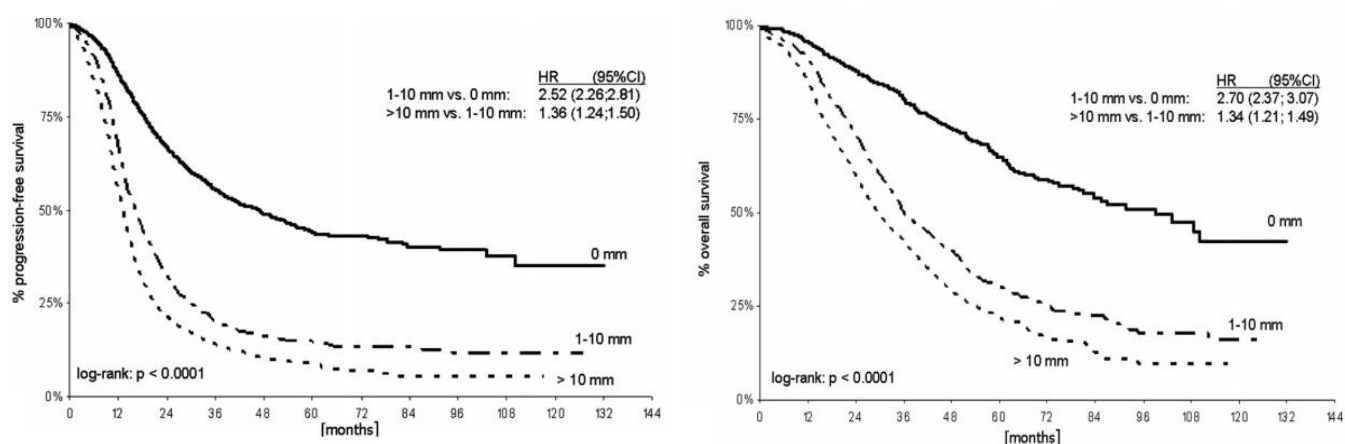


Figure 6 : Impact de la taille des résidus tumoraux en fin de chirurgie sur la survie globale et la survie sans progression (du Bois et al., 2009).

I.3.2. La chimiothérapie de première ligne

I.3.2.1. La chimiothérapie adjuvante

La chimiothérapie adjuvante est rapidement prescrite après la chirurgie de réduction afin d'éliminer les résidus tumoraux non éliminés du fait de leur taille microscopique ou de leur inaccessibilité. La chimiothérapie à base du sel de platine combinée à un dérivé taxane est fréquemment proposée en traitement de première ligne des cancers ovariens de haut grade (stade II et plus) et d'une histologie spécifique (CSHG ou CCC). Le carboplatine est davantage recommandé que le cisplatine (CDDP) pour sa moindre toxicité rénale et son efficacité équivalente en association avec le paclitaxel à celle du cisplatine / paclitaxel (du Bois et al., 2003 ; Ozols et al., 2003). Le protocole standard de la chimiothérapie associe le carboplatine AUC 5-6 au paclitaxel 175mg/m² en intraveineuse toutes les 3 semaines pendant 6 cycles. Cette chimiothérapie est souvent accompagnée par de sévères effets secondaires liés aux fortes doses de traitement, notamment une néphrotoxicité, une myélosuppression, une thrombocytopénie intense, des réactions d'hypersensibilité, une myalgie et une neuropathie périphérique constatées dans 70% des cas traités par le paclitaxel.

Pour pallier à toutes ces toxicités liées à la dose du traitement, plusieurs études ont été amenées à évaluer l'effet de « la chimiothérapie dose-dense ». Cette dernière consiste à augmenter l'efficacité du traitement en augmentant la fréquence de la chimiothérapie (intervalle de temps rapproché entre les cures). Cette approche a été évaluée dans l'essai clinique JGOG3016 qui portait sur 631 patientes de stade II à IV et dans lequel le protocole standard de chimiothérapie a été comparé au protocole d'administration du paclitaxel à une dose plus faible (80mg/m²), une fois par semaine pendant 6 cycles en combinaison avec le carboplatine (Katsumata et al., 2013 ; Katsumata et al., 2009). Cette étude a démontré un grand bénéfice pour les patientes avec une chirurgie de réduction sub-optimale chez lesquelles a été enregistrée une nette amélioration de la survie sans progression (médiane 28 vs 17.5 mois) et de la survie globale (100.5 vs 62 mois). Cependant, la thérapie dense a été associée à une forte toxicité hématologique qui a conduit à une discontinuité (52% vs 37%) ou à une suspension du traitement (76% vs 67%). Une autre approche sur la thérapie dense a été explorée dans l'étude MITO7 où de plus faibles doses de carboplatine et de paclitaxel ont été administrées (AUC^{1/4} 2 et 60mg/m² respectivement). Ce nouveau protocole n'a démontré aucune différence significative par rapport au protocole standard en termes de survie. En revanche, il a permis une nette amélioration de la qualité de vie des patientes et une toxicité

hématologique et neurologique moins marquée. Ce protocole pourrait donc être une alternative intéressante pour le traitement des patientes fragiles (Pignata et al., 2014).

Enfin, l'efficacité de triples combinaisons a également fait l'objet de plusieurs études. Ces stratégies thérapeutiques, qualifiées de « thérapies intensives », ont pour objectif d'ajouter un troisième agent thérapeutique, tel que la doxorubicine et sa formule liposomale (Caelyx), la gemcitabine, l'épirubicine ou le topotécan, à la chimiothérapie standard afin d'améliorer son efficacité. Cette approche n'a cependant pas amélioré la survie ni la qualité de vie des patientes, mais plutôt provoqué de sévères toxicités principalement hématologiques (destruction des cellules souches hématopoïétiques) (Markman et al., 1993) sans aucun bénéfice sur la survie.

I.3.2.2. La chimiothérapie intrapéritonéale

La chimiothérapie intrapéritonéale (CIP) est une approche développée depuis les années 1980 en vue d'augmenter l'efficacité de la chimiothérapie sur les nodules de carcinose péritonéale. Cette thérapie consiste à administrer une forte dose d'agents cytotoxiques (cisplatine, paclitaxel) directement dans la cavité péritonéale en utilisant un cathéter. L'administration IP permet d'exposer les cellules cancéreuses disséminées dans la cavité abdominale sous forme de micro-nodules non éliminés par la chirurgie à des concentrations 10 à 1000 fois supérieures à celles obtenues lors d'une administration par voie IV (Markman et al., 1993), en fonction du facteur de diffusion conditionné par le poids moléculaire et la lipophilie du produit considéré ainsi que par l'indice de perméabilité du péritoine. Par conséquent, l'administration de la chimiothérapie par voie IP améliore le profil pharmacocinétique des médicaments et limite la toxicité systémique associée à la chimiothérapie intraveineuse (Ansaloni et al., 2015). L'efficacité de la CIP dans le traitement des cancers de l'ovaire a été démontrée dans plusieurs études cliniques telles que l'étude randomisée GOG172 dans laquelle l'administration intraveineuse du CDDP/paclitaxel (75mg/m^2 et 135mg/m^2 respectivement) a été comparée à l'administration IP de la même association (100mg/m^2 de CDDP et 60mg/m^2 de paclitaxel) chez des patientes qui ont également reçu du paclitaxel à la dose de 135mg/m^2 en IV. Cette étude a démontré une amélioration significative de la survie sans progression (Hazard Ratio (HR) 0.78, Indice de Confiance (IC) 95% 0.70-0.86) et de la survie globale (HR 0.81, IC95% 0.72-0.90) chez des patientes avec une chirurgie de réduction optimale (Armstrong et al., 2006). Cependant, la faible pénétration tissulaire et l'hétérogénéité dans la répartition des produits ainsi que les complications liées au dispositif d'administration

intrapéritonéale sont les obstacles majeurs de la CIP qui limitent son utilisation en clinique (Tableau 3).

Tableau 3. Avantages et inconvénients de la CIP et la CHIP.

	Chimiothérapie intrapéritonéale	Chimiothérapie intrapéritonéale hyperthermique
Avantages	-Possibilité d'une administration répétée grâce au cathéter -Une faible toxicité systémique	-Possibilité d'exposition de la cavité abdominale à de fortes doses de chimiothérapie -Augmentation de l'efficacité de la chimiothérapie par le procédé d'hyperthermie -Une faible toxicité systémique
Inconvénients	-Complications liées au dispositif cathéter -Mauvaise qualité de vie et interruption de traitement	-Augmentations des risques de complications intestinales et gastriques

Pour remédier à ces limites, la chimiothérapie intrapéritonéale hyperthermique (CHIP) a été développée. Elle est réalisée en situation peropératoire afin de traiter la maladie résiduelle à l'origine de la majorité des récidives. Le CDDP est un excellent candidat pour la CHIP grâce à ces propriétés pharmacologiques qui permettent, dans des conditions d'hyperthermie, une absorption supérieure à 70% de la concentration intrapéritonéale et un faible *ratio* concentration péritonéale/plasmatique. La CHIP, pratiquée à une température comprise entre 41 et 43°C selon deux modalités différentes (ventre ouvert ou fermé), augmente la pénétration du CDDP dans les nodules tumoraux et empêche la fixation des cellules cancéreuses libérées au cours de l'exploration chirurgicale sur la matrice extracellulaire. L'hyperthermie augmente également l'efficacité de la chimiothérapie par son rôle majeur à la fois sur les cellules cancéreuses (induction de l'apoptose en réponse aux dommages à l'ADN et à la dégradation des protéines) mais aussi au niveau tissulaire, *via* la perturbation de la vascularisation (Classe et al., 2010).

Cette approche a montré de bons résultats dans les cancers gastriques mais son utilisation pour le traitement des cancers de l'ovaire reste occasionnelle. En effet, la lourdeur de cette intervention fait apparaître des complications d'ordre chirurgical et médical telles que des fistules digestives, des abcès et des hémorragies abdominales conduisant à une mortalité plus importante et à une restriction du spectre d'application aux patientes les plus jeunes présentant un bon état de santé général (Tableau 3). A cela s'ajoute l'exposition du personnel médical aux produits cytotoxiques lors de l'intervention. De plus, les études cliniques réalisées jusqu'à maintenant sont dans la plupart des cas des études rétrospectives et monocentriques sans population contrôle ce qui rend difficile l'évaluation du bénéfice de la CHIP dans le traitement des cancers de l'ovaire. Le protocole CHIPOR en cours de réalisation est un essai clinique randomisé de phase III ayant précisément pour objectif d'évaluer l'efficacité de la

chimiothérapie hyperthermique intra-péritonéale chez des patientes ayant un cancer de l'ovaire en récurrence (Bakrin et al., 2014).

I.3.2.3. La thérapie ciblée dans les cancers de l'ovaire : intérêt des antiangiogéniques

La thérapie ciblée est une approche thérapeutique qui a pour objectif de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses, limitant ainsi les effets « off-target » causés par la chimiothérapie conventionnelle. Plusieurs stratégies ont été étudiées dont certaines font l'objet de véritable succès dans la prise en charge des cancers de l'ovaire, tel que présenté ci-dessous.

Le concept de l'anti-angiogenèse comme approche pour le traitement des cancers solides a été abordé pour la première fois en 1971 par Judha Folkman, qui a souligné que la croissance de la tumeur de 1 à 2 mm³ nécessite une nouvelle vascularisation et que l'inhibition d'un tel procédé abolirait la progression tumorale (Folkman, 1971). Les facteurs pro-angiogéniques sont fréquemment fortement exprimés dans les cancers, conduisant à une formation non contrôlée de nouveaux vaisseaux avec une architecture et une fonction altérées (vaisseaux dilatés, tortueux et désorganisés) favorisant l'apparition de zones d'hypoxie et d'acidose dans les tumeurs. L'environnement de cette néo-vascularisation est aussi altéré. Les cellules endothéliales sont dépolarisées, déconnectées les unes des autres, morphologiquement irrégulières. La membrane basale est absente et les péricytes nécessaires au maintien des vaisseaux sanguins sont disjoints et déconnectés des cellules endothéliales, voire absents (Figure 7).

Toutes ces altérations entraînent une faible pression interstitielle et une hyperperméabilité vasculaire responsable d'une mauvaise distribution des médicaments au niveau de la tumeur et l'échec de la chimiothérapie (Maj et al., 2016).

La stratégie anti-angiogénique dans la thérapie cancéreuse est principalement axée sur la neutralisation du facteur de croissance endothéliale vasculaire circulant (VEGF) et sur l'inhibition de son récepteur tyrosine kinase (VEGFR). La théorie initiale concernant l'action des antiangiogéniques était la destruction des vaisseaux sanguins tumoraux conduisant à la privation des cellules cancéreuses en nutriments et en oxygène, provoquant ainsi la régression de la tumeur. Cependant, dans certaines tumeurs, les antiangiogéniques ont une action synergique avec la chimiothérapie. Or l'efficacité de la chimiothérapie est dépendante d'une

bonne distribution au niveau de la tumeur, ce qui a remis en cause le véritable mécanisme d'action des antiangiogéniques.

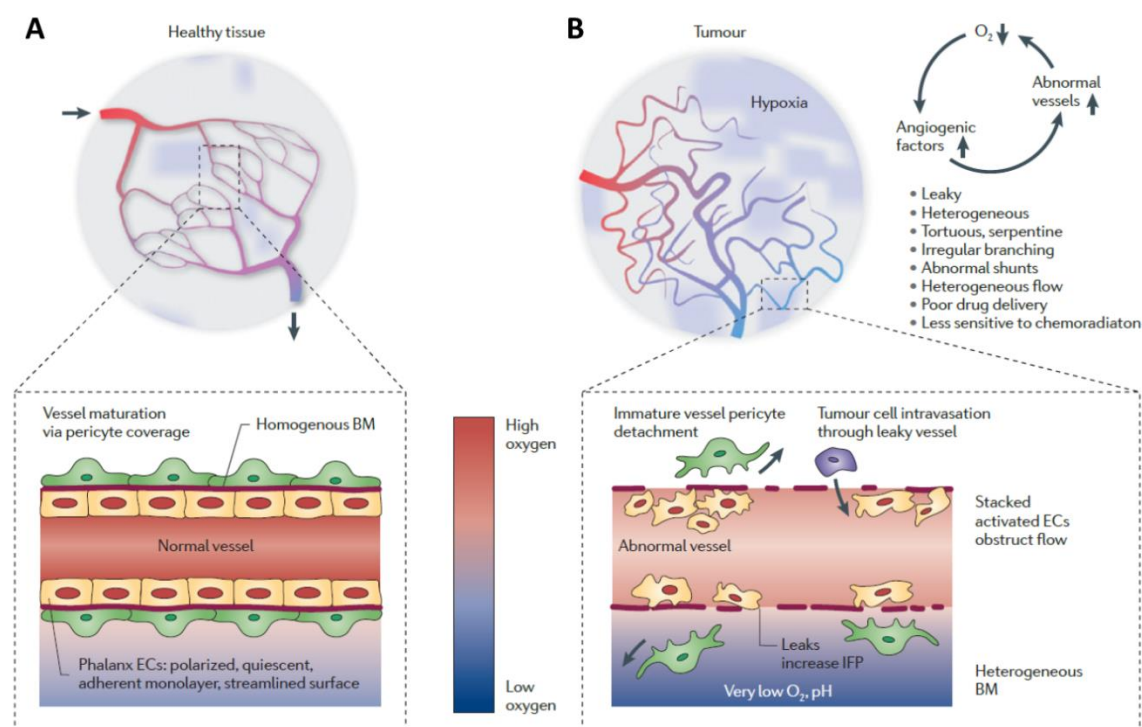


Figure 7 : Comparaison entre une vascularisation normale et une vascularisation tumorale.

(A) La vascularisation dans les tissus sains consiste en une distribution régulière de monocouches de cellules endothéliales polarisées soutenues par une membrane basale et des péricytes. (B) La vascularisation tumorale présente une distribution irrégulière conduisant à la formation de zones d'hypoxie et des zones fortement irriguées par des micro-vaisseaux. Ces vaisseaux sont caractérisés par une hyperperméabilité liée à l'absence de cellules endothéliales de la membrane basale et à la désorganisation des péricytes (D'après Carmeliet and Jain, 2011).

Des études récentes ont démontré une nouvelle fonction des agents antiangiogéniques qui consiste à « normaliser les vaisseaux sanguins tumoraux ». C'est un phénomène par lequel l'organisation, la perméabilité et l'environnement des vaisseaux tumoraux sont rétablis, favorisant ainsi une meilleure biodisponibilité de la chimiothérapie au niveau de la tumeur (Figure 8) (Maj et al., 2016).

Le Bévacicumab (Avastin®) est un anticorps monoclonal dirigé contre toutes les isoformes du VEGF. Son autorisation de mise sur le marché pour le traitement des cancers de l'ovaire a été établie en 2012 suite aux succès de l'essai clinique GOG128 dans lequel l'administration en première ligne de traitement du Bévacicumab en association avec le carboplatine / paclitaxel puis en traitement de maintien pendant 15 cycles a permis une amélioration dans la survie sans progression et la survie globale des patientes (Burger et al., 2011). Le Bévacicumab a

également montré un intérêt dans les traitements des cancers de l’ovaire sensibles ou résistants au carboplatine (Aghajanian et al., 2012 ; Poveda et al., 2015).

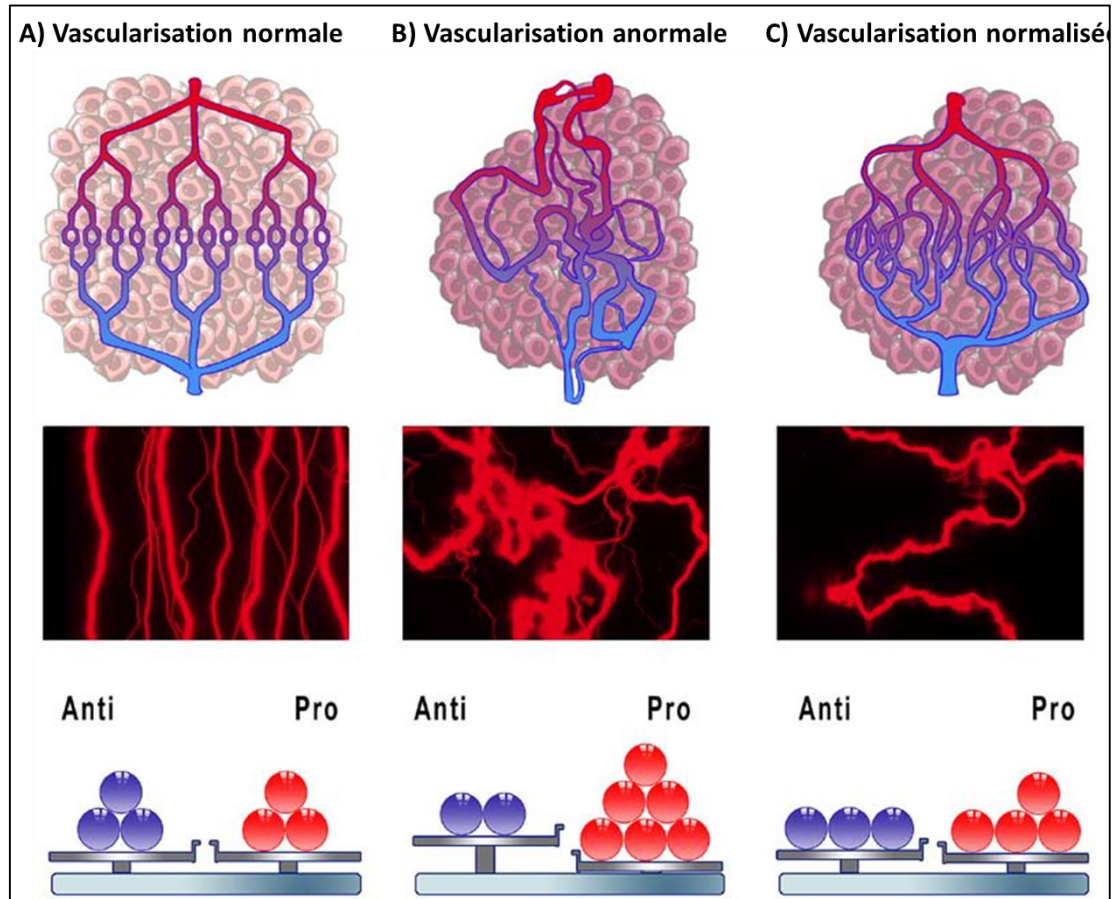


Figure 8 : L’hypothèse de la normalisation vasculaire.

(A) L’angiogenèse dans les tissus sains est régulée par un état d’équilibre entre les facteurs pro et antiangiogéniques. (B) Dans les tumeurs, la balance est penchée en faveur des pro-angiogéniques, conduisant à une vascularisation non-contrôlée et une distribution hétérogène dans la tumeur créant des zones d’hypoxie résistantes au traitement. (C) Le rétablissement du niveau d’expression de ces facteurs et la régulation des voies impliquées dans l’angiogenèse inverse l’équilibre de la balance et normalise la vascularisation (D’après Maj et al., 2016).

Les inhibiteurs du VEGFR ont, en outre, fait l’objet de plusieurs essais cliniques à l’instar du Pazopanib ou du Nintedanib. Ce sont de petites molécules de formulation orale, qui inhibent le site catalytique des domaines tyrosines kinases associés aux récepteurs pro-angiogéniques. Ces inhibiteurs ont démontré une amélioration de la survie sans progression des patientes atteintes d’un cancer avancé de l’ovaire mais leur efficacité est inférieure à celle du Bévaccizumab (du Bois et al., 2014 ; du Bois et al., 2014).

En dépit de ces bénéfices, l'efficacité du Bévacicumab et des inhibiteurs des tyrosines kinases reste limitée à certaines patientes et pour un temps limité (quelques mois). L'administration des antiangiogéniques est souvent accompagnée par des effets secondaires divers tels qu'une toxicité hématologique, une hypertension artérielle et une perturbation gastro-intestinale. Cependant, l'inconvénient le plus sérieux des traitements antiangiogéniques est le développement au niveau de la tumeur d'une résistance intrinsèque quelques temps après la fin du traitement (Figure 9). En effet, les tumeurs sont reconnues pour leur remarquable plasticité et adaptabilité qui leur permettent d'échapper aux traitements. L'inhibition de la voie principale de l'angiogenèse favorise l'activation et l'amplification d'autres voies compensatrices impliquant les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF), les ephrines, les angiopoïétines et les facteurs influençant le recrutement des péricytes tels que les PDGF β . L'activation de ces voies favorise la survie, la prolifération et la migration cellulaire conduisant à une nouvelle vascularisation. Dans ce contexte, une nouvelle catégorie de médicaments a été conçue pour remédier à ce type de résistance, tel que le Trébananib, qui est un pepti-anticorps (peptide greffé d'un domaine Fc d'un anticorps monoclonal) conçu pour interagir avec les angiopoïétines 1 et 2 et empêcher ainsi leur interaction avec leur récepteur spécifique Tie2. Le Trébananib est actuellement en essai clinique de phase III dans le traitement des cancers de l'ovaire. Il présente une amélioration de la survie des patientes avec une bonne tolérance par rapport au traitement par le Bévacicumab ou par les inhibiteurs des tyrosines kinases (Schmid and Oehler, 2015).

D'autres mécanismes d'adaptation de la tumeur envers les agents antiangiogéniques ont été décrits dans la littérature. L'utilisation des agents antiangiogéniques peut conduire à l'apparition de clones tolérants à un environnement hypoxique, très résistants aux différents types de traitements, ou au contraire, pourrait favoriser le développement d'un mimétisme vasculaire formé par des cellules tumorales capables de s'organiser elles-même en réseau tubaire, permettant l'alimentation de la tumeur en oxygène et en nutriments (Millimaggi et al., 2009).

Il est aujourd'hui difficile de prévoir la réponse aux traitements antiangiogéniques par manque de facteurs prédictifs. Ce champ d'investigation reste donc prioritaire pour la mise en place d'une sélection efficace des patientes qui pourront réellement bénéficier de ce traitement.

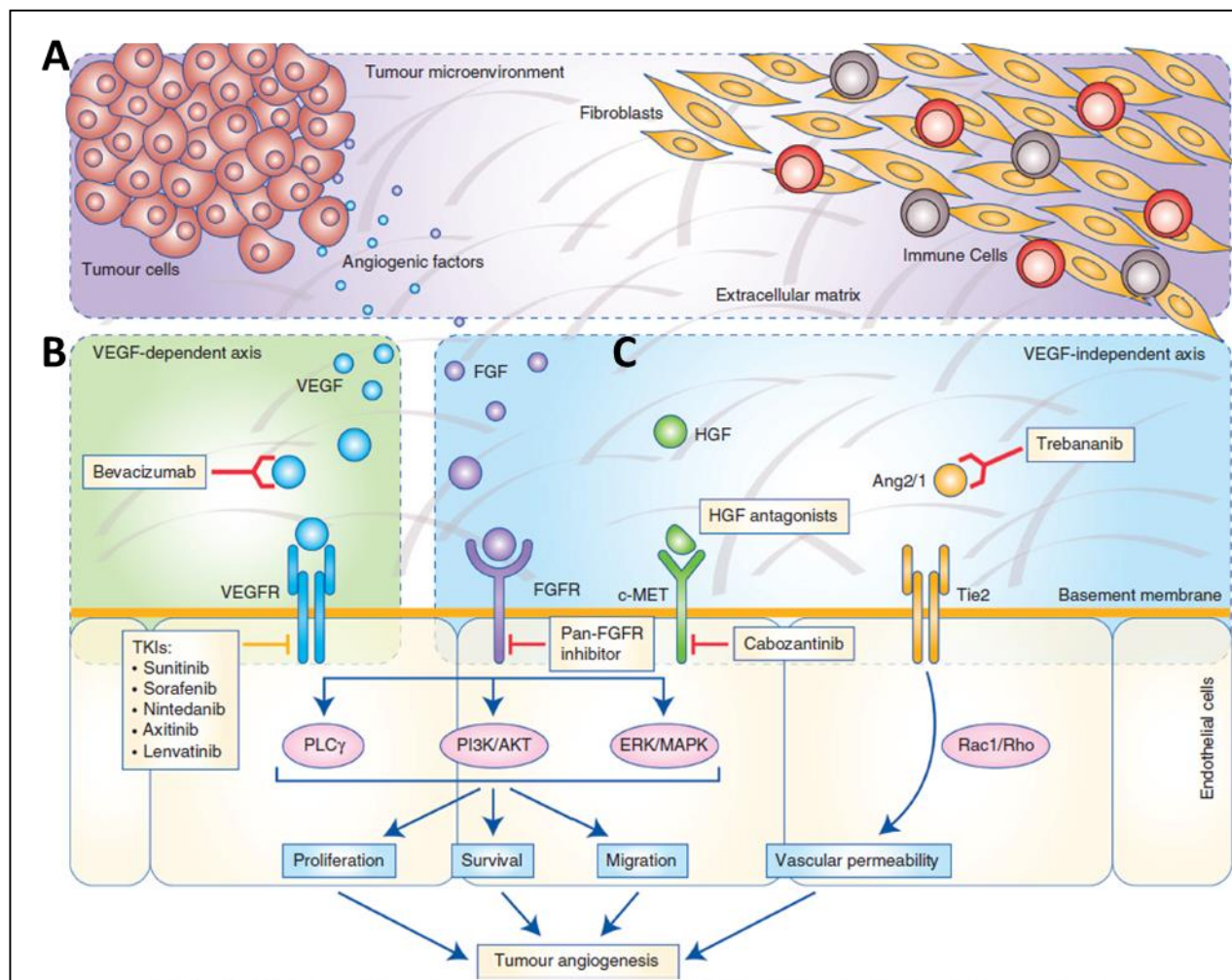


Figure 9 : Stratégies d'inhibition des voies de l'angiogenèse tumorale.

(A) Le microenvironnement tumoral et l'interaction entre les différentes cellules (tumoral et non tumorales) affectent également l'angiogenèse par l'activation des voies de signalisations impliquées dans le recrutement cellulaire et la construction vasculaire. (B) le VEGF/VEGFR est l'axe principal de l'angiogenèse. La fixation du VEGF sur son récepteur conduit à l'activation des voies PI3K-AKT et la phospholipase C γ (PLC γ) permettant la prolifération, la survie, la migration et la perméabilisation vasculaire. (C) L'inhibition chronique du VEGF/VEGFR a montré une activation d'autres voies compensatrices d'angiogenèse. Ces différentes voies de signalisation indépendantes du VEGF sont contrôlées par des protéines clés telles que le couple FGF/FGFR, l'angiopoétine-2 (Ang2) et l'oncogène c-MET. Des thérapies complémentaires ont été développées pour contrecarrer ces différentes voies de résistance aux antiangiogéniques telles que le Pan-inhibiteur FGFR utilisé pour l'inhibition de l'axe FGF/FGFR, l'antagoniste de HGF, l'anticorps anti-MET préconisés pour l'inhibition de l'axe Met/HGF ou bien le Trabectedin utilisé pour empêcher l'interaction de Ang1/2 avec leur récepteur (D'après Bueno et al., 2017).

I.3.2.4. Chimiothérapie néoadjuvante

La chimiothérapie néoadjuvante (CTNA) est le traitement alternatif pour les patientes présentant un stade avancé de la maladie (IIIc/IV) chez lesquelles la réduction chirurgicale optimale n'est pas envisageable (tumeur non résecable ou état général ne leur permettant pas de supporter la chirurgie de réduction initiale). La CTNA consiste à administrer trois cycles de chimiothérapie associant carboplatine/paclitaxel par voie IV, suivis d'une chirurgie

d'intervalle puis de trois cycles de chimiothérapie additionnels post-chirurgicaux. Cette approche a été évaluée par deux essais cliniques randomisés de phase III « EORT 55971 » et « CHORUS » qui ont comparé la chirurgie de réduction en première ligne de traitement suivie de la chimiothérapie adjuvante avec la CTNA suivie d'une chirurgie d'intervalle chez des patientes de stade avancé de cancers épithéliaux de l'ovaire. Ces essais cliniques ont démontré une similitude dans la survie sans progression et la survie globale entre les deux modes de traitement, avec un faible taux de mortalité en faveur de la CTNA (Vergote et al., 2010 ; Kehoe et al., 2015). Cependant, ces deux études sont controversées en raison de la survie sans progression et de la survie globale qui apparaissaient assez faibles en comparaison avec les données issues des autres essais cliniques, et de la qualité moyenne de la chirurgie de réduction pratiquée dans les deux essais (temps de la chirurgie inférieur à 120min et résection tumorale incomplète dans le groupe contrôle) (Mahner et al., 2016). Néanmoins, toutes les questions qui se sont posées sur l'efficacité de la CTNA, principalement sur la qualité de la chirurgie, le choix entre la CTNA et la chirurgie de réduction primaire dans le traitement des cancers de l'ovaire, restent contestées. Toutefois, la recommandation de la chimiothérapie néoadjuvante en première ligne est de plus en plus fréquente ces dernières années (Webber and Friedlander, 2016).

I.3.2.5. Le traitement d'entretien

Le traitement d'entretien consiste à prolonger l'apport d'un ou de plusieurs agents thérapeutiques après la chimiothérapie conventionnelle afin de ralentir la progression de la maladie, la survenue des récurrences et d'améliorer la qualité de vie des patientes. Le traitement de maintien est également recommandé pour empêcher la formation de résistances développées par la tumeur après traitement. En effet, la chimiothérapie conventionnelle pourrait être responsable de l'apparition d'une sélection de cellules souches cancéreuses ou initiatrices de cancers, résistantes au traitement. Ainsi l'exposition fréquente et répétée à différents agents cytotoxiques pourrait inhiber la prolifération de ces cellules et ainsi limiter leur propagation. Plusieurs études ont évalué la pertinence de la thérapie de consolidation en utilisant différents types d'agents cytotoxiques.

Agents cytotoxiques standards en traitement de maintenance

L'effet des agents cytotoxiques standards en traitement de maintenance a été évalué dans plusieurs essais cliniques. La plupart de ces traitements sont qualifiés d'agent « non-cross resistant » avec la chimiothérapie initiale. Le Paclitaxel est l'un de ces agents, il a été évalué

dans l'essai clinique de phase III mené par SouthWest Oncology Group et Gynecologic Oncology Group (SWOG/GOG). Les résultats de cette étude ont démontré un gain significatif dans la durée de vie sans progression en faveur des patientes de stade III et IV ayant reçu 12 cycles de paclitaxel après la chimiothérapie conventionnelle (Markman et al., 2003). Cependant, ce résultat n'a malheureusement pas été soutenu par le dernier essai clinique sur l'efficacité des 6 cycles de paclitaxel dans lequel aucune différence significative n'a été observée entre le groupe contrôle (chimiothérapie conventionnelle sans traitement de consolidation) et le groupe avec traitement de consolidation (Pecorelli et al., 2009). Le topotecan, inhibiteur de la topoisomérase I, a aussi été évalué en maintenance dans l'essai clinique MITO-1 incluant les stades avancés des cancers de l'ovaire sensibles à la chimiothérapie à base de platine et de paclitaxel. En dépit de son efficacité dans la deuxième ligne de traitement, le topotecan en traitement de consolidation pendant 4 cycles n'a pas amélioré l'efficacité de la chimiothérapie initiale (De Placido et al., 2004). Enfin, le docétaxel a récemment été évalué dans le but de remplacer le paclitaxel dans cette stratégie et de limiter ainsi la toxicité neurologique. Les résultats de cette étude ont révélé une bonne tolérance pour les 6 cycles de traitement mais son efficacité sur la survie sans progression ou la survie globale n'a pas encore été démontrée.

Ces dernières années, des agents de la thérapie ciblée ont été introduits dans les traitements de consolidation dans le cadre de divers essais cliniques. L'utilisation des médicaments à action ciblée tel que le Bévacicumab (anti-angiogénique) ou l'olaparib (inhibiteur de PARP abordé plus loin) dans ce type de traitements ont montré d'importants bénéfices notamment au niveau de la toxicité liée aux effets « off-Target » des traitements conventionnels. Les différents essais évaluant l'intérêt de ces molécules dans le traitement des cancers de l'ovaire sont discutés ci-dessous.

I.3.3. Chimiothérapie de deuxième ligne : récidive, chimiorésistance et traitement associés

En dépit d'une bonne réponse à la première ligne de traitement (chirurgie + chimiothérapie), la plupart des patientes rechutent dans les premières années après le diagnostic. Cette récidive est un vrai obstacle dans le traitement des cancers de l'ovaire et ce même après une chirurgie de résection complète. Cette résistance est due au fait que les cellules développent des mécanismes d'échappement à l'effet cytotoxique des dérivés de platine.

I.3.3.1. Résistance aux dérivés de platine et traitement alternatifs des rechutes

Les dérivés de platines sont parmi les agents anticancéreux les plus utilisés pour le traitement des cancers dont les cancers de l'ovaire. Les médicaments dérivés du platine et utilisés dans le traitement chimiothérapeutique comprennent le cisplatine, le carboplatine et l'oxaliplatine. Le cisplatine est la formulation inorganique (ne contient pas de carbone) alors que le carboplatine et l'oxaliplatine contiennent des atomes de carbone et d'oxygène. Du fait de leur mauvaise biodisponibilité orale et de leur toxicité digestive, ce type de médicament est administré en perfusion intraveineuse. Une fois dans la circulation sanguine, ces médicaments interagissent aussi bien avec les protéines solubles qu'avec les éléments figurés du sang tels que les érythrocytes conduisant à une faible élimination par l'organisme. Au niveau des cellules cibles, ces dérivés sont des intercalants de l'ADN. Ils se fixent sélectivement sur les bases puriques (A ou G) de l'ADN conduisant à la formation d'adduits. Ces derniers provoquent la déformation de la structure de l'ADN, inhibant ainsi sa réplication, sa transcription et provoquant la mort des cellules. Ces médicaments, souvent utilisés dans le traitement des maladies cancéreuses, apportent ainsi un taux élevé de réponses et une stabilisation de la maladie après la première ligne de traitement.

Malheureusement, certaines patientes présentent initialement une résistance intrinsèque aux thérapies à base de platine alors que d'autres la développent après traitement, tel que c'est le cas dans 75% des cancers de l'ovaire. Cette résistance aux sels de platine est secondaire à des altérations qui surviennent à différents niveaux de la cellule cancéreuse (Figure 10) et qui sont classées en : **i)** pré-cible ; impliquant les mécanismes d'interférence avec les transporteurs membranaires ou avec les molécules de détoxification, **ii)** au niveau de la cible ; comprenant les mécanismes de réparation de l'ADN, et en **iii)** post-cible ; impliquant les événements mis en place après la platination de l'ADN (Figure 11) (Dilruba and Kalayda, 2016).

La résistance **pré-cible** fait intervenir les altérations au niveau du procédé d'acheminement du médicament *via* l'expression, la localisation et le fonctionnement des transporteurs de cuivre (CTR1) qui permettent la capture et la diffusion de ces molécules dans la cellule tumorale, des membres de la famille des ATPases tels que les glycoprotéines-p, les protéines de résistances multiples aux médicaments (MRP2) et les protéines Cooper (ATP7A, ATP7B) qui augmentent l'efflux et l'exportation de ces petites molécules. La surexpression des enzymes

de synthèse du GSH ou de conjugaison au platine (Metallothioneins) qui favorise l'inactivation et la neutralisation de ces dérivés dans la cellule est également impliquée.

Les mécanismes de résistance instaurés au niveau de **la cible** consistent d'une part en la capacité de la cellule tumorale à augmenter son rythme de réparation par de multiples voies de réparation (la réparation par excision des nucléotides (NER) et/ou la réparation mismatch (MMR)) ou à ignorer les lésions non réparées de l'ADN.

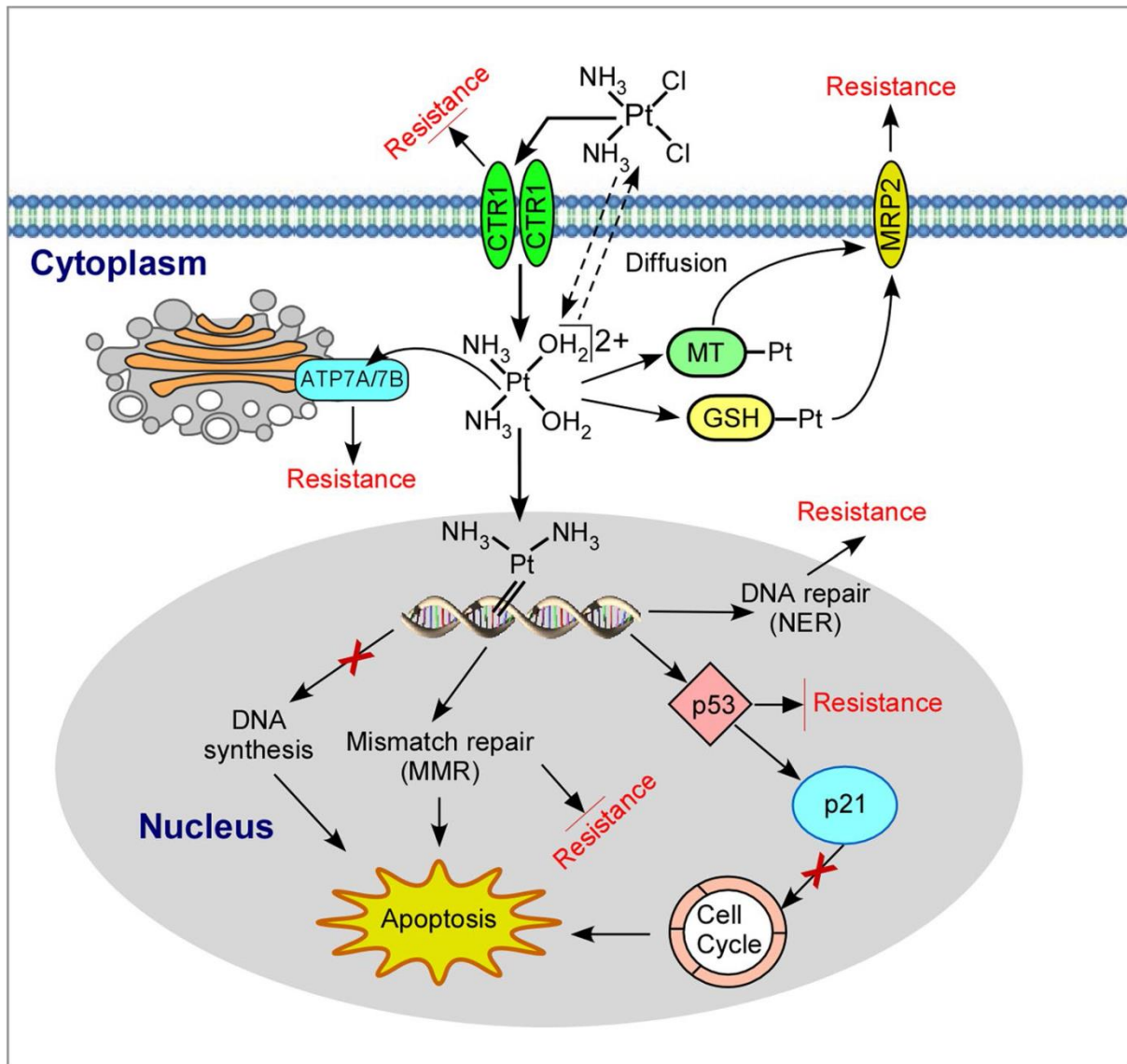


Figure 10 : Mécanisme de résistance au traitement à base des dérivés de platine (Dilruba and Kalayda, 2016).

L'un des mécanismes de résistance prédominant est l'inactivation de la protéine suppresseur de tumeur TP53, qui survient dans plus de la moitié des cancers. Il a été reporté dans le cas

des cancers de l’ovaire, que la réponse aux dérivés de platine est corrélée avec le statut d’activation de cette protéine.

Le mécanisme de résistance **en aval de la cible** consiste en l’altération du processus de mort tels que l’inhibition des exécuteurs de l’apoptose comme l’inhibition des caspases par les protéines de la famille des IAP (Galluzzi et al., 2012).

I.3.3.2. Résistance aux taxanes

Les médicaments à base de taxane sont capables de se fixer à l’extrémité aminoterminal de la β -tubuline favorisant le rassemblement et la stabilisation des microtubules conduisant à la perturbation de plusieurs processus physiologiques tels que la prolifération cellulaire. Plusieurs mécanismes impliqués dans la résistance au taxane ont été décrits (Figure 11). Le mécanisme principal impliqué est la surexpression des protéines d’efflux P-glycoprotéines qui sont responsables de la diminution de la concentration intracellulaire de ce médicament (Kavallaris, 2010). La résistance au taxane peut également être due à une modification de sa cible, la β -tubuline, ou la surexpression d’autres variants pour lesquelles le taxane ne présente pas d’affinité comme la β III-tubuline (Kavallaris, 2010). Par ailleurs, l’interaction des protéines associées à la tubuline telles que la MAP2 au niveau du site d’interaction du taxane avec ses partenaires est un autre mécanisme de résistance au traitement à base de taxane (Kavallaris, 2010).

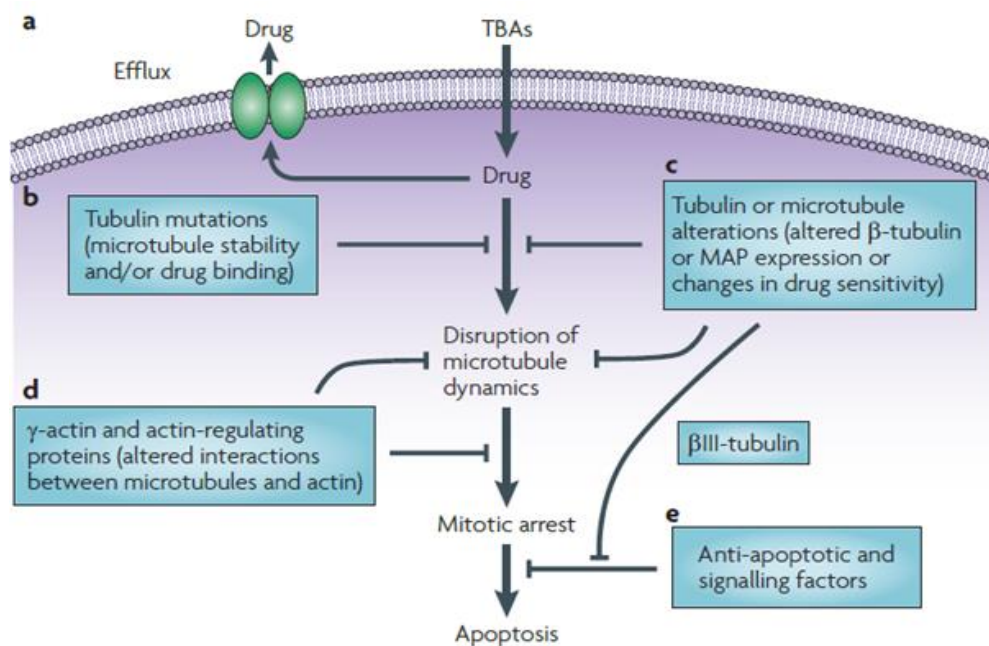


Figure 11 : Mécanismes de résistance au taxane (Kavallaris, 2010).

I.3.3.3. Traitements alternatifs des rechutes

La récurrence après la première ligne de traitement reste la problématique majeure de la prise en charge des cancers de l'ovaire. Les données récentes rapportent des taux de rechute à 5 ans de près de 80% dans les stades III et 95% dans les stades IV. Il n'existe actuellement aucun biomarqueur ou signature moléculaire permettant la prédiction de la réponse au traitement. Dans le cas de récurrence, le seul moyen de prédire la réponse à la deuxième ligne de traitement reste l'estimation du temps écoulé entre la fin du traitement initial et l'apparition de la rechute (Colombo et al., 2014). Cette période est connue sous le nom de « l'intervalle libre de platine » et permet de distinguer quatre différentes classes de réponse représentées ci-dessous (Figure 12) :

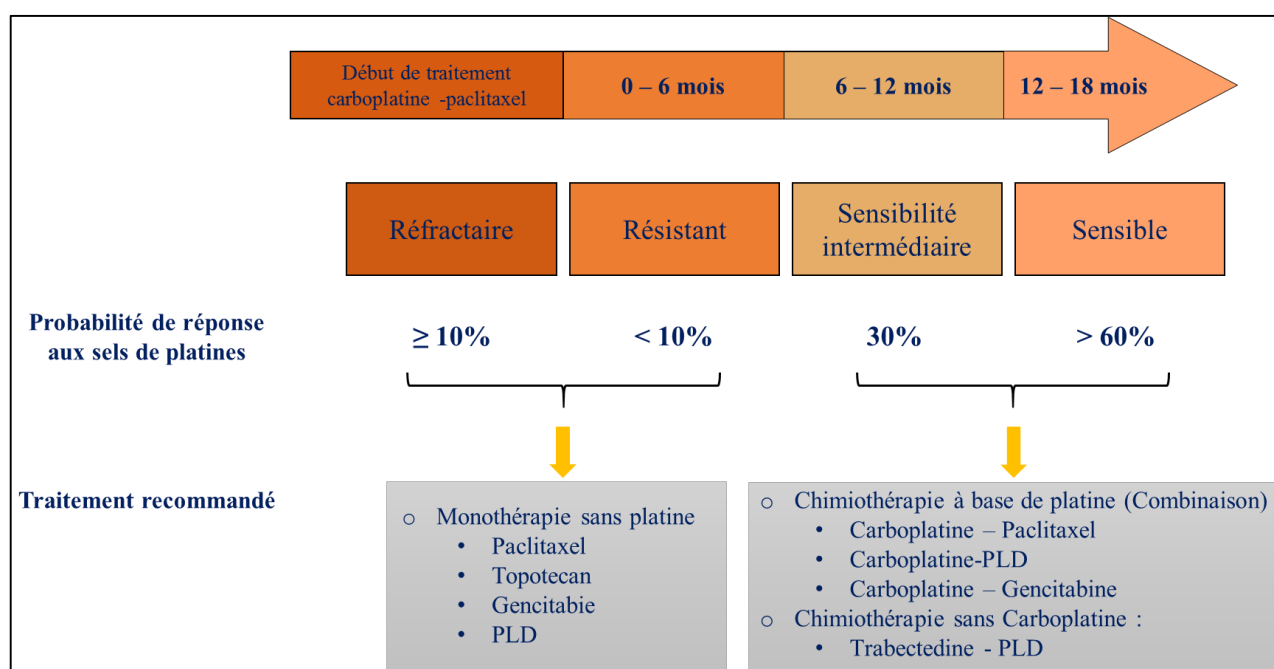


Figure 12 : Prédiction de la réponse à la chimiothérapie des cancers ovariens récidivants en fonction de la classification clinique basée sur l'intervalle libre de platine.

PLD : Doxorubicine Liposomale Pegylée. (D'après Colombo et al., 2014).

I.3.3.3.1. Traitement des cancers de l'ovaire résistants au platine

Le traitement des rechutes dans les cancers de l'ovaire reste un challenge majeur pour les cliniciens. Actuellement, très peu de médicaments montrent une efficacité thérapeutique en seconde ligne. Parmi les médicaments utilisés figurent le carboplatine/cisplatine, le paclitaxel, le topotecan, la doxorubicine liposomale pegylée (PLD) qui sont approuvés par la FDA (Food and Drug Administration). Tel que défini plus haut, le traitement des récurrences est principalement dépendant de la réponse au traitement de première ligne à base de platine.

Platine réfractaires : ce groupe de patientes présente une progression de la maladie tout au long de la chimiothérapie initiale avec une résistance intrinsèque au platine. Cette catégorie de patientes représente moins de 10% des carcinomes ovariens séreux de haut grade. Leur pronostic est mauvais et leur survie globale est très courte. Elles sont traitées le plus souvent avec des stratégies sans platine à base de paclitaxel, topotecan, gemcitabine ou doxorubicine liposomale pegylée en monothérapie.

Platine résistantes : leur récurrence se manifeste dans les six premiers mois après la fin de la chimiothérapie initiale. La probabilité de réponse à la seconde ligne de traitement est très faible (10-20%). Ces patientes reçoivent une monothérapie sans platine à base de paclitaxel, topotecan, gemcitabine ou doxorubicine liposomale pegylée. L'intérêt de traiter ce groupe de patientes est de lui offrir une qualité de vie acceptable et de surveiller de près l'évolution de leur maladie (Ledermann and Kristeleit, 2010).

L'intégration de la thérapie ciblée dans le traitement des cancers de l'ovaire chimiorésistants a démontré un bénéfice majeur. En effet, l'essai clinique randomisé de phase III « AURELIA » réalisé sur des patientes résistantes au platine a comparé l'efficacité des agents chimiothérapeutiques paclitaxel, PLD ou topotecan en agents seuls ou en association avec le Bévacicumab (10mg/kg toutes les deux semaines ou 15mg/kg toutes les 3 semaines). L'introduction du Bévacicumab a augmenté de manière significative la survie sans progression (6.7mois vs 3.4 mois) et le taux de réponse (27.3% vs 11.8%, $p < 0.001$) (Pujade-Lauraine et al., 2010 ; Poveda et al., 2015).

1.3.3.2. Traitement des cancers de l'ovaire sensible au platine

Platine partiellement sensible : dans ce cas de figure, la récurrence survient dans un intervalle compris entre six mois et un an après la fin de la chimiothérapie de première ligne. Ces patientes présentent une chance de réponse à la chimiothérapie à base de platine comprise entre 30 et 40% et sont généralement traitées comme les patientes sensibles au platine.

Platine sensibles : la récurrence survient au-delà d'un an après la fin du traitement initial. Ces patientes présentent un taux de réponse à la chimiothérapie à base de platine supérieur à 60%. En cas de récurrence, ce groupe de patientes est traité par la chimiothérapie combinant carboplatine au paclitaxel, à la doxorubicine liposomale pegylée (PLD) ou à la gemcitabine. Cependant, certaines patientes développent une allergie pour le carboplatine. Dans ce cas, le traitement est remplacé par l'association de la PLD avec la trabectedine (Monk et al., 2010).

Les thérapies ciblées ont également été évaluées pour le traitement des cancers de l'ovaire sensibles au platine. L'association du Bévacicumab (15mg/kg) à la combinaison de carboplatine–gencitabine suivi d'un traitement de maintien à base du Bévacicumab durant 6 à 10 cycles, a été évaluée dans l'essai clinique OCEAN. Dans cette étude le Bévacicumab a démontré une amélioration de la survie sans progression et une augmentation significative du taux de réponse (de 57.4% à 78,5%, $p < 0.001$) (Aghajanian et al., 2012).

I.3.4. La déficience de la recombinaison homologue : inhibiteur de PARP

Les inhibiteurs de PARP ont également montré un intérêt majeur dans le traitement des cancers de l'ovaire sensibles au platine. L'olaparib est l'un des médicaments qui ont montré une bonne efficacité et une bonne tolérance par les patientes. L'administration par voie orale de l'olaparib (20mg en capsule deux fois par jour pendant 10 jours tous les 21 jours) en association avec la chimiothérapie à base de carboplatine (AUC 4mg/ml/min par jour) et de paclitaxel (175mg/m² par jour), suivie d'un traitement continu avec de l'olaparib en monothérapie (40mg en capsule deux fois par jour) a démontré une amélioration significative de la survie et de la qualité de vie des patientes, en particulier celles présentant un phénotype « BRCAness » (11.2% vs 4.3 mois ; HR 0,18 ; $p < 0.001$) (Ledermann et al., 2012 ; Oza et al., 2015).

La stabilité génomique des cellules est maintenue grâce à la réparation des lésions d'ADN causées par leur exposition à des agents exogènes, ou survenues de manière spontanée au moment de la réplication de leur ADN (Figure 13). Ces lésions sont de plusieurs sortes : i) modification de bases, ii) cassures simple brin, iii) cassures double brin et iv) épissage alternatif inter ou intra-chromosomique.

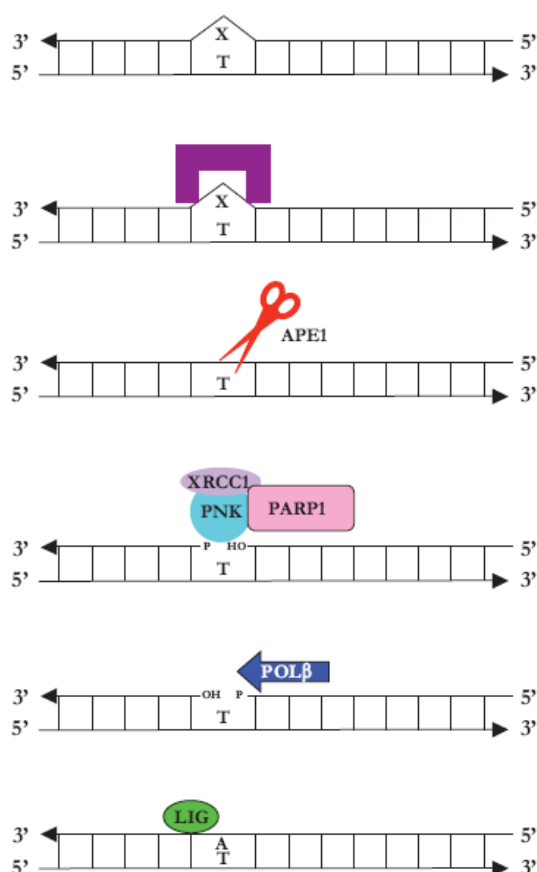


Figure 13 : Mécanisme de réparation de l'ADN par excision de base.

La base endommagée (X) est éliminée par une ADN glycosylase spécifique du type de dommage et l'ADN est incisé par l'endonuclease APE1 au niveau du site abasique formé. Les protéines XRCC1 et PARP1 interviennent alors et recrutent une polynucléotide kinase qui phosphoryle l'extrémité 5'OH et déphosphoryle l'extrémité 3'P au niveau de la coupure, étape indispensable pour la restauration de la liaison phosphodiester par l'ADN polymérase. Dans la voie principale appelée short patch (la seule représentée ici), la base manquante est simplement remplacée par l'ADN polymérase β et la ligation réalisée par l'ADN ligase 3.

La cassure simple brin est l'une des lésions les plus fréquentes. Elle est souvent réparée par plusieurs mécanismes tels que le mécanisme d'excision de base ou de nucléotide ou par le mécanisme de réparation des mésappariements. Le mécanisme d'excision de base est le mécanisme le plus fréquemment employé par la cellule pour réparer cette lésion en faisant intervenir des enzymes nucléaires de la famille des Poly-Adenosine Diphosphate-ribose-Polymérase (PARP) (Papa et al., 2016). Cette famille d'enzymes est constituée de 18 protéines parmi lesquelles on distingue les enzymes PARP1 et 2 qui sont les premières protéines à être activées et qui permettent le recrutement des autres protéines nécessaires à la réparation.

La cassure double brin de l'ADN est l'une des plus importantes lésions conduisant à l'instabilité génomique et/ou à la mort cellulaire. Elle survient souvent lors de la réplication de l'ADN au moment où la fourche de réplication rencontre une cassure simple brin dont la réparation n'a pas été effectuée. Les cassures doubles brins sont souvent réparées par le mécanisme de la recombinaison homologue, qui fait intervenir d'importantes protéines notamment codées par les gènes *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51* et *PALB2*. Les gènes associés au cancer du sein (*BRCA1/2*) jouent un rôle très important dans le maintien de la stabilité génomique en permettant une réparation précise des cassures doubles brins (Li and

Greenberg, 2012). La voie de la recombinaison homologue (RH) en association avec les enzymes nucléaire PARP, est l'une des principales voies de réparation de l'ADN.

Dans le cancer de l'ovaire et principalement les carcinomes séreux de haut grade, les gènes *BRCA1/2* sont le plus souvent mutés et la recombinaison homologue est donc défectueuse (approximativement 50% des CSHG présentent une RH déficiente dont 25% présentent une mutation au niveau des gènes *BRCA1/2*). Cependant, l'altération de la voie de recombinaison homologue n'est pas suffisante pour induire la mort des cellules cancéreuses car ces dernières font intervenir d'autres voies alternatives de réparation qui peuvent être contrecarrées par les inhibiteurs de PARP (Li and Greenberg, 2012). En effet, l'inhibition de PARP conduit à une mauvaise réparation des cassures simples brins et favorise l'accumulation des cassures doubles brins lors de la réplication de l'ADN, conduisant à l'arrêt du cycle et la mort des cellules cancéreuses. Cette approche thérapeutique est l'une des stratégies les plus prometteuses pour le traitement des cancers de l'ovaire portant des altérations au niveau de la voie de la recombinaison homologue (mutation perte de fonction des gènes *BRCA1* et 2). Actuellement de nombreux inhibiteurs de PARP ont été développés et font l'objet de plusieurs essais cliniques.

Partie II : Implication de la famille Bcl-2 dans le contrôle de la (des) mort(s) cellulaire(s)

II.1. Introduction de la mort par apoptose et son implication dans les processus physiologiques et pathologiques

Tout au long de la vie d'un organisme, les cellules sont confrontées à divers stimuli qui provoquent des dommages à différents niveaux de la cellule. Cette dernière, en réponse à ces signaux, déclenche plusieurs processus qui ont pour rôle la réparation de ces dommages. Cependant, dans certains cas, le système de réparation cellulaire échoue, laissant place au processus destructif conduisant à la mort de la cellule endommagée. La mort cellulaire est classée en trois grandes classes à savoir l'apoptose, la nécrose et l'autophagie. L'activation de tel ou tel type de mort est dépendant de la nature du stimulus et/ou de son intensité. Dans ce manuscrit je me focaliserai sur la mort par apoptose, son rôle physiologique, ses mécanismes de contrôle, et son altération dans les cancers dont le rétablissement est l'objet principal de mon projet de thèse

L'apoptose, également qualifiée de mort cellulaire programmée ou encore de suicide cellulaire, est un processus physiologique qui joue un rôle primordial dans le développement et l'homéostasie des organismes pluricellulaires. Le processus apoptotique fait son apparition dès les premiers stades de l'embryogenèse pour permettre la structuration des tissus et la sculpture des organes tels que l'organisation du système nerveux centrale et l'élaboration du système immunitaire (Czabotar et al., 2014). Il se poursuit tout au long de la vie comme un mécanisme d'homéostasie qui assure le renouvellement et le maintien de la population cellulaire dans les tissus, et plus particulièrement dans les tissus à turnover très rapide tels que l'épithélium intestinal ou le système hématopoïétique. L'apoptose agit également comme un mécanisme de défense qui permet de débarrasser l'organisme des cellules devenues inutiles, à la fin de la réaction immunitaire par exemple, ou des cellules endommagées par la maladie ou des agents nuisibles (Norbury and Hickson, 2001).

L'implication de l'apoptose dans plusieurs processus physiologiques fait d'elle un mécanisme très important dont la dérégulation contribue à la pathogénie de nombreuses maladies (Shafi, 2016). En effet, la stimulation excessive d'apoptose conduit à certaines maladies neurodégénératives, comme les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson, ou encore à la disparition des lymphocytes CD4⁺ dans le cadre du syndrome d'immunodéficience acquise (Shao et al., 2017 ; Gougeon and Montagnier, 1999). En revanche, un défaut dans l'apoptose favorise la prolifération anarchique et non contrôlée de cellules. Ceci peut conduire au développement de maladies auto-immunes résultantes de l'apparition de lymphocytes auto-

réactifs qui n'ont pas été éliminés par apoptose au cours de la sélection clonale lymphocytaire, mais également à l'apparition des pathologies cancéreuses (Thompson, 1995). La carcinogenèse résulte en effet d'un ensemble d'altérations qui conduit à la transformation des cellules normales en cellules malignes. Ces cellules sont caractérisées par une autosuffisance et une dépendance vis-à-vis des facteurs de croissance, une insensibilité aux signaux d'inhibition de croissance, un potentiel réplicatif illimité, un potentiel angiogénique et invasif, ainsi que par une capacité accrue d'échappement à l'apoptose (Hanahan and Weinberg, 2000). En effet, les études moléculaires ont révélé que la majorité des altérations touchent les gènes agissant sur les voies de l'exécution de l'apoptose.

II.2. Signaux d'induction et caractéristiques morphologiques de l'apoptose

L'apoptose peut être induite par plusieurs stimuli de types physiologiques ou pathologiques tels que la chaleur, le manque de nutriment, l'hypoxie, l'irradiation et les agents chimiothérapeutiques. En réponse à de telles stimulations, la cellule apoptotique subit plusieurs modifications morphologiques caractérisées par un arrondissement de la cellule, une condensation chromatinienne et une fragmentation nucléaire, un rétrécissement cytoplasmique et nucléaire avec une modification mineure du cytoplasme et des organelles, et un bourgeonnement cellulaire (Kerr et al., 1995). Cette dernière modification conduit à la désintégration de la cellule en petites vésicules entourées de membrane plasmique avec un contenu intra-vésiculaire varié, appelés « corps apoptotiques » (Figure 14). Ces derniers, grâce à leurs caractéristiques membranaires, notamment la translocation des phosphatidylsérines (PS) et de certaines protéines telles que l'Annexine V et la calréticuline vers la surface externe, sont reconnus par les phagocytes et dégradés par leurs lysosomes, empêchant ainsi l'induction d'une action destructive envers les tissus adjacents (Nagata et al., 2010 ; Elmore, 2007).

La cellule mourante s'engage dans plusieurs processus réversibles jusqu'au point où elle entame son premier processus irréversible (point de non-retour). A ce moment, la cellule apoptotique engage une série d'évènements biochimiques irréversibles, telles que la perte du potentiel membranaire mitochondrial, la génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'accumulation des cassures doubles brins de l'ADN, l'exposition des PS sur la bicouche externe de la membrane plasmique qui permet la reconnaissance des cellules apoptotiques et leur élimination par les macrophages

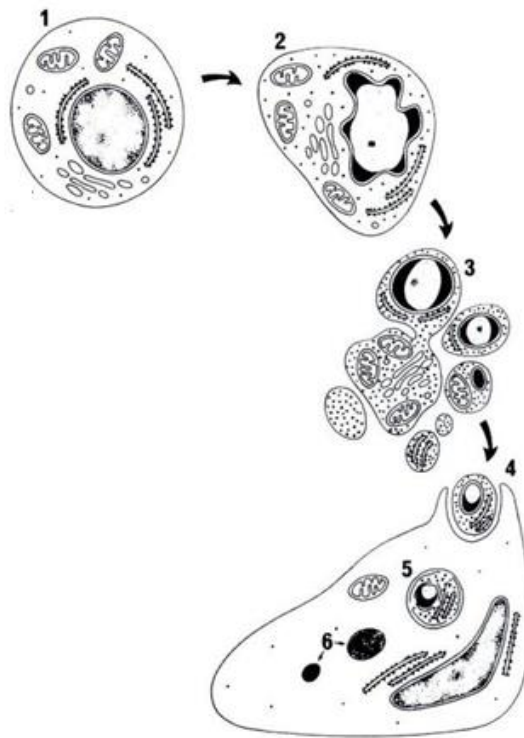


Figure 14 : Figure 14. Illustration des changements morphologiques de la cellule en cours du processus d'apoptose (Kerr et al., 1995).

La perte du potentiel de membrane mitochondriale et sa perméabilisation constituent l'une des modifications biochimiques les plus spécifiques de l'apoptose induite par la voie mitochondriale. Elle conduit au relargage, de la mitochondrie vers le cytosol, de plusieurs facteurs apoptogènes, responsables de l'activation de protéases et de nucléases dont l'activité conduit en grande partie aux caractéristiques biochimiques et morphologiques citées précédemment.

II.3. Voies d'induction de l'apoptose

Il existe plusieurs voies d'activation de l'apoptose dont trois ont été décrites (Figure 15) : il s'agit d'une part de la voie extrinsèque, qui fait intervenir un signal extérieur perçu par des récepteurs membranaires, et d'autre part des voies intrinsèques, qui comprennent notamment la voie mitochondriale et la voie du réticulum endoplasmique (RE).

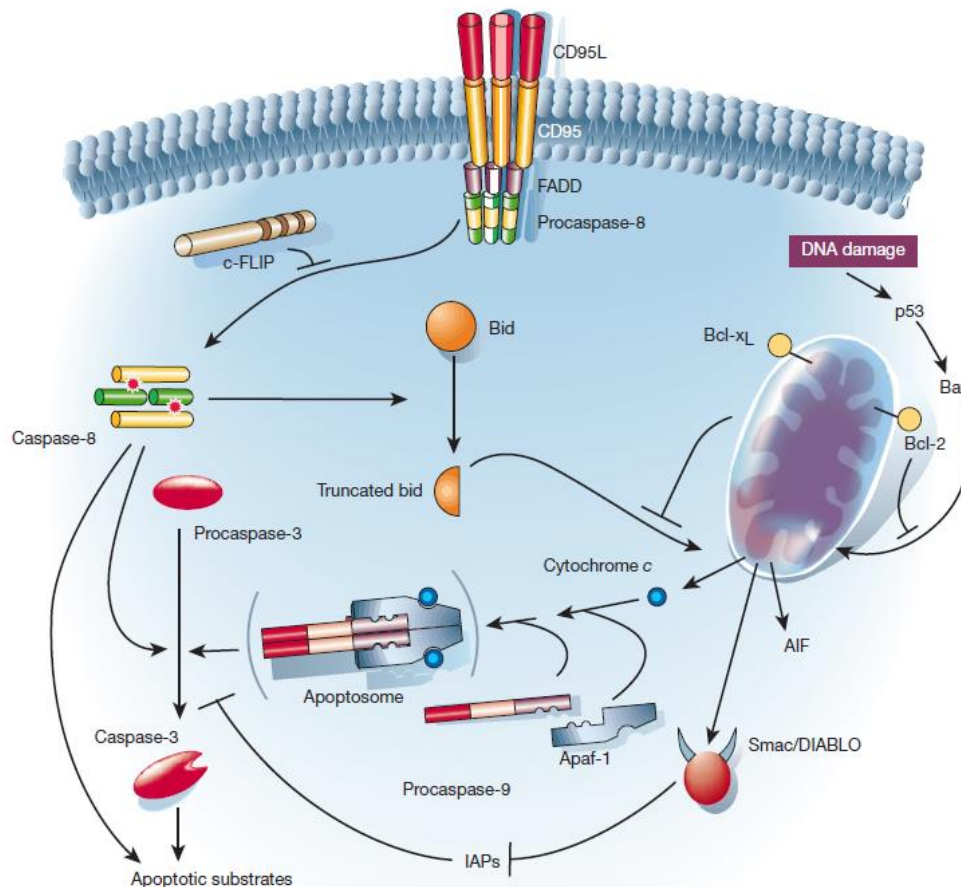


Figure 15 : Les différentes voies d'induction de l'apoptose.

L'activation de l'une de ces voies est conditionnée par la nature du signal de mort auquel la cellule est exposée (Danial and Korsmeyer, 2004 ; Hotchkiss et al., 2009). Cependant, dans la plupart des cas, ces voies communiquent entre elles, conduisant à une amplification du signal apoptotique. Ainsi l'activation de la voie extrinsèque peut aboutir à l'activation de la voie mitochondriale. De la même manière, l'activation de la voie du RE peut également activer la voie mitochondriale. Ces mécanismes sont détaillés ci-dessous.

II.3.1. La voie extrinsèque

Egalement appelée voie des récepteurs de mort, la voie extrinsèque est initiée par l'engagement et l'activation des récepteurs de mort par leurs ligands spécifiques (Figure 16). Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires de la superfamille des TNF (Tumor Necrosis Factor), qui comprend les récepteurs Fas (Apo 1, CD95), TNF R1, DR3 (Apo 2),

DR4 et DR5 (appelés aussi Tumor necrosis factor Related Apoptosis-Inducing Ligand receptor TRAIL1 et TRAIL2) et DR6. Ces récepteurs jouent un rôle très important dans la surveillance immunitaire des cellules transformées ou transfectées par des virus, l'élimination des cellules immunitaires autoréactives et le maintien de l'homéostasie cellulaire. L'altération de cette voie est impliquée dans la tumorigénèse ou les maladies autoimmunes (Müllauer et al., 2001).

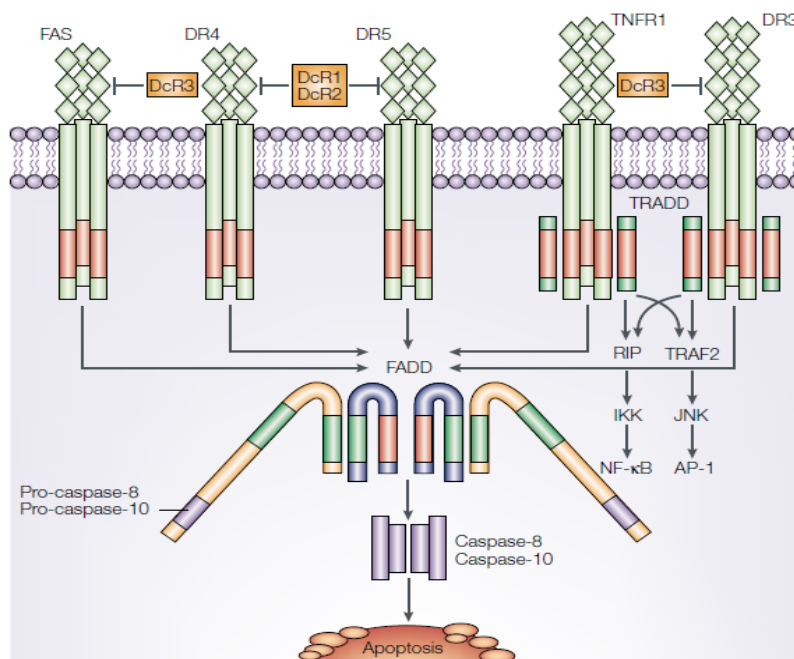


Figure 16 : Les différents récepteurs de mort et plateforme moléculaire de signalisation apoptotique (Ashkenazi, 2002).

Les récepteurs de mort possèdent dans leur partie intracellulaire un domaine d'interaction aux protéines appelé le domaine de mort, crucial pour la transduction du signal apoptotique. L'interaction de ces récepteurs avec leur ligand induit leur oligomérisation et le recrutement, au niveau du domaine de mort, des protéines adaptatrices telles que Fas-associated death domain (FADD), TNF receptor-associated death domain (TRAD), Receptor-interacting protein (RIP) (Figure 16). Ces protéines adaptatrices recrutent à leur tour de multiples procaspase-8, des protéines protéolytiques, et forment ainsi le DISC (Death Inducing signaling Complex) (Ghobrial et al., 2005). Cette plateforme de signalisation favorise l'auto-activation de la caspase-8 et l'induction de l'apoptose par le déclenchement d'une cascade protéolytique *via* l'activation d'autres caspases effectrices telles que la caspase 3 et 7 (Micheau et al., 2013).

Le processus apoptotique déclenché par les récepteurs de mort est amplifié par l'activation de la voie mitochondriale assurée par la protéine t-Bid, membre BH3-only de la famille Bcl-2, elle-même activée par clivage par la caspase 8 (Figure 16). Cette dernière permet alors d'activer les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, Bax et Bak, entraînant ainsi la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et l'induction de l'apoptose.

L'apoptose induite par les récepteurs de mort pourrait être inhibée par certaines protéines cytoplasmiques telles que les protéines c-FLIP (FLICE-inhibitory protein) qui interagissent avec FADD et la caspase 8, favorisant ainsi leur inactivation (Scaffidi et al., 1999 ; Kataoka et al., 1998).

II.3.2. La voies intrinsèque

Elle est activée par une multitude de stimuli intracellulaires physiologiques ou cytotoxiques tels que les dommages à l'ADN ou au cytosquelette, les infections virales, le stress du réticulum endoplasmique, la perte de l'adhésion cellulaire ...etc. Le terme de voie intrinsèque englobe en fait plusieurs voies d'induction de l'apoptose parmi lesquelles se distingue par la fréquence de leur mise en œuvre la voie mitochondriale et la voie du réticulum, détaillées successivement ci-après.

II.3.2.1. Mitochondriale

Elle est déclenchée de manière directe *via* des signaux de stress internes ou de manière indirecte suite à l'activation de la voie des récepteurs de mort. L'activation de la voie mitochondriale conduit à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie et au relargage des facteurs apoptogènes, tels que le cytochrome c, les inhibiteurs d'IAP, l'AIF, ou encore l'endonucléase G, de l'espace inter-membranaire mitochondrial vers le cytosol. Se retrouvant dans le compartiment cytosolique, les molécules du cytochrome c se lient aux protéines adaptatrices Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor1) formant ainsi un hexamère qui se lie à plusieurs molécules de procaspase 9 conduisant à leur activation (Goldar et al., 2015). La caspase 9 activée clive et active à son tour les caspases effectrices, induisant ainsi la mort cellulaire par apoptose (Figure 17).

La perméabilisation de la membrane mitochondriale libère donc également des molécules de gros poids moléculaire telles que Smac/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/ Direct IAP binding protein with low isoelectric point) et HTRA2 (High

Temperature Requirement protein A2). Ces facteurs apoptogènes sont capables d'induire la mort des cellules en interagissant avec des protéines inhibitrices des caspases telles que les IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) et c-Flip (Deveraux et al., 1997 ; Safa, 2013). Ces différents facteurs permettent donc l'induction de l'apoptose dépendante des caspases.

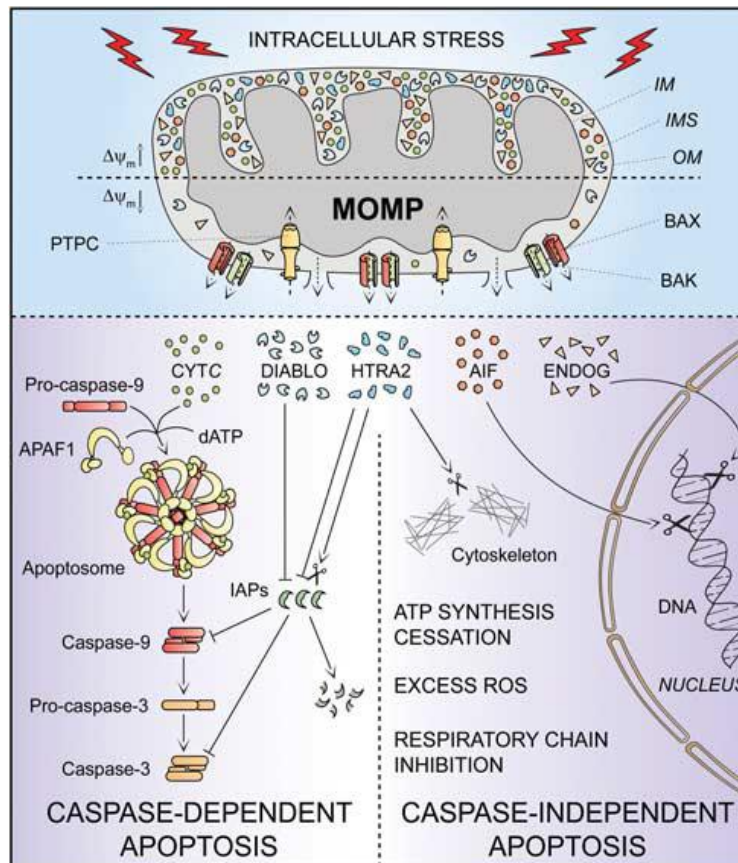


Figure 17 : Présentation de l'apoptose intrinsèque dépendante et indépendante des caspases (Galluzzi et al., 2012)

La voie mitochondriale peut également induire une apoptose indépendante des caspases. Ce processus est assuré par les facteurs inducteurs d'apoptose (AIF) et les Endonucléase G (ENDOG) libérés suite à la perméabilisation mitochondriale (Figure 17). Ces protéines de gros poids moléculaires sont transloquées dans le noyau où elles procèdent à la dégradation de l'ADN. La protéine HTRA2 peut également contribuer à l'apoptose indépendamment des caspases puisqu'elle assure la dégradation de plusieurs substrats tels que les protéines du cytosquelette (Galluzzi et al., 2012).

➤ *Modèles d'induction de la perméabilisation mitochondriale*

Plusieurs modèles d'induction de la perméabilisation mitochondriale en réponse au stress ont été décrits (Figure 18). Ces modèles font intervenir des protéines mitochondriales et d'autres cytosoliques qui vont être recrutées au niveau de la mitochondrie où elles s'oligomérisent pour former des pores ou des canaux de relargage de facteurs apoptogènes.

Le mécanisme le plus étudié est celui induit par l'oligomérisation des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak que je présenterai en détail un peu plus loin dans ce manuscrit (Figures 18). En réponse aux stimuli apoptotiques, Bax, initialement présent dans le cytosol, est transloqué dans la mitochondrie où il s'insère et forme avec les autres monomères activés de Bax un complexe multimérique de 96 à 260KDa, provoquant le relargage de facteur apoptogènes (Esques et al., 2000 ; Kuwana et al., 2005 ; Reed, 2006). Bax peut également former des complexes hétéromères avec la protéine active de Bak pour former ainsi des complexes multiprotéiques de 500KDa qui conduisent à l'altération de l'intégrité de la membrane mitochondriale et à l'induction de l'apoptose (Wei et al., 2001; Sundararajan et al., 2001 ; Antignani and Youle, 2006). L'oligomérisation de ces protéines est entravée par les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 selon un mécanisme qui sera détaillé plus loin (Mikhailov et al., 2003 ; Dlugosz et al., 2006).

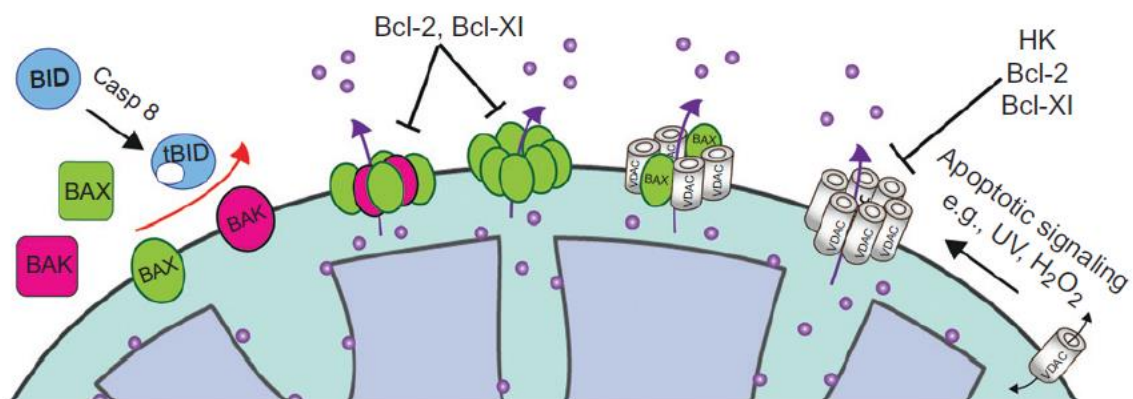


Figure 18 : Modèle de perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (Shoshan-Barmatz et al., 2015).

La perméabilisation mitochondriale peut également survenir en réponse à l'oligomérisation des canaux ioniques voltage dépend (VDAC). Ces canaux sont localisés dans la membrane externe de la mitochondrie et jouent un rôle physiologique très important dans le contrôle des cross-talk entre la mitochondrie et le reste de la cellule, le transport des métabolites tels que le pyruvate, le succinate et NADH, ainsi que dans l'induction de l'apoptose. En réponse au

stimuli intracellulaires ou aux agents chimiothérapeutiques tels que le cisplatine et l'etoposide, l'homo-oligomérisation des VDAC ou leur hétéro-oligomérisation avec les protéines pro-apoptotiques (Bax ou Bak) conduit à la formation de méga-pores au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, permettant le relargage du cytochrome c et des molécules apoptogènes responsables de l'induction de l'apoptose (Shoshan-Barmatz et al., 2015).

II.3.2.2. Réticulum Endoplasmique (RE)

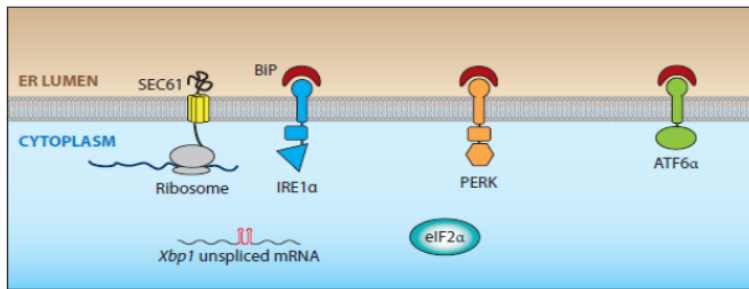
Le réticulum endoplasmique est l'organite principal dans lequel les protéines transmembranaires et sécrétoires sont synthétisées, assemblées et contrôlées. Il est aussi le lieu de la biosynthèse des phospholipides et du cholestérol mais également un élément fondamental de régulation des flux calciques (Iurlaro and Muñoz-Pinedo, 2016). Le dysfonctionnement de certains de ces processus physiologiques en réponse à un déséquilibre cellulaire engendre un stress du RE.

II.3.2.2.1. Implication des protéines mal repliées dans le stress du RE et l'induction de l'apoptose

L'accumulation de protéines mal repliées est l'un des éléments déclencheurs du stress du RE. Ce défaut de repliement est détecté grâce à des protéines chaperonnes telles que Bip et éliminé par le processus ERAD (ER Associated Degradation) activé par la réponse UPR (Unfolded Protein Response). L'objectif principal de cette réponse est d'établir un programme adapté pour restaurer l'homéostasie du RE. Ainsi elle augmente la capacité de repliement des protéines, inhibe la synthèse de nouvelles protéines et dégrade les protéines défectueuses. Dans le cas où l'homéostasie n'est pas rétablie, la réponse UPR évolue vers l'induction de l'apoptose et la dégradation des cellules endommagées (Figure 19).

La réponse UPR pro-survie : fait intervenir trois types de protéines senseurs : IRE-1 α (Inositol-Requiring Enzyme-1 α), PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase) et ATF6 (Activating Transcription Factor-6 α). A l'état d'équilibre physiologique, ces médiateurs sont maintenus inactifs par leur association aux protéines Bip. En réponse au stress, les protéines Bip se lient aux protéines mal repliées présentes dans la lumière du RE, libérant ainsi les protéines médiatrices. Ces dernières favorisent la synthèse de protéines chaperonnes et l'activation du processus ERAD pour contrôler et dégrader les protéines mal repliées qui encombrant le RE et restaurer son homéostasie. Cependant, l'échec de cette voie de réparation conduit à la destruction par apoptose de la cellule stressée.

A) Absence de stress



B) Présence de stress

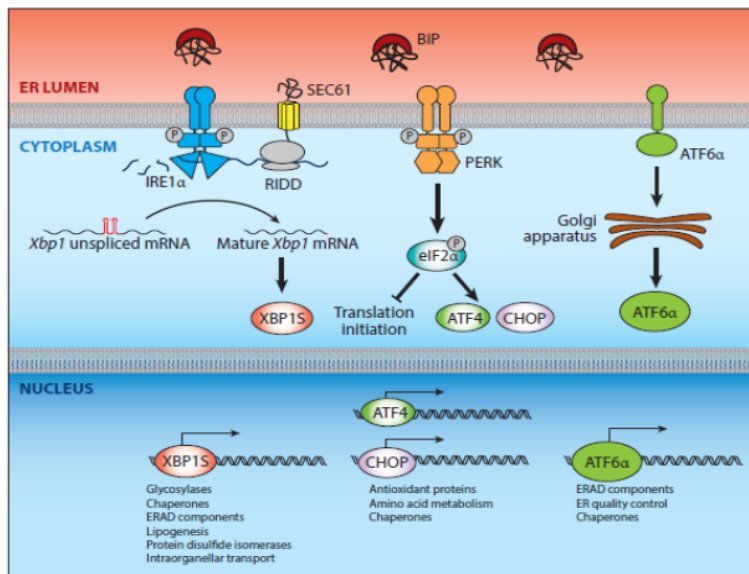


Figure 19 : La réponse UPR.

(A) En absence de stress, les médiateurs de la réponse UPR sont maintenus inactifs par les protéines chaperonnes Bip. (B) En réponse au stress engendré par l'accumulation des protéines mal repliées, les médiateurs sont libérés conduisant à leur activation. La protéine IRE1α produit l'épissage alternatif de l'ARN *xbp1* et active ainsi la transcription des gènes impliqués dans la réponse UPR. La protéine PERK phosphoryle eIF2α et inhibe la traduction des nouvelles protéines au profit des facteurs de transcription ATF4 et CHOP. ATF6α est transloqué dans l'appareil de Golgi où il sera débarrassé de son extrémité N-terminale pour être par la suite transloqué dans le noyau où il transcrit les gènes nécessaires pour la réponse UPR. Les trois médiateurs fonctionnent ensemble pour restaurer l'équilibre dans le RE ou induire l'apoptose dans le cas contraire (Bettigole and Glimcher, 2015).

La réponse UPR pro-apoptotique : En réponse au stress aigu et prolongé, le RE développe une réponse UPR pro-apoptotique (Figure 19). Elle conduit à l'inhibition des voies impliquées dans la survie et engage celles qui conduisent à l'apoptose, gérées par les protéines PERK. Ainsi une cascade de signalisation est déclenchée conduisant à l'inhibition de la traduction des protéines par la phosphorylation du facteur de traduction l'eIF2α (eucaryotic Initiation Translated Factor) qui augmente la traduction du facteur de transcription ATF-4 (Activating Transcription Factor-4). Ce dernier, une fois transloqué dans le noyau, contribue à la mort par apoptose via l'expression du facteur de transcription CHOP (C/EBP homologous protein), l'induction du stress oxydatif et de la synthèse de protéines. L'induction de cette voie conduit à la phosphorylation inactivatrice des protéines anti-apoptotiques, à l'induction de l'expression des protéines pro-apoptotiques telles que Bim, Puma et Noxa, ainsi qu'à celle des récepteurs de mort (Bettigole and Glimcher, 2015).

II.3.2.2.2. Implication de la signalisation calcique dans le stress du RE et l'induction de l'apoptose

Le calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) est un autre paramètre jouant un rôle très important dans l'induction du stress du RE. Il est principalement stocké au niveau du RE grâce à l'action de plusieurs protéines telles que les Sarco/endoplasmic reticulum ATPase (SERCA), les Calréticulines et les Calnexines. Or, le relargage du calcium endoplasmique se fait principalement par les récepteurs Inositol 1,4,5 triphosphate (IP3R) (Danese et al., 2017).

La signalisation calcique constitue un moyen de communication intracellulaire permettant de contrôler et d'influencer différents processus cellulaires. Dans les conditions physiologiques, la concentration intracellulaire du calcium $[Ca^{2+}]_i$ est maintenue faible avec une augmentation transitoire sous forme d'oscillations calciques nécessaires à la transduction des signaux de survie et d'équilibre cellulaire. Or, dans les conditions de stress la $[Ca^{2+}]_i$ est dramatiquement élevée suite au relargage excessif et prolongé du calcium stocké dans le RE vers le cytosol. Ce phénomène est souvent observé soit en réponse aux inducteurs physiologiques de l'apoptose tels que les corticostéroïdes ou bien en réponse aux inducteurs pharmacologiques tels que le cisplatine (Danese et al., 2017). L'ouverture des canaux calciques est hautement régulée par les membres de la famille Bcl-2 localisés au niveau de la membrane du RE. La surexpression des anti-apoptotiques tels que Bcl-2 ou l'inactivation de Bax et Bak conduit à une inhibition du relargage de calcium du RE, empêchant ainsi la survenue de l'apoptose (Figure 20).

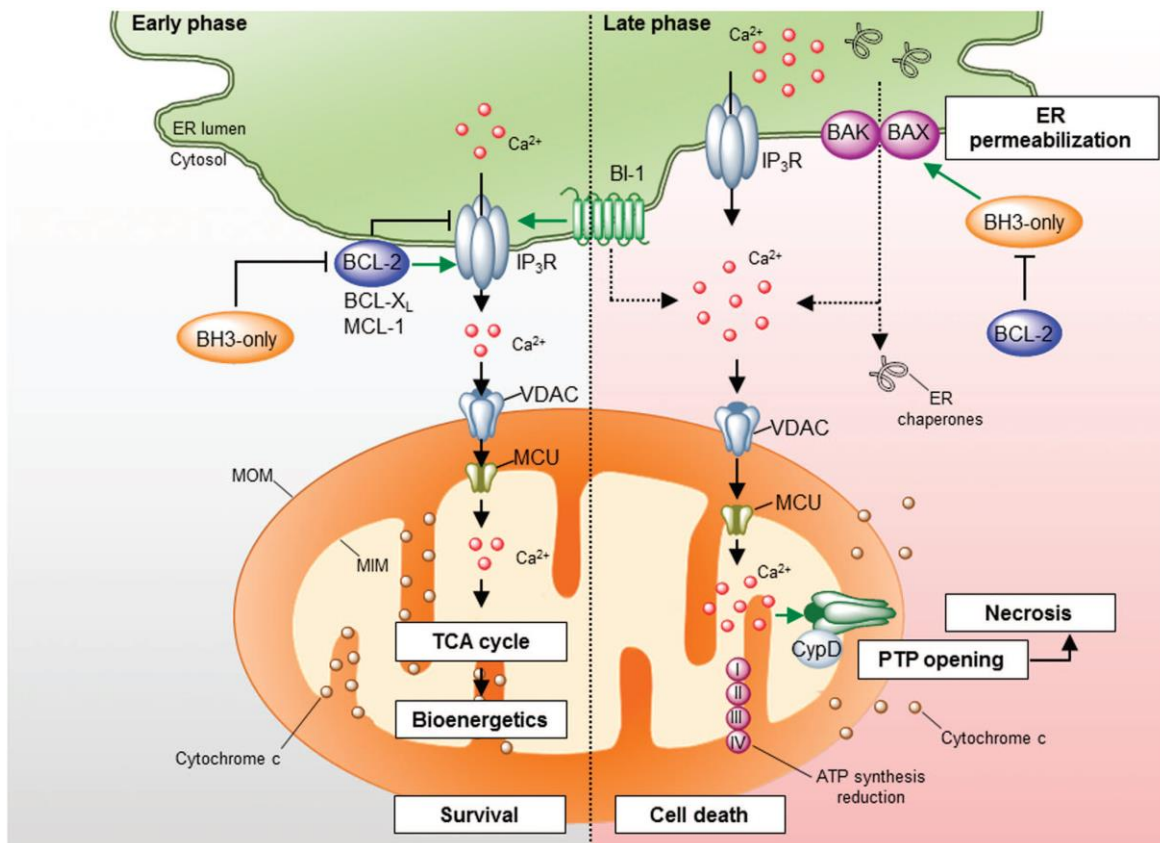


Figure 20 : Régulation de l'homéostasie calcique par la famille Bcl-2.

Les membres de la famille Bcl-2 localisés dans le RE régulent principalement l'homéostasie calcique en modulant l'activité du récepteur d'IP₃R. Dans la cellule saine, les anti-apoptotiques tels que Bcl-2 interagissent avec le récepteur IP₃R et diminuent le relargage massif du calcium et maintiennent son oscillation. Ce signal est transmis *via* les VDAC et les canaux MCU1 à la membrane externe et interne de la mitochondrie respectivement, favorisant ainsi la survie. Les anti-apoptotiques peuvent être contrecarrés par les BH3-only ou les effecteurs pro-apoptotiques. Dans la cellule engagée dans le processus apoptotique, lorsque les anti-apoptotiques sont inhibés par les protéines pro-apoptotiques, les récepteurs IP₃R ne sont plus régulés. Ils deviennent donc constitutivement actifs, conduisant à une sortie massive du calcium dans le cytosol qui va être rapidement capturé par la mitochondrie. Ceci provoque le gonflement mitochondrial, la diminution de la production d'énergie et l'ouverture des canaux PTP, favorisant ainsi la survenue de la nécrose. La membrane du RE devient perméable, causant le relargage du calcium et des protéines résidentes. L'ensemble favorise l'induction de l'apoptose (Pihán et al., 2017).

La modulation du $[Ca^{2+}]_i$ est également assurée par la mitochondrie associée au RE dans cette fonction. En effet, l'interaction RE-mitochondrie a récemment été mise en évidence par la visualisation de microdomaines où le RE et les mitochondries sont en contact étroit *via* des complexes multi-protéiques (Pinton et al., 2008). Cette interconnexion permet l'absorption du calcium libéré par le RE *via* les canaux VDAC et la restauration de l'homéostasie calcique dans la cellule (Figure 20). Cependant, l'accumulation aberrante du calcium par la mitochondrie conduit à une augmentation de la production des ROS, à une ouverture des canaux ioniques, à une atrophie mitochondriale et à une rupture de la membrane mitochondriale responsable de la libération des facteurs apoptogènes (Vervliet et al., 2016). Le calcium cytosolique est également capable d'induire la déphosphorylation de la protéine

BH3-only pro-apoptotique Bad *via* la calréticuline. La déphosphorylation de Bad favorise sa libération de la protéine 14-3-3, son interaction avec la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L et la dé-séquestration des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak responsables de la perméabilisation de la mitochondrie (Vervliet et al., 2016). Les différentes voies d'induction de l'apoptose convergent vers l'activation des protéines protéolytiques appelées « caspases » pour cystéine aspartate protéase.

II.4. Modalités d'activation des caspases et conséquences

Les caspases sont des protéines protéolytiques largement connues pour leur implication dans le contrôle de la mort cellulaire et l'inflammation (Figure 21) (Shalini et al., 2015).

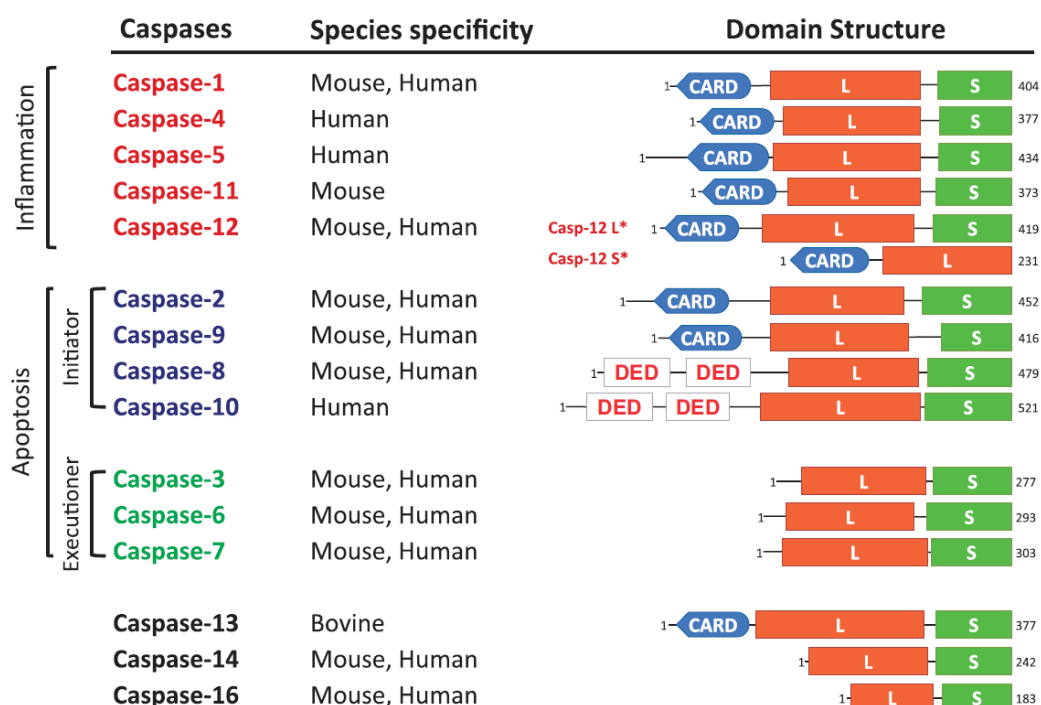


Figure 21 : Structure des différentes caspases et leur classification basée sur leur fonction chez les mammifères. (Shalini et al., 2015)

Actuellement, 18 caspases sont identifiées chez les mammifères. Sur la base de leur fonction, elles sont classées en tant que caspases impliquées dans le processus apoptotique telles que les caspase 2, 3, 7, 8, 9 et 10, et en tant qu'impliquées dans l'inflammation comme les caspases 1, 4, 5, 11 et 12. Les caspases apoptotiques sont subdivisées en caspases initiatrices (caspases 2, 8, 9 et 10) et effectrices (caspases 3, 6 et 7) qui sont activées en cascade. Les caspases initiatrices sont constituées d'un long pro-domaine qui permet leur recrutement au niveau des complexes de signalisation de mort et leur activation par le mécanisme « d'activation induite

par la proximité » (Kumar, 2006). Ces caspases sont activées par les deux voies de l'apoptose ; la voie mitochondriale et la voie des récepteurs de mort. L'induction de la voie mitochondriale provoque la libération du cytochrome c et de la protéine APAF-1 qui forme un complexe multimérique permettant le recrutement et l'activation de la caspase 2 et 9 via leur domaine de recrutement CARD (Caspase Recruitment Domain). De la même manière, l'activation de la voie des récepteurs de mort conduit au recrutement des pro-caspases 8 et 10 par leur domaine DED (Death Effector Domain) au niveau du complexe DISC et induit ainsi leur activation. Une fois les caspases initiateurs activées, elles procèdent à l'activation des caspases effectrices par clivage protéolytiques (Kumar, 2006 ; Shalini et al., 2015).

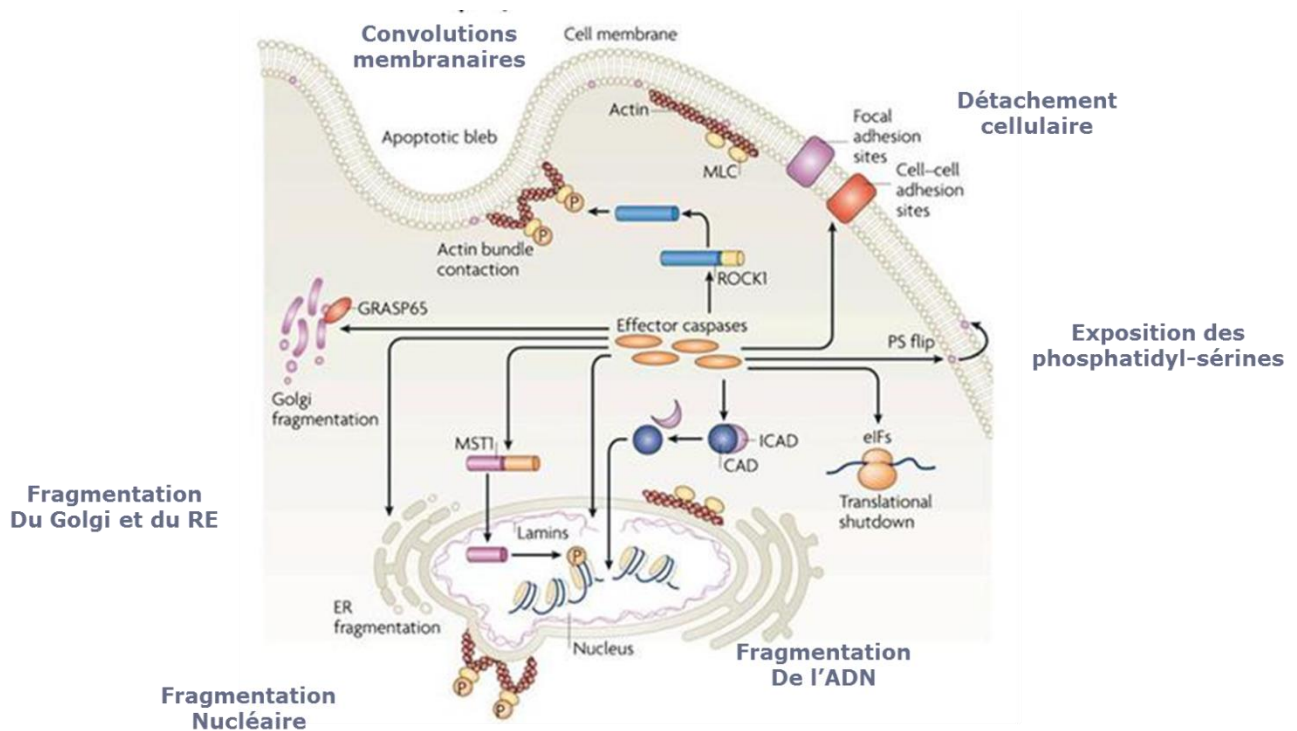


Figure 22 : Processus d'exécution de l'apoptose induite par les caspases (D'après Taylor et al., 2008).

L'activation de ces caspases engage une série d'évènements protéolytiques conduisant à des changements phénotypiques de la cellule caractéristiques de l'apoptose, à savoir le clivage de plusieurs facteurs impliqués dans la transcription et la traduction des protéines, la fragmentation nucléaire et la dégradation du noyau, la condensation et la dégradation de l'ADN, la fragmentation des organelles tels que l'appareil de Golgi et le RE, mais aussi la convolution membranaire, l'exposition des PS et le détachement de la cellule (Figure 22) (Taylor et al., 2008).

II.5. Contrôle de la voie mitochondriale par la famille Bcl-2

La perte du potentiel de membrane mitochondrial est un phénomène finement régulé par les membres de la famille Bcl-2 (B cell lymphoma-2). Ces protéines subdivisées en deux grandes classes dont la fonction est complètement opposée, pro- et anti-apoptotiques, jouent un rôle décisif sur le sort de la cellule. Le déséquilibre de cette famille est souvent relié à l'apparition des pathologies cancéreuses et à des résistances aux traitements chimiothérapeutiques. La composition de la famille Bcl-2, sa structure et son activation ainsi que son rôle est décrit ci-dessous :

II.5.1. Généralités sur la famille Bcl-2

La protéine Bcl-2 a été identifiée pour la première fois en 1986 dans les cellules de lymphome folliculaire humain à cellules B. Ce cancer est en grande partie dû à une translocation entre les chromosomes 14 et 18 (t14:18), plaçant le gène *BCL2* sous le promoteur des immunoglobulines et favorisant ainsi son abondante expression (Tsujimoto, 1997 ; Birkinshaw and Czabotar). La découverte de la séquence protéique de Bcl-2 a permis d'identifier une trentaine de protéines de la même famille qui partagent au moins un domaine d'homologie (BH) avec Bcl-2 (Aouacheria, 2014). La plupart de ces protéines possèdent les quatre domaines BH numérotés de BH1 à BH4 suivant leur chronologie de découverte (Figure 23). Les membres de la famille Bcl-2 sont subdivisés en fonction de leur activité en deux grandes classes :

Les protéines anti-apoptotiques, qui comprennent Bcl-2, Bcl-x_L (Bcl2l1), Bcl-w (Bcl2l2), Mcl-1 (Bcl2l3), Bfl-1, Bcl-B (BCL2L10). Ces protéines contiennent les 4 domaines BH (BH1, BH2, BH3 et BH4) et le domaine transmembranaire (TM) nécessaire à leur localisation au niveau de la membrane mitochondriale.

Les protéines pro-apoptotiques sont classées en protéines effectrices de l'apoptose, telles que Bax (Bcl2l4), Bak (Bcl2l7) et Bok (Bcl2l9) qui contiennent le domaine TM et les quatre domaines BH, et en protéines BH3-only notamment représentées par Bad, Bid, Bik, Bim, Bmf, HRK (DP5), Noxa, Puma et BNIP-3, et qui contiennent uniquement le domaine BH3 et dans certains cas le domaine TM (Figure 23). Les membres BH3-only sont groupés en deux catégories : les « activateurs » Bid, Bim et Puma et les « sensibilisateurs » Bad, Bik, Noxa, Bfm, Hrk et Bnip-3 (Hockings et al., 2015) en fonction de leur mécanisme d'action détaillé plus loin.

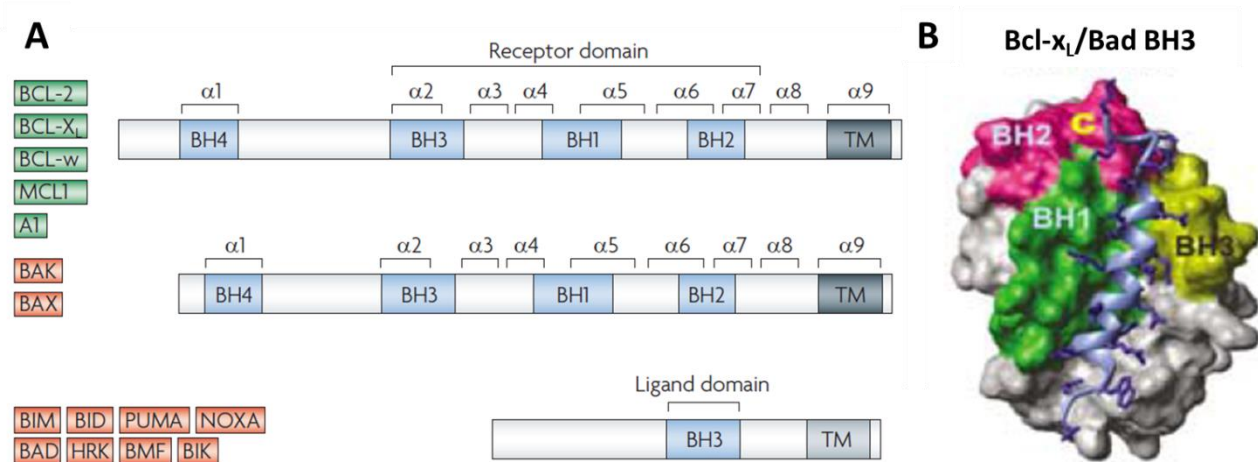


Figure 23 : Caractéristiques de la famille Bcl-2.

(A) Schéma des trois sous types de la famille Bcl-2 : protéines anti-apoptotiques (vert) et pro-apoptotique multidomaines et BH3-only (mentionnées en rouge). Les membres multidomaine pro et anti-apoptotiques possèdent un domaine récepteur qui est formé par le repliement des domaines BH1, BH2 et BH3 dans lequel vient s'insérer le ligand composé par le domaine BH3. Le positionnement des domaines BH, du domaine transmembranaire et des hélices α sont indiqués. (B) Représentation de l'interaction de l'hélice α du domaine BH3 de Bad de la cavité hydrophobe de Bcl-x_L formée par le repliement des trois domaines BH1, BH2 et BH3 (D'après Lessene et al., 2008 ; Cory et al., 2003).

II.5.2. Structure des protéines de la famille Bcl-2 : importance du domaine BH3 et de la cavité hydrophobe

La plupart des protéines de la famille Bcl-2 possèdent les quatre domaines d'homologie (BH1 à BH4) et présentent une conformation hélicoïdale globulaire composée de 9 hélices α dont 8 hélices forment le corps de ces protéines (Czabotar et al., 2014). Ces hélices sont majoritairement de nature amphiphile à l'exception de deux hélices hydrophobes ; l'hélice $\alpha 9$ qui représente la partie de la protéine ancrée dans la membrane externe de la mitochondrie et l'hélice $\alpha 5$ qui constitue la base du corps hélicoïdal. Les domaines BH sont représentés par des séquences de résidus aminés très conservés entre les membres de la famille Bcl-2. Ils sont répartis sur une ou plusieurs hélices α ; le domaine BH1 parcourt l'hélice $\alpha 7$ et $\alpha 8$, le domaine BH2 relie l'hélice $\alpha 4$ à $\alpha 5$, le domaine BH3 est localisé au niveau de l'hélice $\alpha 2$ et le domaine BH4 est situé sur l'hélice $\alpha 1$ (Figure 23A). Les domaines BH1, BH2 et BH3 sont fortement conservés entre les différents membres de la famille Bcl-2. Ils sont relativement proches dans l'espace et forment par leur repliement une cavité hydrophobe délimitée par les hélices $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ et $\alpha 5$, offrant ainsi un site de fixation au domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques (Figure 23B).

Contrairement aux autres domaines, le domaine BH4, situé dans la partie N-terminale de la protéine, présente une grande différence structurale. Le domaine BH4 ne participe pas à la formation de la poche hydrophobe des protéines multi-domaines. Cependant, il est impliqué dans les activités non-canoniques de la famille Bcl-2, telles que la différenciation cellulaire, l'invasion et l'angiogenèse mais aussi la dynamique et l'homéostasie mitochondriale (Aouacheria et al., 2013). Le clivage de ce domaine par les caspases génère des protéines à activité pro-apoptotiques à partir des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-x_L (Gabellini et al., 2017).

L'interaction entre les différentes classes de la famille Bcl-2 est fortement influencée par les domaines BH. Elle est effectuée *via* le domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques dans la cavité hydrophobe des anti-apoptotiques (Petros et al., 2000 ; Czabotar et al., 2007). Ces deux éléments structuraux permettent de réguler différents processus physiologiques de vie ou de mort cellulaire. Les caractéristiques du domaine BH3 des pro-apoptotiques et de chacune des cavités hydrophobes sont détaillées ci-dessous.

II.5.2.1. Structure du domaine BH3

Le domaine BH3 est impliqué dans les interactions entre les différents membres de la famille Bcl-2. Ces interactions comprennent : l'interaction des BH3-only avec les protéines pro- et anti-apoptotiques multi-domaines (Bax/Bak et Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1, Bfl-1 respectivement) mais également les interactions entre les membres multi-domaines pro- et anti-apoptotiques (Brouwer et al., 2014 ; Dewson et al., 2009). Le domaine BH3 est également engagé dans l'homo-dimérisation des anti-apoptotiques potentiellement impliqués dans le transport et l'homéostasie calcique mitochondriale (Zhang et al., 2004 ; Rajan et al., 2015).

Le domaine BH3 est une séquence consensus d'acides aminés consécutifs [(X)₈-L-(X)₄-D-(X)₁₀] dans laquelle une Leucine et un Acide Aspartique sont très conservées (Aouacheria et al., 2007). Le domaine BH3 est une hélice α sur laquelle sont projetées sur la même face des chaînes latérales de 4 résidus hydrophobes (h1-h4) en position i , $i+4$, $i+7$ et $i+11$ et qui forment des interactions électrostatiques avec les 4 poches (p1-p4) situées dans la cavité hydrophobe des anti-apoptotiques (Figure 24) (Lee et al., 2014a). La Leucine est retrouvée en position $i+4$ de l'hélice α alors que l'Acide Aspartique occupe la position $i+9$ (Figure 24A). Ces deux résidus sont équivalents à Leu¹⁵¹/Asp¹⁵⁶ dans le domaine BH3 de Bad (Petros et al., 2000), Leu⁷⁸/Asp⁸³ du domaine BH3 de Bak (Sattler et al., 1997), Leu⁹⁴/Asp⁹⁹ du domaine BH3 de Bim (Liu et al., 2003) et Leu¹⁴/Asp¹⁹ du domaine BH3 de Bid (Denisov et al., 2006).

L'Acide Aspartique établit une liaison ionique avec une Arginine très conservée située au niveau du domaine BH1 des protéines anti-apoptotiques (Arg²⁶³ pour Mcl-1, Arg¹³⁹ pour Bcl-x_L). Les résidus projetés sur l'autre face de l'hélice α du domaine BH3 sont également impliqués dans ces interactions (Zha et al., 1996 ; Liu et al., 2003).

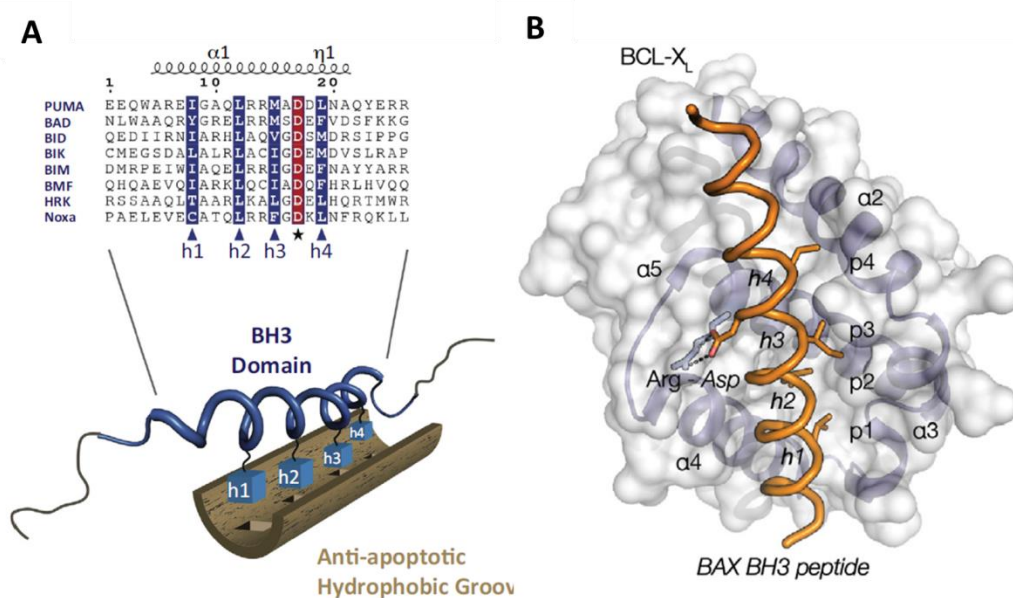


Figure 24 : Domaine BH3 et son interaction avec la cavité hydrophobe des anti-apoptotiques.

(A) Alignement des séquences de l'hélice α du domaine BH3 des différentes protéines BH3-only. Les résidus nécessaires pour l'interaction avec la cavité hydrophobe des anti-apoptotiques sont représentés en bleu et indiqués par h1-h4. Le résidu Acide Aspartique, très conservé entre tous les domaines BH3, impliqué dans l'interaction avec l'Arginine des anti-apoptotiques est représenté en rouge. Une représentation schématique du domaine BH3 de Puma engageant ces résidus hydrophobes pour interagir avec les poches hydrophobes des anti-apoptotiques. (B) Structure cristallisée du peptide BH3 de Bax (orange) en complexe avec la cavité hydrophobe de Bcl-x_L. La surface de Bcl-x_L et les hélices α 2 et α 5 délimitant le site de liaison du domaine BH3 sont représentées. Les résidus clés du domaine BH3 (h1-h4) sont engagés dans les poches hydrophobes correspondantes de Bcl-x_L (D'après Birkinshaw and Czabotar ; Luna-Vargas and Chipuk, 2016).

En dépit de toutes ces caractéristiques communes, des variations subtiles retrouvées au niveau du domaine BH3 du ligand ou dans la poche hydrophobe des anti-apoptotiques conditionnent la sélectivité et l'affinité de l'interaction entre les différents partenaires (Petros et al., 2014 ; Chen et al., 2005). Ainsi certains assemblages des séquences du domaine BH3 permettent une interaction large, tels que Bim qui interagit avec tous les anti-apoptotiques, tandis que d'autres contribuent à une interaction restreinte mais plus forte avec certains anti-apoptotiques tels que Noxa et Bad envers Mcl-1 et Bcl-x_L respectivement (Dutta et al., 2010 ; Roy et al., 2014).

II.5.2.2. Structure de la cavité hydrophobe

II.5.2.2.1. Structure de la cavité hydrophobe de Bcl-x_L et Bcl-2

Des techniques de cristallographie rayon x et la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont été mis en œuvre pour déterminer la structure de Bcl-x_L et Bcl-2 (Muchmore et al., 1996 ; Petros et al., 2001).

Les protéines Bcl-x_L (Figure 25A) et Bcl-2 (Figure 25B) présentent un très grand degré d'homologie au niveau structural (Figure 25C) (Petros et al., 2001). Elles sont composées de deux hélices centrales ($\alpha 5$ et $\alpha 6$), flanquées d'un côté par les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$ et d'un autre côté par les hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 7$. Les hélices centrales sont rangées de façon antiparallèle et sont principalement constituées de résidus hydrophobes. Les deux hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont connectées par une boucle déstructurée et flexible dont la longueur et la composition en acides aminés sont très variables entre les membres de la famille Bcl-2 (la boucle de Bcl-2 est plus longue et plus hydrophobe que celle de Bcl-x_L).

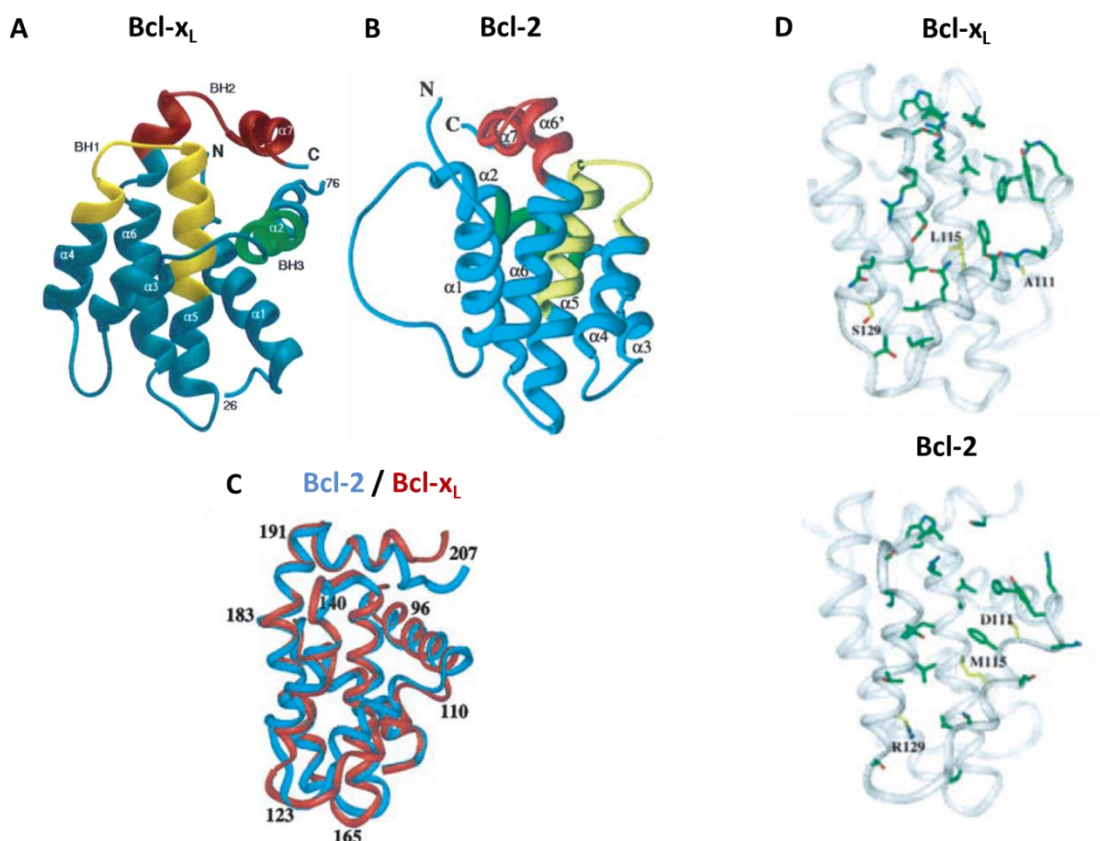


Figure 25 : Comparaison entre les structures de Bcl-x_L et Bcl-2.

(A) Structures 3D des protéines Bcl-x_L, (B) Bcl-2 et (C) leur superposition établie par RMN. (D) Différences entre les résidus aminés engagés dans les poches hydrophobes de Bcl-x_L et Bcl-2 (représentés en jaune) (Sattler et al., 1997 ; Petros et al., 2000).

L'hélice $\alpha 7$ située vers l'extrémité N-terminale est reliée à l'hélice $\alpha 6$ par un grand tour irrégulier plaçant les hélices $\alpha 4$, $\alpha 5$ et $\alpha 6$ de façon antiparallèle à l'hélice $\alpha 7$ et connectées par des interactions hydrophobes nécessaires au maintien de la structure tridimensionnelle de la protéine. Des études de mutagénèses dirigées ont démontré qu'une délétion au niveau de cette région abolit la fonction protectrice et anti-apoptotique de ces protéines (Borner et al., 1994).

L'hélice $\alpha 7$ située vers l'extrémité N-terminale est reliée à l'hélice $\alpha 6$ par un grand tour irrégulier plaçant les hélices $\alpha 4$, $\alpha 5$ et $\alpha 6$ de façon antiparallèle à l'hélice $\alpha 7$ et connectées par des interactions hydrophobes nécessaires au maintien de la structure tridimensionnelle de la protéine. Des études de mutagénèses dirigées ont démontré qu'une délétion au niveau de cette région abolit la fonction protectrice et anti-apoptotique de ces protéines (Borner et al., 1994).

La comparaison entre la structure de Bcl-x_L et celle de Bcl-2 a mis en évidence de petites différences entre ces deux membres mais qui impactent fortement sur leur affinité envers leurs ligands (Figure 25D). Parmi ces différences, certaines touchent les interactions hydrophobes établies entre la Tyr127 de l'hélice $\alpha 4$ et la Thr179 de l'hélice $\alpha 6$. Cette interaction est présente dans la poche hydrophobe de Bcl-x_L et permet de la stabiliser. Cependant, elle est absente dans la poche de Bcl-2 car les résidus aux positions 127 et 179 sont remplacés par l'Arginine et l'Acide Glutamique respectivement. De plus, à ces différences structurales, d'autres différences sont observées dans le site d'interaction du domaine BH3 tels que les résidus aminés en position 111 (Asp dans Bcl-2 et Glu dans Bcl-x_L), en position 115 (Met dans Bcl-2 et Leu dans Bcl-x_L) et en position 129 (Arg dans Bcl-2 et Gln dans Bcl-x_L). Ces différences sont connues pour influencer les caractéristiques de la poche hydrophobe et altèrent la charge de la protéine. Ainsi la partie basse de la poche hydrophobe de la protéine Bcl-x_L est plus électronégative que celle de Bcl-2, augmentant ainsi son affinité pour les domaines BH3 de Bad et Bak (Sattler et al., 1997 ; Petros et al., 2000).

II.5.2.2.2. Structure de la cavité hydrophobe de Bcl-w

La structure de Bcl-w a été établie pour la première fois en 2003 par l'équipe de Denisove et de Hinds (Hinds et al., 2003). La structure tridimensionnelle de cette protéine est fortement semblable à Bcl-2 et Bcl-x_L. Elle est composée de 8 hélices α rangées sous une conformation globulaire (Figure 26A) et une hélice centrale hydrophobe flanquée entre cinq hélices hydrophiles ($\alpha 1$ - $\alpha 4$ et $\alpha 6$). Ces hélices sont connectées entre elles par de petites boucles bien structurées. L'hélice $\alpha 7$ est une extension de l'hélice $\alpha 6$ qui rejoint à sa base l'hélice $\alpha 8$ reliant à son tour l'hélice $\alpha 2$. Une boucle pointue relie l'hélice $\alpha 8$ à l'hélice $\alpha 9$ grâce à

laquelle cette dernière engage plusieurs liaisons avec d'autres résidus portés sur l'hélice $\alpha 5$ et la boucle reliant les hélices $\alpha 5$ et $\alpha 4$. Bcl-w possède également une boucle liant l'hélice $\alpha 1$ à $\alpha 2$. Cette boucle diffère de celle de Bcl-x_L et Bcl-2. Elle est courte (13 acides aminés) et joue un rôle crucial dans la régulation de l'activité anti-apoptotique de Bcl-w, probablement en limitant l'accès au domaine BH4 de cette protéine (Borner et al., 1994 ; Huang et al., 1998).

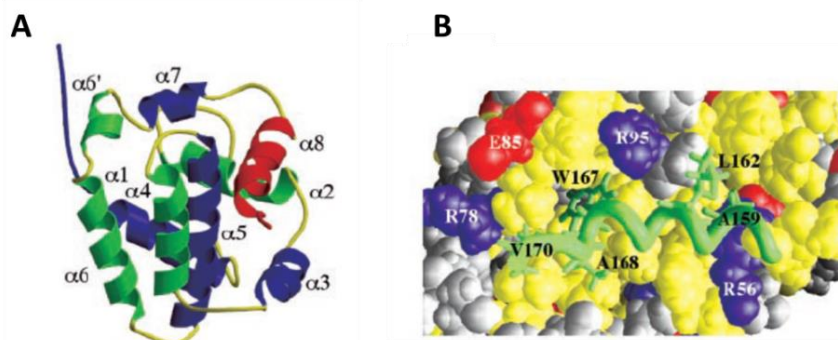


Figure 26 : Poche hydrophobe de Bcl-w.

(A) Structure de la poche hydrophobe de Bcl-w (RMN). (B) Vue sur la poche hydrophobe de Bcl-w dans laquelle est engagée son extrémité C-terminale ; l'hélice $\alpha 8$ et ses résidus hydrophobes sont montrés en vert, les résidus clés de la poche sont en bleu (positif), rouge (négatif) et jaune (hydrophobe). Les autres résidus sont en gris.

La caractéristique majeure de Bcl-w est l'engagement de l'hélice $\alpha 8$ dans sa poche hydrophobe, susceptible de bloquer le site de fixation du domaine BH3 de leur partenaire (Figure 26.B). Cette conformation rappelle la conformation de la protéine pro-apoptotique Bax. Cependant, des études de dynamique moléculaire par mesure de NOE hétéronucléaire ($^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$) ont permis de démontrer que toutes les hélices formant la protéine Bcl-w sont peu mobiles, à l'exception de l'hélice $\alpha 8$. Cette mobilité influence la stabilité de ce site (Denisov et al., 2003).

II.5.2.2.3. Structure de la cavité hydrophobe de Mcl-1

Myeloid cell leukemia 1 (Mcl-1) est parmi les premiers gènes à être surexprimés dans les cellules myéloïdes en cours de différenciation. La structure de Mcl-1 est très proche de celle de Bcl-2, Bcl-x_L et Bcl-w. Elle partage avec ces protéines environ 24% de séquences identiques et 35-46% de similitudes. Cependant, son extrémité N-terminale diffère puisqu'elle est plus simple et contient des séquences répétées de Proline, Glutamate, Serine et Thréonine (PEST) nécessaires à la modulation de son expression (Day et al., 2005). Mcl-1 est composé de quatre domaines d'homologie avec Bcl-2. Néanmoins, son domaine BH4 est très différent des autres protéines, suggérant qu'il ne devrait pas être considéré comme tel. En dépit de cette

différence, l'hélice $\alpha 1$ de Mcl-1 et Bcl-2 est très similaire à celle des autres membres anti-apoptotiques.

La structure tridimensionnelle de Mcl-1 représente un cœur hélicoïdal, formé de 8 hélices α avec deux hélices centrales hydrophobes ($\alpha 5$ et $\alpha 8$), six hélices amphiphiles périphériques disposées en contact du solvant et un petit détour liant l'hélice $\alpha 5$ à l'hélice $\alpha 6$. La poche hydrophobe de Mcl-1 est composée des hélices $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 4$ et deux hélices $\alpha 5$ et $\alpha 8$ qui forment la base de cette cavité. L'hélice $\alpha 7$, perpendiculaire à l'hélice $\alpha 8$, est une extension de l'hélice $\alpha 6$ (Figure 27). Les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont connectées par une petite boucle de 12 résidus aminés très peu structurée rappelant celle de Bcl-w (Day et al., 2005).

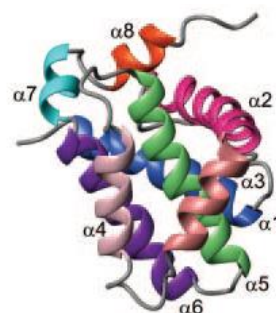


Figure 27 : Structure 3D de la protéine Mcl-1 (RMN).

La poche hydrophobe de Mcl-1 diffère de celle des autres membres anti-apoptotiques et cette différence joue un rôle très important dans la sélectivité de Mcl-1 envers son ligand. La cavité hydrophobe de Mcl-1 présente une conformation plutôt ouverte et prête à interagir avec son ligand contrairement à celles de Bcl-2 et Bcl-x_L qui présentent une conformation fermée à cause de la liaison hydrogène entre la Glutamine 111 situé sur l'hélice $\alpha 3$ et l'Acide Glutamique 129 porté sur l'hélice $\alpha 4$. La liaison hydrogène équivalente dans Mcl-1 est absente car les résidus correspondant sont la Lysine 215 et l'Histidine 233 respectivement (Day et al., 2005).

Mcl-1 possède 14 Lysines conservées, dix d'entre elles sont situées au niveau de la poche hydrophobe. A l'exception de la Lysine 283, toutes les autres sont exposées vers le solvant et sont des cibles potentielles des ubiquitines ligases, et donc à l'origine de la diminution de sa stabilité protéique. Mcl-1 possède également deux Histidines périphériques (His258 et 301) et deux autres centrales (His233 et 205). Tous ces résidus contribuent aux propriétés électrostatiques de la cavité hydrophobe de Mcl-1. En comparaison avec la poche hydrophobe de Bcl-x_L qui n'est essentiellement pas chargée, celle de Mcl-1 est plus électropositive. Les résidus chargés positivement sont principalement concentrés au niveau des hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$ et la boucle liant ces deux hélices, et couvrent également le site d'interaction avec le ligand (Day et al., 2005).

II.5.2.2.4. Structure de la cavité hydrophobe de Bax et Bak

Les protéines pro-apoptotiques multi-domaines présentent également une poche hydrophobe assez similaire à celle des anti-apoptotiques qui est déployée pour interagir avec le domaine BH3 des BH3-only activateurs ou avec le domaine BH3 des autres partenaires pro-apoptotiques multi-domaines lors de l'oligomérisation au niveau de la membrane mitochondriale. La structure de la poche hydrophobe de Bax est similaire à celle de Bcl-x_L (Muchmore et al., 1996). Elle est constituée de huit hélices α amphiphiles regroupées autour d'une hélice centrale hydrophobe ($\alpha 5$). Comme la protéine Mcl-1, Bax ne possède pas de séquence prédictive du domaine BH4. Cependant, sa structure 3D a démontré la présence d'une hélice $\alpha 1$, un peu plus longue que celle de Bcl-x_L et qui se connecte avec l'hélice $\alpha 2$ via une longue boucle non structurée semblable à celle de Bcl-x_L et Bcl-2 (Suzuki et al., 2000). Bax est légèrement différent de Bcl-x_L par l'orientation et la longueur de ses hélices $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 4$ (Figure 28). Cependant, aucune différence n'a été observée sur les hélices $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ et $\alpha 8$ (Suzuki et al., 2000).

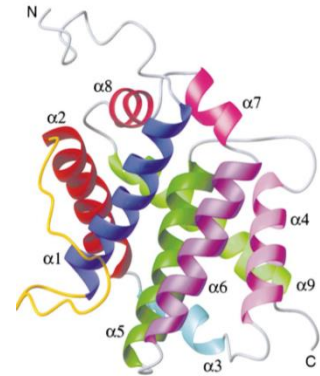


Figure 28 : Structure 3D de la protéine Bax (RMN).

La protéine Bak se présente sous une conformation globulaire constituée de huit hélices α assemblées en deux faisceaux de trois et quatre hélices reliée par la région C-terminale. Ces deux faisceaux sont orientés verticalement l'un par rapport à l'autre grâce au deux cœurs hélicoïdaux $\alpha 1$ et $\alpha 5$ (Moldoveanu et al., 2006). Le faisceau N-terminal est composé des hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ et le faisceau C-terminal est composé des hélices $\alpha 4$, $\alpha 5$ et $\alpha 6$ (Figure 29). L'extrémité C-terminale, composée des hélices $\alpha 7$ et $\alpha 8$, agit comme un crochet hydrophobe pour relier les deux faisceaux en forme de « beignet » avec l'hélice $\alpha 5$ au centre (Moldoveanu et al., 2006).

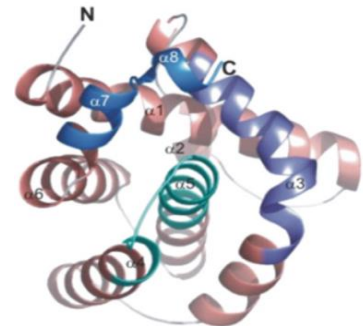


Figure 29 : Structure 3D de la protéine Bak (RMN).

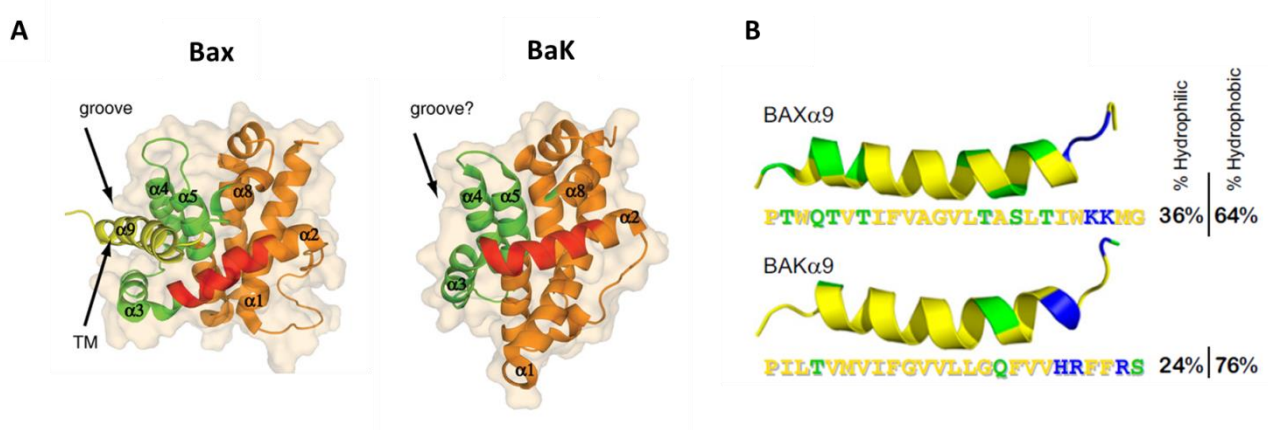


Figure 30 : Structure des protéines Bax et Bak.

(A) Disposition des différentes hélices α constituant les protéines Bax et Bak : les hélices $\alpha 1$ - $\alpha 8$ sont colorées en orange à l'exception de celles formant la poche hydrophobe qui sont représentées en vert. Le domaine transmembranaire de Bax représenté par l'hélice $\alpha 9$ (jaune-vert) est localisé au niveau de sa poche hydrophobe. (B) Représentation des deux hélices $\alpha 9$ de Bax et Bak dans lesquelles les résidus hydrophobes, hydrophiles, chargés positivement ou négativement sont représentés en jaune, bleu, vert et rouge respectivement. Le pourcentage d'hydrophilie et d'hydrophobicité sont indiqués dans la figure (Westphal et al., 2011).

La différence principale entre Bax et Bak est leur localisation à l'état inactif, Bax étant localisé dans le cytosol et Bak dans la mitochondrie respectivement. Cette différence de localisation est en partie attribuée à la nature hydrophobe de leur segment transmembranaire (Figure 30A). Ainsi, le segment transmembranaire (hélice $\alpha 9$) de Bax, moins hydrophobe que celui de Bak, est lié à sa poche hydrophobe, diminuant ainsi son affinité pour la membrane mitochondriale et augmentant sa solubilité (Figure 30B). En revanche, le segment transmembranaire de Bak est plus hydrophobe que celui de Bax, ce qui explique son tropisme membranaire (Leshchiner et al., 2013). De plus, la conformation de Bax est très proche de celle de Bcl-w. Cependant, l'interaction entre l'hélice $\alpha 9$ avec la poche hydrophobe de Bax est plus stable que celle de l'hélice $\alpha 8$ avec la poche hydrophobe de Bcl-w. Cette différence est due à la nature des résidus constituant ces deux hélices (Petros et al., 2004). Ce repliement soutient la forme monomérique et soluble de Bax et régule son activité pro-apoptotique qui ne survient qu'après son insertion dans la membrane mitochondriale.

II.5.2.2.5. Structure de la cavité hydrophobe de Bid

La protéine Bid est une protéine pro-apoptotique unique par sa structure. Elle possède une poche hydrophobe dont la conformation est similaire à celle de Bcl-x_L. En revanche, sa composition en acide aminé est très différente, à l'exception de celle constituant le domaine BH3 (Figure 31A et B).

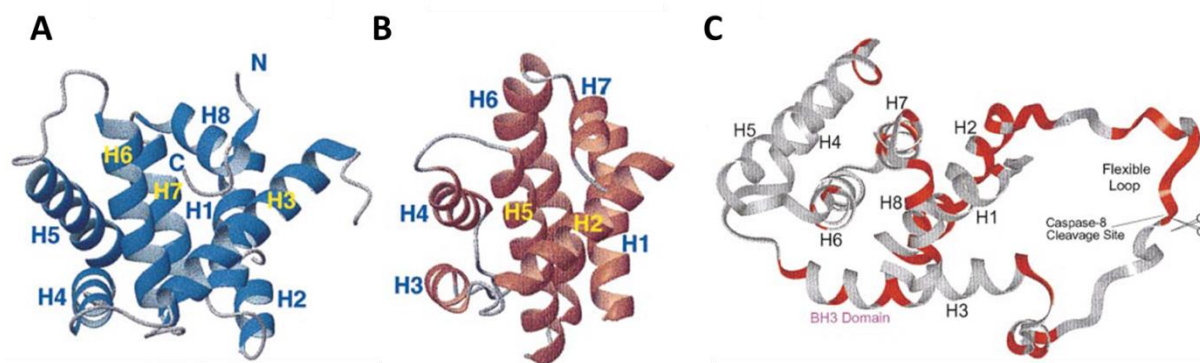


Figure 31 : Structure de Bid en solution.

Comparaison entre la structure hélicoïdale de Bid (A) et celle de Bcl-x_L (B). (C) Changement dans la conformation de Bid après clivage par la caspase 8 (Chou et al., 1999).

Ce dernier est comparable au domaine BH3 des autres membres de la famille Bcl-2. Les études RMN ont démontré que la protéine Bid est composée de 8 hélices α dont deux hélices centrales hydrophobes disposées de manière antiparallèle ($\alpha 6$ et $\alpha 7$) et entourées de 6 hélices amphiphiles (McDonnell et al., 1999). L'hélice $\alpha 3$ porte le domaine BH3 de Bid et est fixée à la structure par l'établissement de liaison hydrogènes avec des résidus portés sur les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 8$. La comparaison entre la structure de la protéine Bid et son partenaire Bcl-x_L révèle que Bid possède une hélice supplémentaire ($\alpha 2$) dans son extrémité N-terminale. Ainsi, la correspondance structurelle des régions d'homologie a démontré que les hélices $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ et $\alpha 8$ correspondent aux hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ et $\alpha 7$ de Bcl-x_L (Chou et al., 1999). Bid est également différent par sa boucle flexible et non structurée établie entre l'hélice $\alpha 2$ et $\alpha 3$ qui est deux fois moins longue que celle de Bcl-x_L et qui joue un rôle très important dans son processus d'activation (Figure 31C).

La protéine Bid joue le rôle du second messenger intracellulaire qui communique le signal de la plateforme formée par les récepteurs de mort à la voie mitochondriale. Dans les cellules saines, la protéine Bid est inactive et se trouve sous forme soluble dans le cytoplasme. Le clivage, par la caspase 8, au niveau de sa boucle non structurée, permet sa translocation vers la mitochondrie (Li et al., 1998). Les études RMN ont démontré que ce clivage ne change pas la conformation globale de Bid suggérant que cette boucle n'est pas impliquée dans le maintien de la structure de Bid (Figure 31C). En revanche, il apporte des modifications au niveau de son extrémité N-terminale impliquant les hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ (contenant le domaine BH3) et les hélices $\alpha 7$ et $\alpha 8$. Le clivage par la caspase 8 favorise l'activité apoptotiques de

Bid et augmente de 10 fois son affinité pour Bcl-x_L (Li et al., 1998). Ce clivage induit la dissociation de l'extrémité N-terminale du cœur de la protéine Bid, permettant ainsi d'engager le domaine BH3 de t-Bid, son interaction avec ses partenaires, et l'induction de l'apoptose. En revanche, la boucle flexible de la protéine non clivée fonctionne comme « cross-link » qui s'oppose à l'interaction avec Bcl-x_L (Chou et al., 1999).

II.5.3. Mécanisme d'action de la famille Bcl-2

Le devenir de la cellule est dicté par l'équilibre stœchiométrique entre les membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Veis et al., 1993 ; Czabotar et al., 2011). Cette famille joue un rôle majeur dans le contrôle de l'apoptose à travers les interactions protéine-protéine (IPP) établies entre ses différents membres (Figure 32) (Juin et al., 2013).

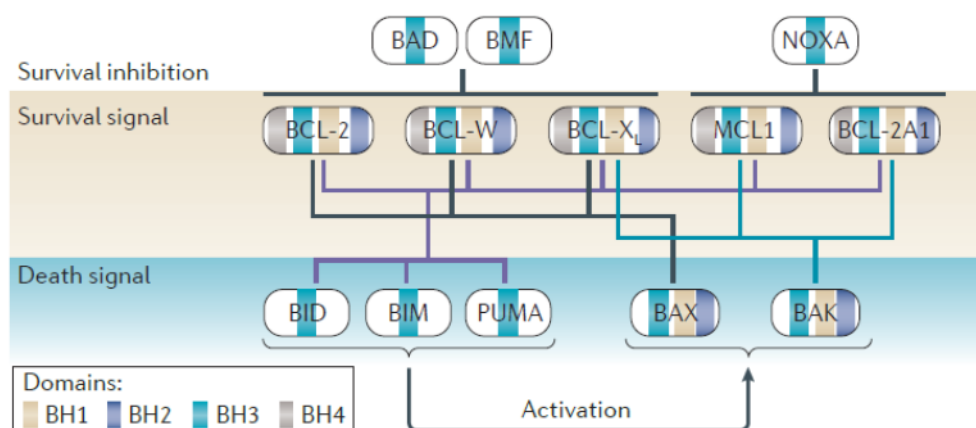


Figure 32 : Réseau d'interactions fonctionnelles entre les membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Ces interactions présentent des affinités plus ou moins importantes de certaines protéines envers d'autres telles que c'est le cas pour Bim et Bid et Puma qui interagissent avec la plupart des protéines multi-domaines de cette famille ou avec Bad et Noxa, qui présentent une affinité restreinte à quelques protéines (Noxa envers Mcl-1 et Bad envers Bcl-2, Bcl-x_L et Bcl-w) (Dutta et al, 2010 ; Roy et al, 2013 ; Juin et al, 2013). Les protéines anti-apoptotiques ont aussi une affinité différente envers les protéines pro-apoptotiques multi-domaines. En effet, Mcl-1 et Bcl-1 interagissent et inhibent Bak alors que Bcl-2 et Bcl-w interagissent de préférence avec Bax. En revanche, Bcl-x_L est capable d'inhiber à la fois Bax et Bak (Juin et al., 2013).

Le rôle principal des interactions entre les membres de cette famille est de contrôler la voie intrinsèque de l'apoptose. Les effets biologiques qui s'ensuivent sont très variés et dépendent de la nature des partenaires. Les deux conséquences majeures de ces interactions sont l'activation des effecteurs Bax et Bak et leur oligomérisation conduisant à la perméabilisation de la membrane mitochondriale, ou au contraire l'inhibition des événements responsable de déclencher ce processus. Les différents acteurs de ces mécanismes, leur régulation et leur mode d'action sont présentés ci-dessous.

II.5.3.1. BH3-only : capteurs de stress

II.5.3.1.1. Généralités

Les BH3-only comptent une dizaine de protéines de la famille Bcl-2 : Bad, Bid, Bik, Bim, Bid, Bmf, HRK, Puma, Noxa et BNIP (Aouacheria et al., 2005). Ils sont regroupés en deux catégories : les activateurs tels que t-Bid, Bim et Puma, qui sont capables d'activer les effecteurs et de les déplacer de la poche hydrophobe des anti-apoptotiques, et les sensibilisateurs (capteurs de stress), tels que Noxa et Bad, incapables d'activer les protéines Bax et Bak mais qui interagissent avec les anti-apoptotiques pour occuper leur poche hydrophobe et libérer les effecteurs et leurs activateurs. Cependant, certaines études suggèrent que les sensibilisateurs sont également capables d'activer Bax et Bak et que les fonctions de ces deux catégories de BH3-only sont souvent redondantes (Du et al., 2011).

Les BH3-only sont dotés d'une grande plasticité structurale qui leur permet d'avoir plusieurs rôles physiologiques et apoptotiques. En absence de stress, les BH3-only, constitutivement exprimés dans la cellule, sont localisés dans différents compartiments cellulaires où ils interagissent avec d'autres partenaires que les membres de la famille Bcl-2 et exercent des fonctions physiologiques habituelles. Les protéines BH3-only sont considérées comme des sentinelles de stress. Ainsi, en réponse aux perturbations cellulaires, ces protéines subissent des modifications au niveau transcriptionnel ou post-traductionnel provoquant un changement dans leur conformation. Ce changement est nécessaire pour leur interaction avec les membres multi-domaines de la famille Bcl-2 et pour leur translocation dans la mitochondrie (Fernandez-Luna, 2008 ; Shamas-Din et al., 2011). Il est à noter qu'un même stress peut moduler l'expression et/ou l'activité de plusieurs protéines BH3-only telles que la protéine suppresseur de tumeur p53 qui module l'expression simultanée de Puma, Noxa et Bik. Réciproquement, un même BH3-only peut être induit par plusieurs types de stress (Figure 33).

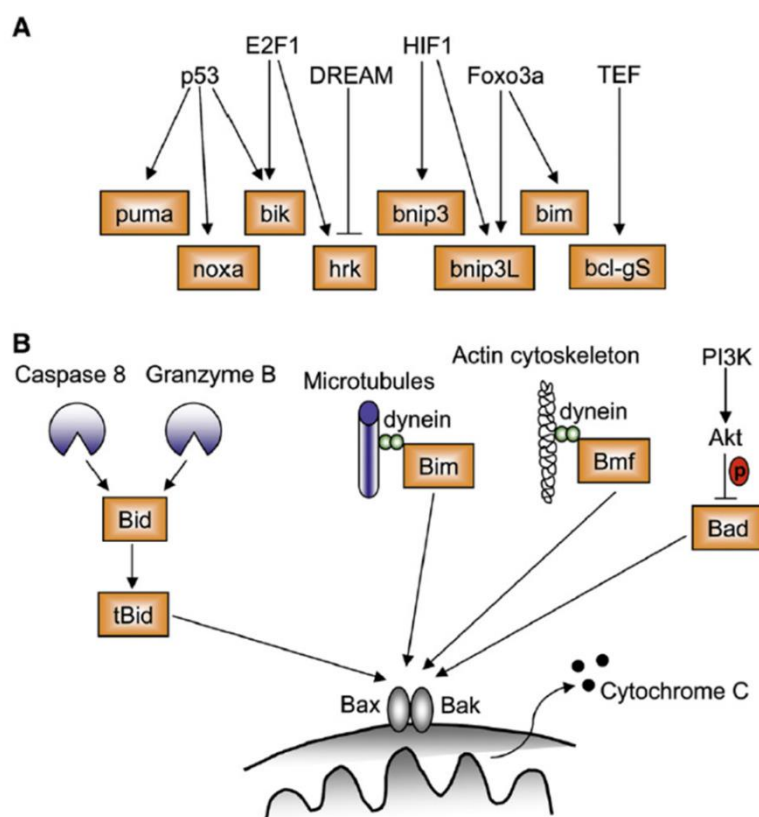


Figure 33 : Mécanismes de régulation des BH3-only.

La régulation des BH3-only se fait au niveau transcriptionnel (A) ou post-traductionnel (B). Au niveau transcriptionnel, les différents facteurs de transcription, à l'exception de DREAM, activent la transcription des BH3-only. Au niveau post-traductionnel, les modifications sont majoritairement représentées par les différentes phosphorylations, le clivage protéolytique et la dissociation de la Dynéine. Les BH3-only ainsi activés vont activer à leur tour les effecteur Bax et Bak et induire le relargage du cytochrome c (d'après Fernandez-Luna, 2008).

II.5.3.1.2. Modulation des BH3-only

II.5.3.1.2.1 Modulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles

Le niveau d'expression de certains BH3-only dans la cellule est très faible, parfois même indétectable. Leur expression est fortement augmentée par plusieurs stimuli apoptotiques tels que les dommages à l'ADN, le stress du RE et la privation en facteurs de croissances. Par exemple, en réponse aux dommages à l'ADN provoqués par les agents chimiothérapeutiques ou par l'irradiation, la libération de la protéine suppresseur de tumeur p53 de son inhibiteur Mdm2 et sa translocation dans le noyau lui permettent d'activer la transcription des gènes codant pour les protéines BH3-only Noxa (Oda et al., 2000) et Puma (Jeffers et al., 2003).

Les facteurs de croissance ont également démontré une implication importante dans la régulation de l'expression des BH3-only. En effet, les protéines Bim et Puma sont induites par le facteur de transcription Foxo-3a (Forkhead Box Transcription Factor), dont l'activation est

elle-même régulée par les voies de signalisation MAPK/ERK et PI3K/AKT. La kinase ERK phosphoryle Foxo-3a sur les Ser294, Ser344, Ser425 provoquant ainsi son ubiquitination et sa dégradation par Mdm2 (Yang et al., 2008) tandis que la kinase AKT conduit à sa séquestration par la protéine 14-3-3, empêchant ainsi sa translocation dans le noyau (Brunet et al., 1999). Ces deux voies sont souvent dérégulées dans les cancers, conduisant à une inhibition multifactorielle de Foxo-3a.

Le stress du RE est également responsable de l'expression des BH3-only comme Noxa, Puma, Bim, Hrk et Bik. L'expression de ces protéines est consécutive à l'activation de divers facteurs de transcription tels que CHOP/GADD153, Foxo-3a et E2F1 (Li et al., 2006 ; Ghosh et al., 2012 ; Galehdar et al., 2010 ; Hershko and Ginsberg, 2004). Enfin, l'hypoxie induit l'expression des gènes *Noxa* et *Bnip-3* via le facteur de transcription HIF1 α , conduisant à la mort des cellules (Bruick, 2000 ; Kim et al., 2004).

II.5.3.1.2.2. Modulations post-traductionnelles

Les BH3-only induits en réponse aux stimuli, tels que Puma, Noxa et Bik, sont exprimés sous leur forme active, leur permettant d'atteindre directement leurs cibles sans avoir à subir de modifications. Cependant, les BH3-only constitutivement exprimés tels que Bad, Bim, Bid, Bmf et Bnip nécessitent des modifications pour être actifs, telles qu'un clivage protéolytique, une phosphorylation ou une dé-séquestration et relocalisation. Ces modifications mènent à un changement de leur conformation permettant leur recrutement au niveau de la membrane mitochondriale et leur interaction avec leurs partenaires pro- ou anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Modulation par clivage protéolytique

Suite à l'activation des récepteurs de mort, une cascade de signalisation conduit à l'activation de la caspase 8 qui procède à l'activation par clivage de la protéine Bid, dont la forme tronquée tBid est transloquée au niveau de la mitochondrie où elle exerce son rôle pro-apoptotique (Li et al., 1998) . Bid peut également être clivé par la protéase Granzyme B contenue dans les granules sécrétées par les lymphocytes T et les cellules NK (Natural Killer). Ces granules permettent en effet la libération de ces protéases, *via* les perforines, dans les cellules transformées ou infectées par des virus.

Modulation par dé-séquestration et délocalisation

Dans les cellules normales, les protéines BH3-only Bim et Bmf sont constitutivement exprimées et associées, dans un état inactif, à la chaîne légère de la Dynéine (DLC1/2), elle-même séquestrée par les microtubules ou la myosine V du cytosquelette cellulaire. L'exposition de la cellule à différents signaux tels que les agents cytotoxiques ou la perte d'adhésion conduit à la dé-séquestration de Bim et Bmf du cytosquelette cellulaire et permet leur translocation vers la mitochondrie et leur interaction avec les membres multi-domaines de la famille Bcl-2 (Puthalakath et al., 1999). Il a également été montré que la phosphorylation de Bim sur la Thr⁵⁶ et la Ser⁵⁸ par la kinase JNK favorise sa dé-séquestration, sa libération des composants du cytosquelette et sa translocation vers la mitochondrie.

Modulation par phosphorylation

La modulation de l'activité des BH3-only par phosphorylation a été démontrée dans plusieurs contextes. La phosphorylation impacte différemment l'activité des BH3-only en fonction du site modifié et de la nature de la kinase impliquée.

La protéine Bim est phosphorylée sur de nombreux sites par les protéines ERK, JNK et p38 de la famille des MAPK. Les études utilisant différents mutants de Bim ont démontré que ces phosphorylations peuvent augmenter l'activité pro-apoptotique de Bim, ou inversement la réduire. En effet, la phosphorylation de Bim peut diminuer son activité en modulant son interaction avec ses partenaires. Ainsi, la phosphorylation de la Ser⁵⁵, Ser⁶⁵, Ser⁷³ et Thr¹¹² par ERK et JNK provoque une diminution de l'affinité de Bim envers les membres de la famille Bcl-2 et abolit ainsi son activité pro-apoptotique (Harada et al., 2004 ; Ewings et al., 2007). La phosphorylation de la Ser⁶⁹ peut également influencer sur la stabilité de Bim. Cette phosphorylation par la kinase ERK provoque sa dégradation par le protéasome (Luciano et al., 2003).

La phosphorylation de Bad par la voie PI3K/AKT sur la Ser¹¹² ou la Ser¹³⁶ conduit à sa séquestration dans le cytosol par la protéine chaperonne 14-3-3, empêchant ainsi sa translocation vers la mitochondrie et l'induction de l'apoptose (Zha et al., 1996). L'activation de cette même voie conduit aussi à la phosphorylation de la Ser¹⁵⁵ située au centre du domaine BH3 de Bad, limitant son interaction avec Bcl-x_L (Zhou et al., 2000) .

Le BH3-only Bik est une protéine qui se trouve phosphorylée à l'état basal au niveau de la Thr³³ et la Ser³⁵ par la Caséine Kinase II. Cette phosphorylation joue un rôle très important

dans son activité pro-apoptotique. L'étude réalisée par l'équipe de Chinnadurai a démontré que la substitution de l'un de ces deux site par une Alanine diminue son activité pro-apoptotique sans affecter son interaction avec Bcl-2 (Verma et al., 2001).

II.5.3.1.3. Modèle de recrutement à la membrane

Les protéines BH3-only présentent une localisation subcellulaire qui diffère d'un BH3-only à l'autre et entre leur état basal et activé. Après activation, leur recrutement au niveau de la membrane mitochondriale est indispensable pour qu'ils puissent exercer leurs fonctions pro-apoptotiques. Cependant, le mécanisme par lequel ces protéines sont transloquées dans la membrane mitochondriale est très variable (Shamas-Din et al., 2011). Certains BH3-only tels que Bim, Bid, Puma et Hrk possèdent un segment hydrophobe au niveau de leur extrémité C-terminale, identifié comme étant une séquence consensus d'ancrage dans la membrane mitochondriale (Shamas-Din et al., 2011). D'autres BH3-only comme Bad et Bid ne possèdent pas cette séquence d'ancrage et contiennent des séquences hydrophobes ciblant les protéines et les lipides localisés au niveau de la mitochondrie. En effet, Bad interagit avec la membrane mitochondriale *via* deux domaines hydrophobes, LBD1 et LBD2. Ces domaines ont une affinité pour les phospholipides chargés négativement tels que les phosphatidylsérines, l'acide phosphatidique et les cardiolipides situés au niveau de la membrane mitochondriale. La phosphorylation de Bad n'affecte pas son interaction avec la mitochondrie, mais favorise plutôt son extraction par les protéines chaperonnes 14-3-3 (Hekman et al., 2006). De même, le recrutement de t-Bid à la membrane mitochondriale est également favorisé par les lipides et les protéines mitochondriales. En effet, les cardiolipides associés au cholestérol ou aux protéines mitochondriales telles que MTCH2/MIMP (mitochondrial carrier homologue 2/Met-induced mitochondrial protein) favorisent le recrutement de t-Bid à la membrane mitochondriale et par conséquent induit sa perméabilisation (Lutter et al., 2000 ; Lovell et al., 2008). Le recrutement spontané de t-Bid à la mitochondrie favorise son interaction avec les protéines Bax et Bcl-x_L présentes dans le cytosol. Cette interaction provoque un changement de conformation de ces protéines multidomaines, permettant leur insertion dans la membrane externe mitochondriale (Billen et al., 2008).

Un scénario opposé peut se produire pour d'autres BH3-only tels que Noxa. Cette protéine a besoin de ses domaines BH3 et TM pour cibler correctement la membrane mitochondriale. En premier lieu, Noxa interagit avec la poche hydrophobe de Mcl-1 ou de Bfl1 via son domaine

BH3. Cette interaction engendre, dans un second temps, un changement dans sa conformation conduisant à l'orientation correcte de son domaine TM, facilitant ainsi son recrutement dans la membrane mitochondriale (Oda et al., 2000).

II.5.3.1.4. Modèle d'action des BH3-only

II.5.3.1.4.1. Direct

Dans ce modèle, certains BH3-only tels que Bim et t-Bid sont directement engagés pour activer les effecteurs Bax et Bak (Figure 34A). Ce modèle d'activation est relativement peu puissant car l'interaction entre les effecteurs et leur activateur est transitoire, favorisant ainsi la séquestration des activateurs par les anti-apoptotiques (Kuwana et al., 2005 ; Certo et al., 2006 ; Gavathiotis et al., 2008). Cependant, les effecteurs Bax et Bak activés peuvent à leur tour activer les autres monomères et former ainsi des pores au niveau de la membrane externe de la mitochondrie entraînant sa perméabilisation (Czabotar et al., 2014). Les BH3-only sensibilisateurs dans ce modèle participent à l'inhibition de l'action des anti-apoptotiques vis-à-vis des BH3-only activateurs.

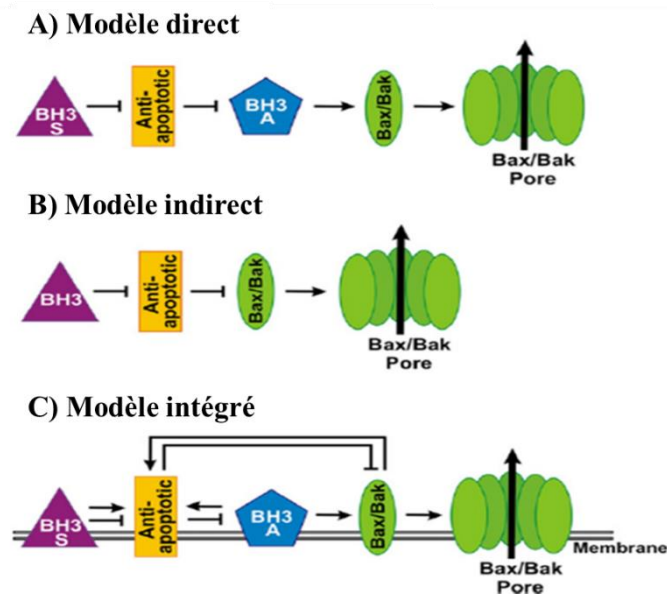


Figure 34 : Mode d'action des BH3-only.

(A) Modèle d'activation directe. (B) Modèle d'activation indirecte. (C) Modèle intégré (Shamas-Din et al., 2011).

II.5.3.1.4.2. Indirect ou de déplacement

Dans ce modèle il est suggéré que les protéines effectrices Bax et Bak sont constitutivement actives et sont inhibées par les anti-apoptotiques pour favoriser la survie cellulaire. Pour initier l'apoptose dans ce modèle, les BH3-only sont engagés pour déplacer les effecteurs

activées de la poche hydrophobe des anti-apoptotiques. Ainsi libérées, les protéines Bax et Bak vont pouvoir s'oligomériser et induire la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (Figure 34B). Ce modèle d'action est efficace à condition que toutes les protéines anti-apoptotiques résidant dans la membrane mitochondriale soient inhibées par les BH3-only ou équivalent (molécules BH3-mimétiques) (Chen et al., 2005 ; Willis et al., 2005 ; Czabotar et al., 2014).

II.5.3.1.4.3. Intégré

Ce modèle regroupe les aspects majeurs des deux précédents modèles. L'interaction entre les membres de la famille Bcl-2 dépend de la concentration en protéines au niveau de la membrane et de leur affinité. Cette dernière est déterminée par les modifications post-traductionnelles de protéines et de la physiologie cellulaire. Les BH3-only activateurs peuvent activer directement Bax et Bak et favoriser la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Les deux classes de BH3-only peuvent recruter et séquestrer les anti-apoptotiques dans la membrane mitochondriale. Enfin, les anti-apoptotiques inhibent l'apoptose et séquestrent les effecteurs et leurs activateurs au niveau de la membrane mitochondriale ou dans le cytoplasme (Figure 34C). Ce modèle montre que l'équilibre et la liaison entre ces membres de cette famille est dépendant de la proportion de ces différentes sous-groupes protéique (Llambi et al., 2011 ; Shamas-Din et al., 2013).

II.5.3.2. Bax et Bak : effecteurs de l'apoptose

II.5.3.2.1. Activation de Bax et Bak

L'activation de Bax et Bak est effectuée par les BH3-only activateurs Bim, tBid et Puma. Tel que mentionné plus haut, contrairement à Bak, l'activation de Bax nécessite une étape préalable permettant son recrutement au niveau de la membrane mitochondriale (Kim et al., 2009 ; Czabotar et al., 2014). Cette activation est assurée par la fixation du BH3-only activateur sur un site appelé la « rear pocket » ou « la poche arrière ». Cette seconde poche hydrophobe de Bax, composée des hélices $\alpha 1$, $\alpha 4$ et $\alpha 6$, est située à l'opposé de la cavité hydrophobe. La « poche arrière » de la forme soluble de Bax est masquée par la grande boucle non structurée située entre l'hélice $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (Gavathiotis et al., 2008). L'interaction allostérique du BH3-only avec l'hélice $\alpha 1$ de cette poche par le mécanisme de « hit and run » permet de déplacer la grande boucle non structurée (extrémité N-terminale) et de désengager l'hélice $\alpha 9$ (extrémité C-terminale) de la cavité hydrophobe de Bax. (Figure 35) (Kim et al., 2009 ; Bleicken and Zeth, 2009 ; Shamas-Din et al., 2013; Czabotar et al., 2014).

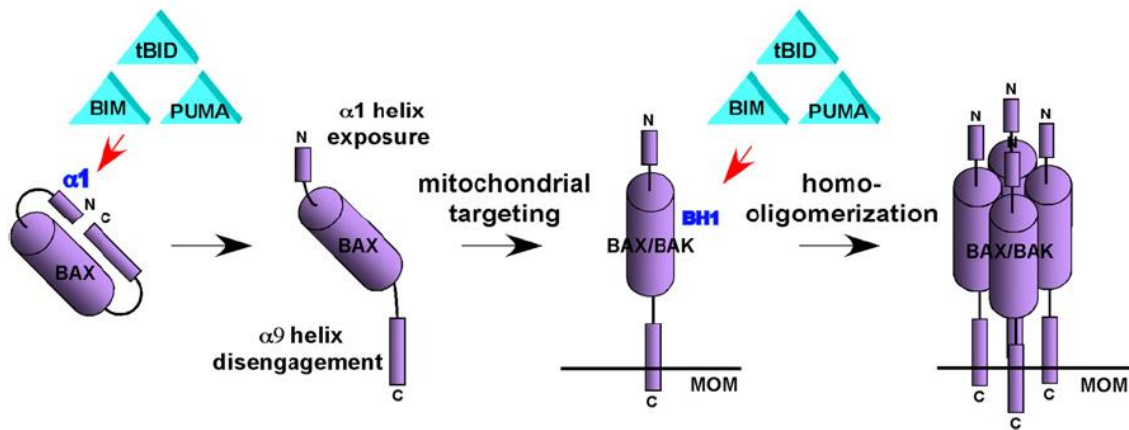


Figure 35 : Modèle d'activation de Bax.

Les BH3-only activateurs tels que t-Bid, Bim et Puma se lient de manière transitoire à l'hélice $\alpha 1$ de Bak, ce qui conduit à la levée de l'auto-inhibition et induit une réorganisation structurale de Bax en exposant ses extrémités N et C-terminales. L'extrémité C-terminale de Bax (hélice $\alpha 9$) devient ainsi disponible et prête à s'intégrer dans la membrane externe de la mitochondrie. Une fois Bax intégré dans la mitochondrie, sa seconde activation ainsi que l'activation de Bak par les BH3-only activateurs conduit à leur oligomérisation et à l'induction de la perméabilisation mitochondriale (Kim et al., 2009).

L'identification de l'hélice $\alpha 1$ comme étant le site d'interaction pour le domaine BH3 de Bid et Puma a été obtenue par des tests de double hybride chez les bactéries et des expériences d'immunoprécipitation dans les lignées cellulaires humaines. L'insertion de mutations dans la région BH3 de Bid ou au niveau de l'hélice 1 de Bax limite l'activation de ce dernier et l'induction de l'apoptose (Cartron et al., 2004). De même, en utilisant le peptide stabilisé du domaine BH3 de Bim (Stabilized α Helix of Bcl-2 Domain Bim « BIM SAHB »), l'équipe de Gavathiotis a démontré, que Bim interagit avec Bax *via* cette poche. Ce premier changement de conformation de Bax conduit à l'instabilité structurale de Bax dans le cytosol, favorisant son insertion dans la membrane mitochondriale (Renault et al., 2015) et l'initiation du processus d'oligomérisation par l'exposition de l'épitope 6A7 (Shamas-Din et al., 2011).

Contrairement à l'activation de Bax qui semble bien établie, la connaissance du mode d'activation de Bak est encore confuse, notamment en ce qui concerne la présence ou l'absence de la « rear pocket » et son implication dans le mécanisme d'activation de Bak. Cette protéine est constitutivement localisée au niveau de la membrane mitochondriale. Sa « rear pocket » est encombrée par les résidus aminés Gln32, Arg36 et 156 rendant son accessibilité difficile par le domaine BH3. De plus, contrairement à celle de Bax, la « rear pocket » de Bak est couverte par une petite boucle qui lie l'hélice $\alpha 1$ et $\alpha 2$, entraînant une contrainte supplémentaire pour accéder à cette poche (Figure 36). Il est probable que l'interaction du domaine BH3 avec la « rear pocket » soit caractéristique de Bax et que Bak

possède un site de fixation de BH3 équivalent (Shamas-Din et al., 2011). Cependant, le modèle proposé par l'équipe de Dewson montre que suite à l'activation par le domaine BH3 de t-Bid, Bak comme Bax, expose son hélice $\alpha 1$ permettant de déstructurer et de fragiliser la petite boucle formée entre les deux hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (Oh et al., 2010).

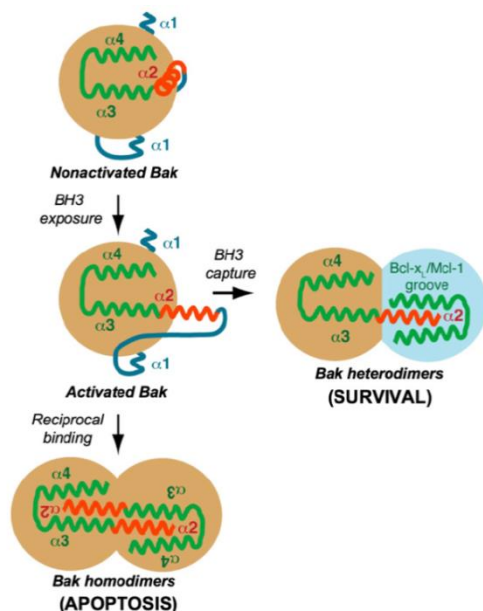


Figure 36 : Modèle d'activation de Bak et de son homodimérisation ou son interaction avec les anti-apoptotiques (d'après Dewson et al., 2008).

II.5.3.2.2. Oligomérisation des effecteurs et perméabilisation mitochondriale

Après activation, Bax et Bak changent de conformation pour s'oligomériser et former des pores au niveau de la membrane mitochondriale, permettant ainsi le relargage du cytochrome c. Deux mécanismes d'activation et d'oligomérisation de Bax et Bak ont été proposés par l'équipe de Dawson en se basant sur le mécanisme d'activation par le BH3-only (kiss and run ou kiss and stay) et le type de dimère formé. Ces modèles sont les suivants :

II.5.3.2.2.1. Modèle de dimère symétrique

Suite à l'activation transitoire (kiss and run) de Bax ou Bak par un BH3-only activateur, le domaine BH3 et la poche hydrophobe de chaque monomère sont exposés. L'exposition des domaines clés permet à chaque monomère d'engager son domaine BH3 dans la poche hydrophobe de l'autre et *vice-versa*. Ainsi les dimères sont formés (Figure 37). Ces dimères peuvent générer des multimères avec un autre dimère par une interaction entre les deux hélices $\alpha 6$ - $\alpha 6$ présentes au niveau de la surface d'interaction des dimères (Figure 37)

(Dewson et al., 2008 ; Oh et al., 2010). Les pores mitochondriaux sont ainsi formés conduisant au relargage du cytochrome c et l'induction de l'apoptose.

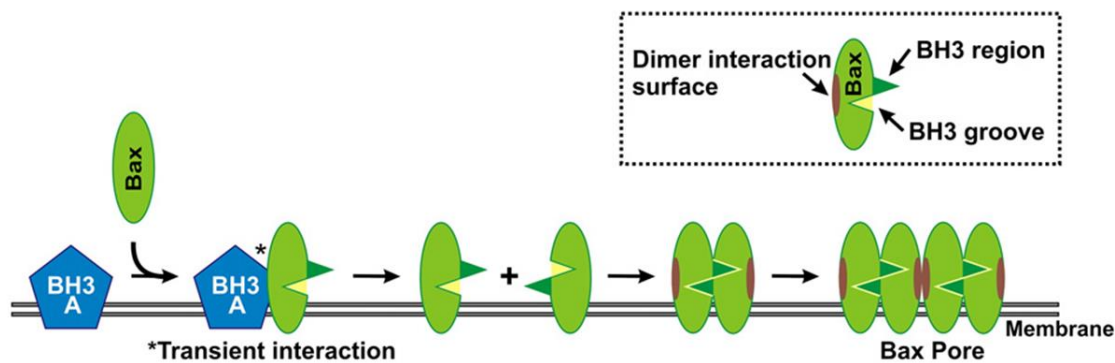
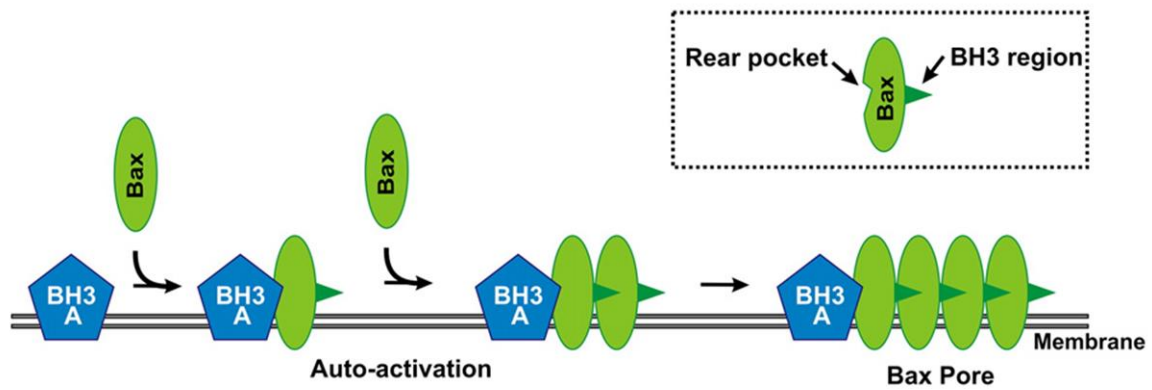


Figure 37 : Modèle symétrique d'activation de Bax et Bak.

Suite à une interaction transitoire du BH3-only activateur avec Bax/Bak, le domaine BH3 ainsi que la cavité hydrophobe de ces derniers sont exposés. Cela permet aux deux monomères de Bax/Bak de se lier l'un à l'autre par engagement du domaine BH3 de l'un dans la poche hydrophobe de l'autre et *vice-versa*. Une fois les dimères formés, ils interagissent entre eux *via* leur surface d'interaction pour former et élargir le pore mitochondrial. Dans cette figure, seul Bax a été représenté pour simplifier la compréhension (D'après Shamas-Din et al., 2011).

II.5.3.2.2.2. Modèle de dimères asymétrique

Ce modèle est basé sur l'auto-activation des pro-apoptotiques par leur domaine BH3 et leur poche arrière (Shamas-Din et al., 2011). L'activation d'un effecteur de l'apoptose initiée par la liaison stable et durable (Kiss and stay) du BH3-only activateur à la poche arrière favorise l'engagement du domaine BH3 de cette protéine. Cette dernière ainsi activée, agit comme une protéine BH3-only et interagit avec la poche arrière d'une autre protéine non active. Ceci conduit au déplacement de son hélice $\alpha 9$ pour permettre son ancrage dans la membrane mitochondriale et à l'engagement de son domaine BH3 qui pourra alors activer une troisième protéine et ainsi de suite. Dans ce modèle, tout au long du processus d'auto-activation et d'oligomérisation des effecteurs, la protéine BH3-only activatrice reste liée à la poche rear du premier membre effecteur activé (Figure 38). Cependant, l'oligomérisation de ces protéines fragilise la liaison avec les BH3-only activateurs provoquant leur libération et la formation de pore mitochondrial. Certaines études ont démontré que l'oligomérisation des effecteurs est bloquée par la surexpression de la protéine Bcl-x_L qui provoque la rétrotranslocation des monomères de Bax de la membrane mitochondriale vers le cytosol bloquant ainsi son oligomérisation (Edlich et al., 2011).



1

Dans ce modèle, les protéines BH3-only activatrices se lient à la « rear pocket » de Bax et Bak pour induire le changement de leur conformation et l'exposition de leur domaine BH3. Ce dernier va pouvoir activer les autres monomères de Bax et Bak *via* un mécanisme d'auto-activation. Le pore formé est asymétrique car le domaine BH3 d'un monomère est lié à la « rear pocket » d'un second monomère. Dans ce modèle, le BH3-only activateur peut rester lié au premier monomère activé tout le long du processus de formation du pore mitochondrial (D'après Shamas-Din et al., 2011).

L'oligomérisation des effecteurs de l'apoptose conduit à la formation de pores mitochondriaux classés en deux types en fonction de leur nature : *i*) des pores de nature protéique qui sont formés exclusivement de protéines et *ii*) des pores lipidiques toroïdaux dont l'interface est composée d'un mélange de lipides et de protéines (Figure 39). Or, la déstabilisation de la bicouche lipidique mitochondriale suggère que Bax et Bak perméabilisent la membrane mitochondriale en produisant des pores de types toroïdaux (Birkinshaw and Czabotar).

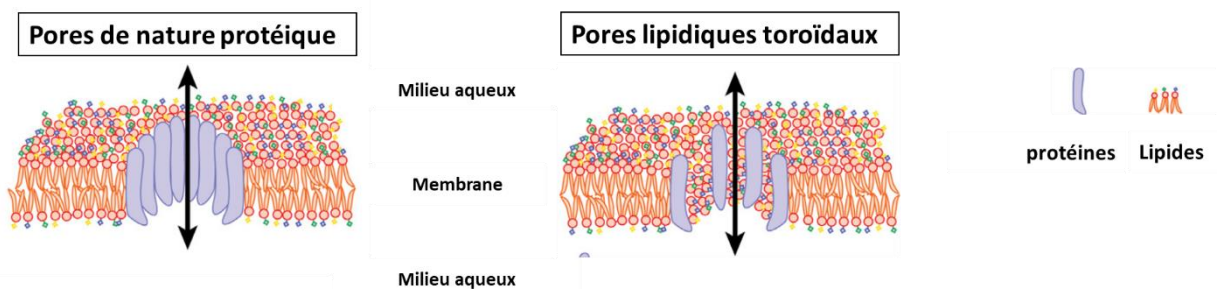


Figure 39 : Schéma illustrant les différences entre les pores de nature protéique et les pores de nature lipidique.

Les protéines sont en bleu clair, les lipides sont en orange, le glycérol et phosphate en rouge (D'après Birkinshaw and Czabotar).

II.5.3.3. Anti-apoptotiques : opposition à l'induction de l'apoptose

Les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1 etc.) montrent une similitude dans leur structure 3D et leur fonction anti-apoptotique. Cependant, elles présentent des différences au niveau de leur localisation, leur mode de régulation et leur affinité envers leurs partenaires.

La localisation subcellulaire des anti-apoptotiques est variable. Bcl-2 est la seule protéine anti-apoptotique qui, une fois synthétisée, est dirigée directement vers la membrane mitochondriale, la membrane du RE et l'enveloppe nucléaire. Les autres protéines anti-apoptotiques possèdent une extrémité carboxylique localisée dans le cœur de leur structure. Ces protéines anti-apoptotiques doivent ainsi être activées au préalable afin d'exposer leur extrémité qui permet l'engagement et l'insertion des protéines dans la mitochondrie. Parmi ces protéines, Bcl-x_L existe sous forme d'un homodimère dans le cytosol, l'extrémité carboxylique d'un des monomères étant séquestrée de manière réciproque dans la poche hydrophobe de l'autre. De même, l'extrémité C-terminale de Bcl-w est séquestrée dans sa propre poche hydrophobe (Hinds et al., 2003) alors que celle de Bfl-1, de nature amphiphile, lui offre une solubilité dans le cytosol. La protéine Mcl-1 est faiblement attachée à la membrane mitochondriale par le motif EELD situé au niveau de son extrémité N-terminale et serait importée au niveau de la mitochondrie via le récepteur Tom70 mitochondrial.

De par leur différence de localisation subcellulaire à l'état initial, les protéines anti-apoptotiques sont aussi soumises à différents modes de régulation jouant sur leur stabilité et leur affinité. La protéine Bcl-2 est une protéine à durée de vie très longue dont l'expression ne change pas en fonction des événements ou du stress. La stabilité de son transcrit est régulée positivement par les nucléolines liées aux ARN ribosomiques, ou négativement par des micros ARN tels que miR-15a et miR-16-1 (Willimott and Wagner, 2010). L'expression de la protéine de Bcl-x_L est variable en fonction du stress interne et des signaux externes. Bcl-x_L est majoritairement modulée au niveau transcriptionnel. L'expression de son gène Bcl-X est régulé par les voies de signalisation JAK-STAT et NF- κ B. Elle est aussi influencée par l'activation des voies de signalisation Ras, des intégrines, de la vitronectine et du facteur de croissance des hépatocytes (HGF) (Grad et al., 2000). Parmi les modifications post-traductionnelles majeures de Bcl-2 et Bcl-x_L figurent les phosphorylations des Sérines et Thréonines situés au niveau de la boucle non structurée entre les hélices α 1 et α 2. Ainsi, à titre d'exemple, dans les maladies hématopoïétiques malignes, les phosphorylations de Bcl-2 au

niveau de la Ser⁶⁹ et Ser⁷⁰ par les acteurs de la voie MAPK tels que JNK, ERK et p38, stabilisent son expression protéique et altère la conformation de sa boucle non structurée augmentant ainsi son affinité envers Bak et Bim (Dai et al., 2013). Ce même effet est aussi observé dans le cas de l'inhibition de la déphosphorylation de la Ser70 par la phosphatase PP2A induite par les ROS. Contrairement aux autres protéines de la famille Bcl-2, Mcl-1 présente un turn-over extrêmement rapide (30min) du fait de la mise en place de mécanismes de régulation complexes qui seront largement détaillés dans le chapitre suivant.

II.5.3.3.1. Association anti- et pro-apoptotiques

Les interactions protéines-protéines (IPP) établies entre les différents membres de la famille Bcl-2 ont été démontrées sur la base d'analyses de spectroscopie, de résonance magnétique nucléaire (RMN) et de co-immunoprécipitation. Pour des raisons pratiques, la plupart des études d'interaction font appel à la protéine recombinante Bcl-x_L étant donné que les autres protéines anti-apoptotiques sont plus difficilement purifiées et que leur rendement est plus faible à cause des effets d'agrégation (comme dans le cas de Bcl-2) ou d'instabilité (comme dans le cas de Mcl-1). Ainsi, le détail obtenu sur le mécanisme d'action de Bcl-x_L a servi de modèle pour les autres protéines sachant qu'il existe certaines différences qui seront discutées ci-dessous.

Il a été démontré qu'un court fragment peptidique issu du domaine BH3 des pro-apoptotiques est suffisant pour interagir avec la poche hydrophobe d'un anti-apoptotique provoquant la perméabilisation mitochondriale. L'analyse de la structure 3D de Bcl-x_L seul (Muchmore et al, 1996) ou complexé au peptide du domaine BH3 de Bak (Sattler et al., 1997) a démontré que le petit peptide BH3 de Bak (résidus 72 à 87) se liait fortement à la poche hydrophobe de Bcl-x_L (K_d=380nM) formée par les domaines BH1, BH2 et BH3 (Figure II.27). Cependant, aucune interaction entre Bcl-x_L et

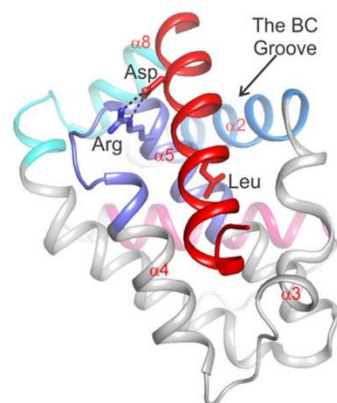


Figure 40 : Structure 3D du complexe Bcl-x_L/Bak (RMN).

un fragment plus court de Bak (résidus 77 à 87) n'a été observée. Une fois lié à la poche hydrophobe de Bcl-x_L, le petit peptide de Bak restructure le domaine BH3 en une hélice α sans induire d'importants changements structuraux de Bcl-x_L (Figure 40) (Muchmore et al., 1996 ; Sattler et al., 1997).

Le peptide de Bak engage les résidus hydrophobes (Val74, Leu78, Ile81 et Ile85) qui interagissent avec les résidus (Phe97, Arg100, Tyr101 et Phe105) de la poche hydrophobe de Bcl-x_L et stabilise ainsi le complexe (Sattler et al., 1997). En plus de ces interactions hydrophobes, les résidus chargés de Bak (Arg76, Asp83 et Asp84) sont étroitement rapprochés des résidus qui leur font face sur Bcl-x_L (Glu129, Arg139 et Arg100 respectivement).

Des études de mutagenèses dirigées ont permis d'identifier les interactions importantes permettant d'établir ce complexe. Ainsi, la seule la substitution L78A provoque une réduction de l'affinité entre les partenaires d'environ 800 fois ($K_d = 270\mu\text{M}$ contre $K_d = 0.34\mu\text{M}$). Cette même diminution a été observée en substituant chacun des résidus hydrophobes formant ce complexe (Sattler et al., 1997). De plus, la substitution D83A ou R139Q conduit à une chute considérable dans l'affinité d'interaction ($K_d = 41\mu\text{M}$ vs $K_d = 0.34\mu\text{M}$). Ce résultat a été confirmé par les analyses de co-immunoprécipitation du complexe (Sattler et al., 1997). Toutes ces observations ont confirmé l'importance des interactions hydrophobes établies entre les résidus conservés du domaine BH3 et la poche hydrophobe des anti-apoptotiques,

Les structures des complexes Bcl-x_L/Bad (Petros et al., 2000), Bcl-x_L/Bim (Liu et al., 2003) ont également été décrites. Les structures 3D établies par RMN ont révélé que l'interaction de Bim et Bad avec Bcl-x_L nécessite uniquement leur domaine BH3. De manière similaire à Bak, ces domaines partagent les mêmes contacts avec les résidus de Bcl-x_L malgré la différence des séquences. L'interaction des peptides issus du domaine BH3 de Bim (Figure 41A) et de Bad (Figure 41C) avec la poche hydrophobe de Bcl-x_L ne change pas la structure globale de cette dernière mais influence en partie la conformation et le réarrangement des deux hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$. Ainsi l'hélice $\alpha 3$ perd en qualité hélicoïdale alors que l'hélice $\alpha 4$ est plutôt déplacée vers le peptide de Bim ou de Bad.

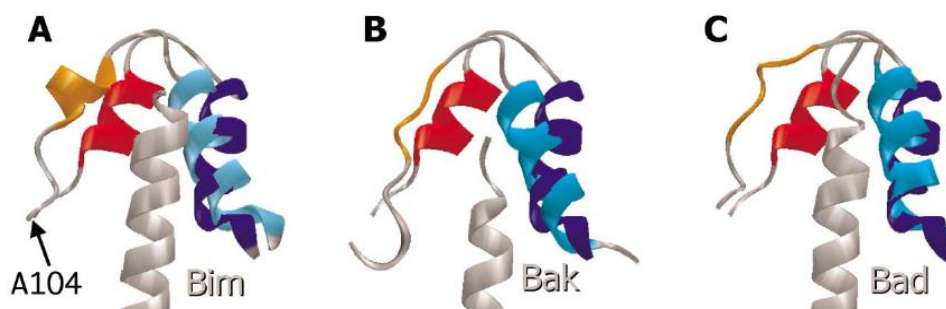


Figure 41 : Changement dans la conformation de Bcl-x_L après son interaction avec les peptides de Bim, Bak et Bad.

Présentation de la superposition des rubans de l'hélice $\alpha 3/\alpha 4$ de Bcl-x_L ainsi que la boucle qui les connecte avant et après interaction avec ces peptides. Représentation des fragments peptidiques de Bim humain (résidus 83-115) (A), de Bak (résidus 572-587) (B), et de Bad (résidus 140-164) (C), en complexe avec Bcl-x_L humain. Les $\alpha 3$ et $\alpha 4$ de Bcl-x_L seul sont représentés en rouge et violet respectivement. Les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$ de Bcl-x_L en complexe avec Bim, Bak et Bad sont en jaune et cyan respectivement (D'après Liu et al., 2003).

Cette observation a également été réalisée dans le complexe Bak/Bcl-x_L (Figure 41C), démontrant la flexibilité de la poche hydrophobe de Bcl-x_L et expliquant sa capacité d'interaction avec des partenaires différents (Liu et al., 2003).

L'interaction de Mcl-1 avec ses partenaires est très différente. En dépit de la similitude dans la structure globale avec Bcl-x_L et Bcl-2, la cavité hydrophobe de Mcl-1 est unique par sa composition en résidus et par son profil d'interaction. Les études biochimiques ont démontré que Mcl-1 interagit avec beaucoup d'affinité pour Noxa, Bim et Puma, faiblement pour Bik, Bmf et Hrk et n'a pas d'affinité pour Bad. Pour comprendre cette sélectivité d'interaction, des mutations sites-spécifiques ont été réalisées afin de substituer les résidus clés de Mcl-1 par ceux de Bcl-x_L (Day et al., 2005 ; Muchmore et al., 1996). Ces modifications n'ont pas changé l'absence d'affinité de Bad pour Mcl-1. Toutefois, la substitution des résidus clés du domaine BH3 de Bad par ceux de Bim (Liu et al., 2003), telle que la substitution Tyr¹⁰⁵ par une Isoleucine, rétablit l'interaction Bad/Mcl-1 tout en conservant l'affinité de Bad pour Bcl-x_L et Bcl-2. Ce même résultat a été obtenu en substituant la Lys¹⁰⁵ en Acide Glutamique dans Noxa (Cory et al., 2003). La Lys¹⁰⁵ de Noxa correspondant au résidu Tyr¹⁰⁵ dans Bad est supposée empêcher l'interaction de Noxa avec Bcl-x_L. Ainsi la substitution de la Lys¹⁰⁵ en Glu sur le peptide de Noxa améliore son interaction avec Bcl-x_L. Ces résultats montrent que la spécificité et l'affinité d'une protéine pour un partenaire ne dépend pas seulement de la nature de la poche (rigidité vs flexibilité, électropositivité vs neutre) mais également de la nature du contact établi avec son partenaire.

La mesure expérimentale de l'affinité d'interaction entre les membres pro- et anti-apoptotiques apporte des indices sur le type de contact établi entre ces deux partenaires. En revanche, ces indices sont souvent critiqués pour leur fiabilité. Dans la cellule, ces interactions ont lieu entre protéines entières, très souvent attachées à la membrane mitochondriale où elles changent de conformation pour exercer leur fonction. En revanche, dans les conditions expérimentales, ces interactions sont souvent étudiées en solution et à partir de protéines recombinantes ou synthétiques et des mitochondries isolées ou des liposomes, ce qui remet en cause l'application des résultats obtenus à un modèle vivant. Ainsi, des techniques supplémentaires telles que l'immunoprécipitation ou la technologie de BRET (Bioluminescence Resonance Energy de Transfert) ont été développées pour renforcer et confirmer « *in cellulo* » les résultats obtenus par les études de structure.

II.5.3.3.2. Modèle d'inhibition de l'apoptose

Sous leur forme active, les protéines anti-apoptotiques sont préférentiellement localisées au niveau de la membrane mitochondriale où elles veillent à conserver l'intégrité mitochondriale en inhibant leurs partenaires pro-apoptotiques. Le mécanisme par lequel les protéines pro-apoptotiques effectrices perméabilisent la membrane mitochondriale reste le sujet de multiples investigations. L'évaluation de la perméabilisation de la membrane mitochondriale en utilisant les peptides recombinants de Bcl-x_L, Bax et Bid a démontré que Bcl-x_L inhibe la perméabilisation de la membrane mitochondriale par inhibition de Bim mais également de Bax (Billen et al., 2008). Cette découverte a permis de fonder les bases de nombreuses études mécanistiques qui ont permis de proposer les modèles actuels. L'inhibition du processus apoptotique par les anti-apoptotiques pourrait suivre deux modes différents : 1) les anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-x_L et Mcl-1 séquestrent les BH3-only activateurs sous forme d'un complexe stable limitant ainsi l'activation des effecteurs Bax et Bak ; 2) les anti-apoptotiques sont impliqués dans la séquestration directe des monomères Bax et Bak activés.

Bien que ces deux mécanismes soient capables d'inhiber la perméabilisation mitochondriale, le modèle 1 paraît moins efficace que le modèle 2 et plus facilement déstabilisé. Dans le cadre du modèle 1, en l'absence de stimuli, les effecteurs ont un statut inactif/dormant et sont donc incapables d'être séquestrés par les anti-apoptotiques. En réponse au stress, les BH3-only sont rapidement surexprimés et seront capturés par les anti-apoptotiques. En dépit de leur forte affinité, l'interaction entre les deux derniers est réversible, favorisant une séquestration transitoire susceptible de maintenir un niveau de BH3-only libres capable de conduire à

l'activation des effecteurs et à l'induction de la perméabilisation de la mitochondrie. A cela s'ajoute le mécanisme d'auto-activation des effecteurs tel que présenté plus haut, conduisant à l'activation d'autres monomères indépendamment de l'action des BH3-only activateurs (Llambi et al., 2011 ; Gavathiotis et al., 2008).

La puissance du modèle 2 dans l'inhibition de la perméabilisation mitochondriale a également été argumentée par le fait que les anti-apoptotiques sont souvent surexprimés dans les pathologies cancéreuses et que malgré la rapidité de l'activation de Bax et de sa translocation dans la membrane externe de la mitochondrie, Bax serait « encerclée » par les anti-apoptotiques qui vont directement interagir avec les monomères activés de Bax et empêcher leur oligomérisation. Une observation similaire a également été rapportée pour la protéine Bak, constitutivement localisée au niveau de la mitochondrie et qui expose son domaine d'interaction à un stade précoce de la signalisation apoptotique pouvant ainsi probablement être rapidement séquestrée par les anti-apoptotiques (Chen et al., 2005 ; Willis et al., 2005 ; Willis et al., 2007).

La protéine Bcl-x_L s'oppose à la perméabilisation mitochondriale par un autre mécanisme indépendant des interactions précédemment discutées. Ce mécanisme implique la stabilisation de Bax dans le cytosol. En effet, Bax est systématiquement transloqué à la membrane mitochondriale où il interagit avec Bcl-x_L qui est capable d'induire son retour vers le cytosol en le stabilisant sous sa forme inactive (Hsu et al., 1997). Ce mécanisme est parmi les mécanismes les plus puissants pour empêcher la survenue de l'apoptose (Eldrich et al, 2011).

II.6. Autres types de mort cellulaire : nécrose et autophagie

En plus de la mort par apoptose, d'autres types de mort cellulaire ont été décrits, parmi lesquels se distinguent la nécrose et l'autophagie.

II.6.1. La nécrose

La nécrose est le deuxième type de mort le plus étudié après l'apoptose. Elle est souvent considérée comme la mort accidentelle. Morphologiquement, la nécrose est assez différente de l'apoptose (Figure 42).

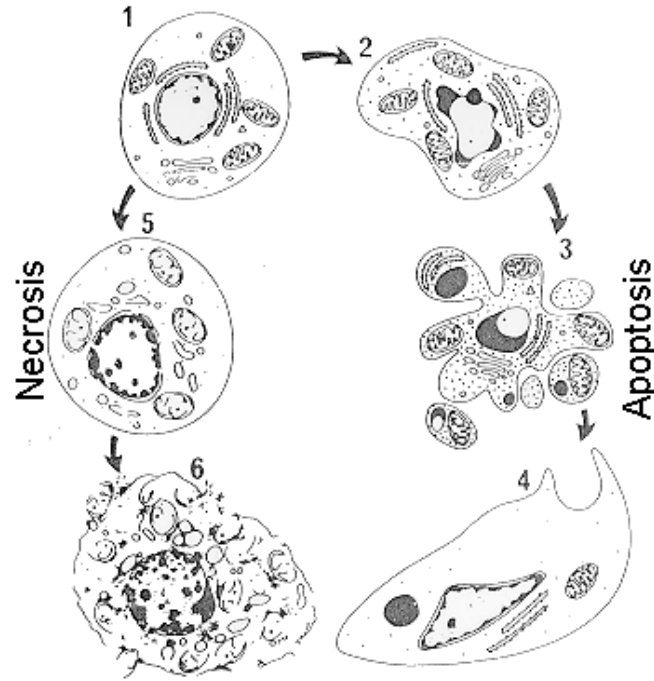


Figure 42 : Schéma récapitulatifs des différences morphologiques lors de la mort par apoptose et par nécrose.

Durant la nécrose, les cellules gonflent, l'intégrité de la membrane plasmique est perdue et les cellules sont rapidement lysées. Les caractéristiques biochimiques de l'apoptose comme l'activation des caspases et la fragmentation de l'ADN sont la plupart du temps absentes dans les cellules nécrotiques.

Le processus nécrotique est induit par différents stimuli parmi lesquels des toxines bactériennes (Warny et al., 2000), des composantes de la défense immunitaire comme le complément et les cytokines (Villoutreix et al., 1999), l'oxyde d'azote et les ROS (Figure 43).

L'induction de la nécrose passe par l'activation des récepteurs de mort tels que la famille des récepteurs TNF (Fas, TRAIL ...) activés par les cytokines ou les récepteurs NMDA, activés eux-mêmes par les toxines. Elle passe également par l'induction d'autres senseurs en réponse directe aux dommages de l'ADN par l'irradiation et les agents anticancéreux ou indirecte en réponse au stress oxydatif comme l'ischémie, la formation de ROS...). Ces différents senseurs induisent par la suite les seconds messagers. En effet, l'activation des récepteurs et l'induction des dommages à l'ADN conduisent à l'activation des voies de signalisation communes entre l'apoptose et la nécrose telles que la voie JNK et p38. Cependant le choix de la cellule de mourir par apoptose ou par nécrose est jusqu'à maintenant inconnu mais

dépendrait du stimulus. Parmi les seconds messagers, le calcium constitue aussi un des principaux acteurs impliqué dans la nécrose. En effet le blocage des flux calciques abolit la survenue de la nécrose induite par les toxines (Figure 43).

Enfin, ces différents stress aboutissent à l'activation des protéases impliquées dans le processus nécrotique telles que les calpaïnes, les catépsines et les protéases à sérine mais leur rôle exact dans l'induction de la nécrose n'est pas encore élucidé (Proskuryakov et al., 2003).

La famille Bcl-2 joue également un rôle dans la mort des cellules par nécrose. De manière similaire à l'apoptose, certains effets nécrotiques sont contrecarrés par les protéines anti-apoptotiques Bcl- x_L et Bcl-2 (Schaffer et al., 2000). BNIP3, une protéine impliquée dans la nécrose, est ainsi ciblée par les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Cette protéine possède un domaine BH3 similaire aux protéines pro-apoptotiques par lequel BNIP3 est séquestré par les anti-apoptotiques, conduisant à la répression de la nécrose (Proskuryakov et al., 2003).

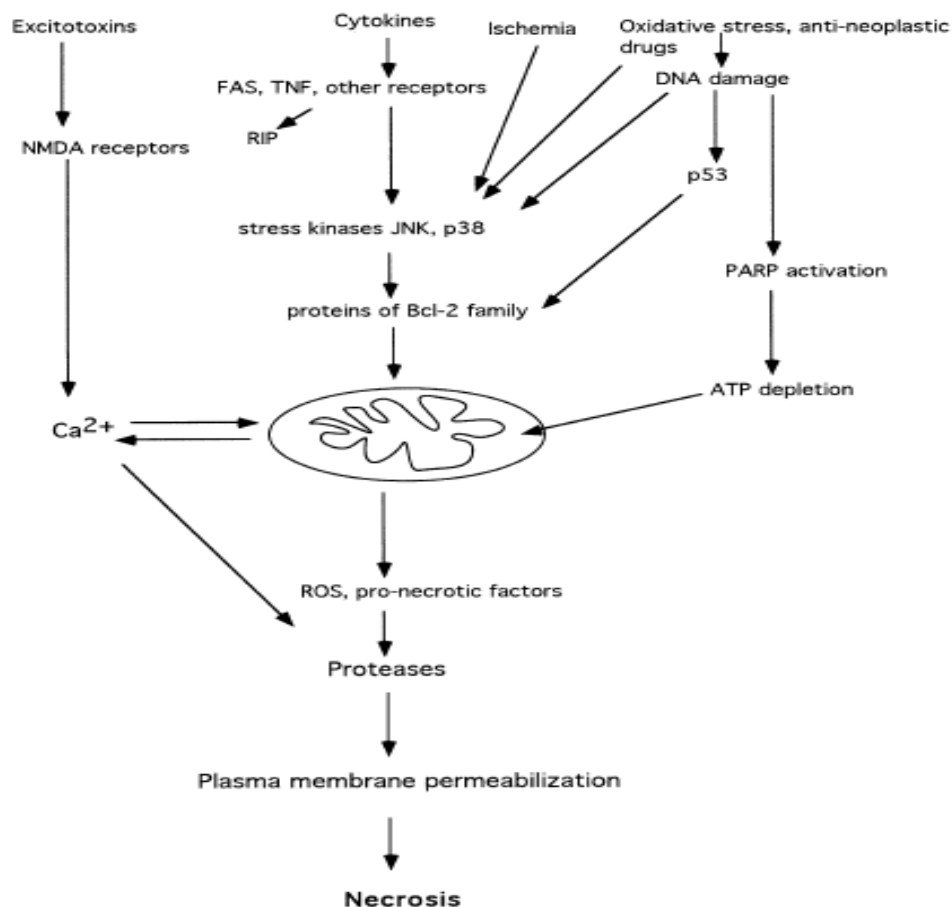


Figure 43 : Différents mécanismes d'induction de la nécrose (d'après (Proskuryakov et al., 2003).

II.6.2. L'autophagie

L'autophagie est un processus quelque peu différent des deux autres types de mort car il constitue avant tout un mécanisme de survie de la cellule à une carence en nutriments. C'est un mécanisme qui permet de digérer une partie du contenu de la cellule (cytoplasme, protéines ou organites cellulaires) (Levine and Klionsky, 2004). Ce processus est induit par la carence en nutriments, l'absence de facteur de croissance, l'hypoxie et le traitement par des agents anticancéreux (Levine et Klionsky, 2004). Les organites abondantes ou défectueuses sont enveloppées d'une double membrane appelée autophagosome qui va fusionner avec le lysosome et générer l'auto-lysosome dans lequel l'autophagosome et son contenu seront dégradés par les enzymes lysosomales. L'autodestruction des organites défectueuses permet d'une part de réduire les besoins énergétiques de la cellule et d'autre part de palier à ses besoins en substrats.

Néanmoins, la persistance de la carence alimentaire déclenche un processus de mort cellulaire associé à l'autophagie « Autophagie associated cell death » (Hotchkiss et al., 2009). Contrairement à l'apoptose, le processus de mort associé à l'autophagie est indépendant de la condensation chromosomique et est caractérisé par une accumulation massive de vacuoles cytoplasmiques et une destruction des cellules mortes indépendante des macrophages.

Le processus autophagique requiert des protéines de la famille des Atg (une quinzaine de protéines). Parmi elles, la Phosphatidyl-Inositol 3-phosphate Kinase (PI3K ou VPS34) et la Becline 1 interagissent en amont pour la formation du phagosome. Ce complexe protéique permet l'initiation de la formation de l'autophagosome par le recrutement du premier système de conjugaison Atg12-Atg5. Ce complexe permet à son tour la conjugaison de la phosphatédyl éthanolamine (PE) à l'extrémité C-terminale de LC3 (LC3-PE) et l'association à la membrane autophagosomale. Toutes les protéines Atg à l'exception de LC3-PE se détachent alors rapidement de la membrane autophagosomale (Figure 44). Cette caractéristique fait de LC3-PE un marqueur spécifique de l'autophagie.

En plus de leur rôle dans le processus autophagique, les protéines Atg ont d'autres fonctions à l'instar de la protéine Becline 1 qui intervient dans l'apoptose. Cette protéine est composée d'un domaine BH3 semblable à celui des protéines pro-apoptotique de la famille Bcl-2 et peut donc se lier aux protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L, régulant ainsi la réponse apoptotique.

Ceci suggère donc que les protéines de l'autophagie peuvent également participer à la voie de l'apoptose. L'équilibre entre les différentes protéines de ces deux processus physiologique (apoptotique ou autophagique) et le type de stimulus auquel la cellule est exposée, seront à l'origine de l'engagement dans l'un des deux processus.

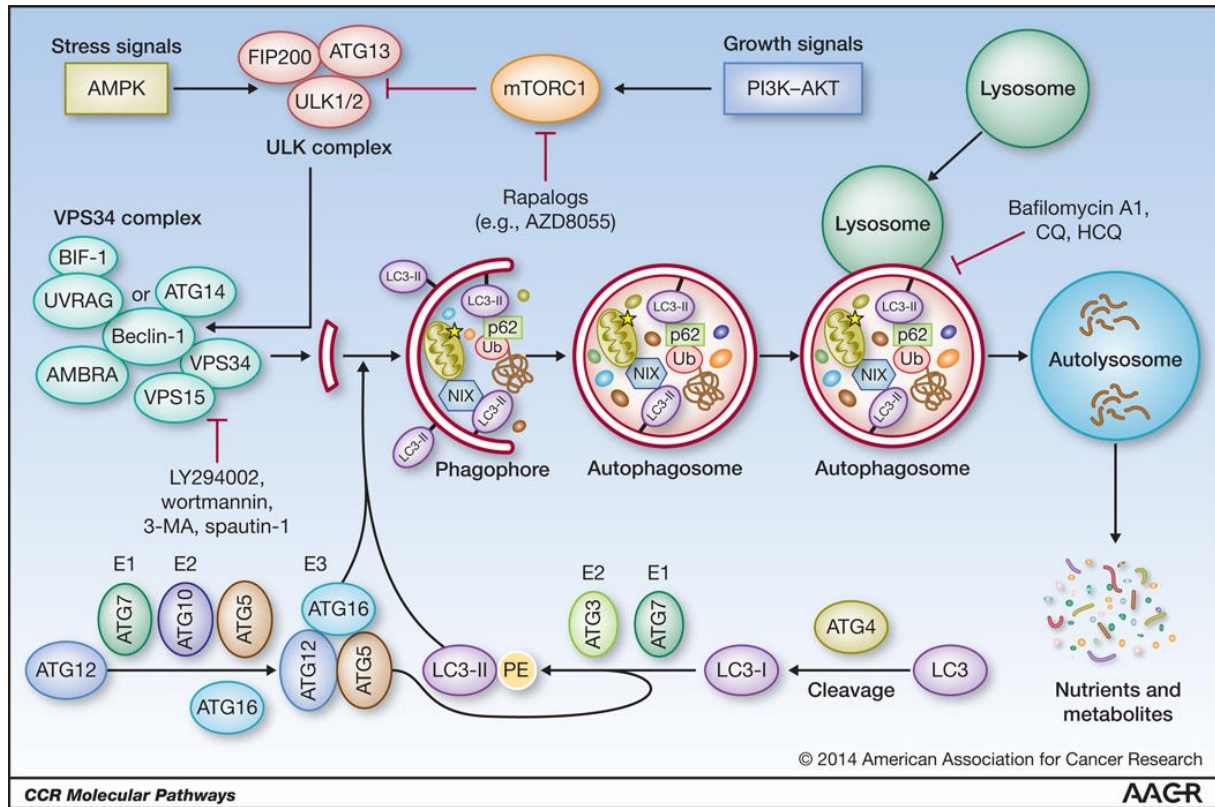


Figure 44 : Figure 44. Le processus autophagique.

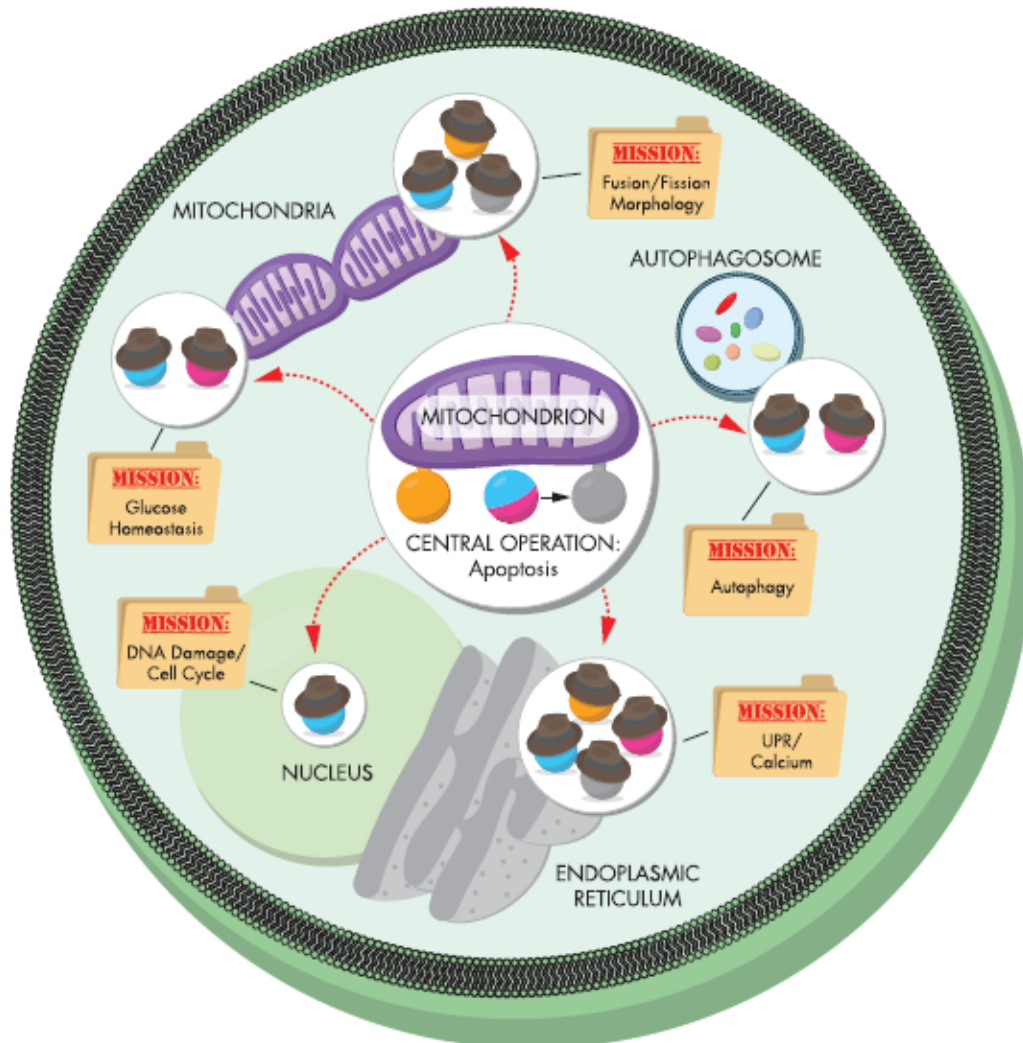
En absence de nutriments ou de facteurs de croissance, l'activation de l'AMPK et/ou l'inhibition de mTOR conduisent à l'activation de ULK qui phosphoryle Beclin 1, permettant l'activation de VSP34 et la formation du phagosome. ULK fonctionne en complexe avec FIP200 et ATG13 tandis que VPS34 nécessite des sous-unités régulatrices. VPS15 et Beclin 1 permettent l'association d'autres facteurs régulateurs comme AMBRA, ATG14, UVRAG et BIF-1. De multiples protéines Atg (Atg5 et 7) vont catalyser la conjugaison de PE à LC3 (LC3-II) et la diriger vers la membrane du phagophore où elle joue le rôle d'adaptateur protéique. L'élongation et la fermeture du phagophore génèrent un autophagosome mature qui fusionne avec le lysosome conduisant à la dégradation de nutriment et des métabolites (D'après Cicchini et al, 2015).

II.7. Implication de la famille Bcl-2 dans les processus physiologiques

II.7.1. Généralités

Les membres de la famille Bcl-2 figurent parmi les principaux régulateurs de la mort cellulaire programmée. Les expériences faisant appel aux techniques de transgénèse et de

mutagenèse ont cependant mis en évidence des rôles alternatifs de la famille Bcl-2, également connues sous « day-jobs » (Gross and Katz, 2017). Certaines de ces fonction sont développées ci-dessous (Figure 45).



Les membres de la famille Bcl-2 participent à plusieurs « day-jobs » qui contribuent au bon fonctionnement de la cellule. Cependant, en cas de stress, les membres de cette famille abandonnent ces « day-jobs » pour rejoindre la mitochondrie où elles effectuent leurs fonctions apoptotiques (ou « night job ») (D'après Gross and Katz, 2017).

II.7.1. Rôle dans le développement embryonnaire

L'apoptose joue un rôle primordial au cours du développement embryonnaire puisqu'elle permet le modelage des structures cérébrales, des organes et du système immunitaire. L'équilibre entre la prolifération, la différenciation et la mort programmée des cellules permet de conserver une homéostasie de l'organisme. Dès lors que le mécanisme apoptotique est régulé par les membres de la famille Bcl-2, il est donc important de s'intéresser au rôle de ces

protéines dans le développement embryonnaire. Les souris transgéniques portant une délétion du gène codant pour la protéine Bcl-2 (*BCL-2^{-/-}*) présentent ainsi une régression du thymus et de la rate et développent des maladies rénales polykystiques et une hypo- pigmentation due à une apoptose massive des mélanocytes. La délétion de *BCL-X^{-/-}* est létale à l'âge embryonnaire en raison d'une apoptose massive des cellules hématopoïétiques et neuronales alors que la délétion de *BCL-W^{-/-}* a mis en évidence l'implication de la protéine dans le processus de spermatogenèse. Enfin, la délétion de *MCL-1^{-/-}* met un terme au développement embryonnaire en bloquant l'implantation dans l'utérus (Chipuk et al., 2010). La délétion du gène *MCL-1* réalisée de manière tissu spécifique a démontré son implication dans le maintien des cellules souches hématopoïétiques et des lymphocytes effecteurs. La délétion conditionnelle de *MCL-1* dans les cardiomyocytes provoque des cardiomyopathies et une insuffisance cardiaque (Czabotar et al., 2014). Cependant, il n'a toujours pas été démontré si l'inhibition de l'activité de Mcl-1 provoquerait les mêmes effets observés en absence de son expression (Opferman et al., 2005).

Le rôle des protéines pro-apoptotiques dans le développement embryonnaire a également été démontré. Les souris déficientes en *BAX^{-/-}* et *BAK^{-/-}* ont un phénotype grave puisque la plupart meurent à l'âge embryonnaire en raison d'une accumulation excessive de cellules. Les souris qui survivent (<10%) souffrent de plusieurs anomalies telles que la splénomégalie, la lymphadénopathie et des palmures. En revanche, les souris déficientes en Bak ou Bax ont un phénotype moins grave. Les souris déficientes en Bax souffrent d'hyperplasie des lymphocytes T et B et d'anomalies dans le système de reproduction mâle et femelle alors que les souris déficiente en Bak ne montrent aucun défaut de développement ou d'homéostasie. La répression des deux allèles a démontré en effet que les protéines Bax et Bak sont redondantes dans la mort par apoptose (Chipuk et al., 2010).

La délétion génétique des BH3-only révèle qu'ils présentent à la fois une spécificité tissulaire et de réponse vis-à-vis de certains stimuli (Chipuk et al., 2010). Les souris *BID^{-/-}* souffrent de lésions au niveau du foie malgré leur développement normal. Les souris *BIM^{-/-}* ont des hyperplasies lymphoïdes et myéloïdes comme l'atteste les splénomégalies et les lymphadénopathies dont elles souffrent. De plus, les cellules lymphoïdes de ces souris sont résistantes à la privation en cytokines. La notion que les BH3-only présentent une activité tissu spécifique a été démontrée avec la délétion de Puma. En effet, chez les souris déficientes en Puma, les cellules hématopoïétiques et gastro-intestinales sont remarquablement résistantes à l'apoptose induite par l'irradiation (Chipuk et al., 2010).

La combinaison de la délétion bi- ou unilatérale de (*BIM*^{-/-} ou ^{+/-}) avec la délétion *BCL2*^{-/-} permet de corriger l'hypopigmentation chez les souris et de restaurer la fonction rénale altérée par la suppression de Bcl-2, ce qui illustre l'équilibre entre les membres de cette famille pour assurer l'homéostasie tissulaire. En revanche, le remplacement de Bim par d'autres BH3-only tel que Bad et Noxa n'a pas abouti au même résultat, illustrant la différence dans les rôles de ces protéines activatrices ou sensibilisatrices (Mérino et al., 2009).

II.7.2. Régulation de la morphologie mitochondriale

La morphologie de la mitochondrie varie en fonction des exigences environnementales et de la différenciation cellulaire. Les mitochondries forment un réseau très dynamique qui permet de recycler (fusion-fission) ou de dégrader les mitochondries endommagées (mitophagie). La fission est un processus dynamique qui permet de diminuer le potentiel membranaire, la consommation d'oxygène et la production d'ATP. Elle est contrôlée par les protéines DRP1 cytosoliques, et par les protéines Fis et Mff insérées dans la membrane externe de la mitochondrie. La fusion (processus inverse de la fission) est régulée par les mitofusines 1 et 2 (MFN1/2) localisées dans la membrane externe de la mitochondrie et OPA1 qui est associé à la membrane interne de la mitochondrie (Chipuk et al., 2010). La fragmentation de la mitochondrie est une constante de l'apoptose ce qui suggère l'implication de la famille Bcl-2 dans le processus de dynamique mitochondriale (Autret and Martin, 2009). Il a été démontré que la délétion de *BAX* et *BAK* réduit la fusion mitochondriale. Cependant le mécanisme exact par lequel cette dynamique est influencée par ces protéines n'est pas encore bien élucidé. Un modèle a été proposé, qui décrit que DRP1 et Bax passent du cytoplasme à la mitochondrie et que la co-localisation de ces deux protéines au niveau de la mitochondrie bloque la fusion mitochondriale en faveur de la fission. L'expression ectopique de Bcl-x_L, qui interagit directement avec la protéine MFN1 et 2, favorise la fusion mitochondriale. Bak est également capable d'interagir avec MNF2 et de favoriser la fusion mitochondriale. Cependant, l'expression de Bax et Bak et leur interaction avec Bcl-x_L inhibe la fusion mitochondriale sans induire de fission (Sheridan et al., 2008). Cette observation permet de conclure que le dynamisme mitochondriale est dépendant du statut d'activation de Bak et Bax.

La formation des crêtes mitochondriales est contrôlée par les différentes variantes de la protéine OPA qui s'oligomérisent pour maintenir cette ramification. Il a été observé que le désassemblage des composantes OPA par les BH3-only tels que Bid et Bim, par un mécanisme qui n'est pas encore établi, altère la morphologie mitochondriale.

II.7.3. Régulation du métabolisme au niveau de la membrane mitochondriale interne

Il a été démontré que les protéines anti-apoptotique Bcl-2, Bcl-x_L et Mcl-1 sont impliquées dans la régulation du métabolisme mitochondriale. Les protéines Bcl-2 et Bcl-x_L, localisées au niveau de la membrane interne de la mitochondrie, favorisent la régulation de la chaîne respiratoire, la synthèse d'ATP et le maintien du potentiel membranaire mitochondrial. Certaines études ont démontré que la protéine Bcl-2 est localisée au niveau de membrane interne de la mitochondrie et se trouve liée au cytochrome c oxydase (COX) et à la Cyclophiline D (Chen and Pervaiz, 2010). Bcl-x_L est aussi situé au niveau de la membrane interne de la mitochondrie où il interagit avec l'ATP synthase F1F0, jouant ainsi un rôle important dans le maintien du potentiel membranaire et la production d'ATP (Alavian et al., 2011). En effet, la surexpression de Bcl-x_L dans les neurones augmente le niveau d'ATP cytoplasmique. En revanche, son inhibition avec des molécules pharmacologique conduit à sa diminution.

Mcl-1 peut aussi être localisée au niveau de la membrane interne de la mitochondrie et participer ainsi à la régulation du métabolisme mitochondriale (Perciavalle et al., 2012). Sa translocation à cet endroit nécessite un double clivage protéolytique par lequel elle perd sa fonction anti-apoptotique. Une fois au niveau du compartiment interne de la mitochondrie, Mcl-1 est impliquée dans l'organisation des crêtes, le maintien du réseau tubaire mitochondriale, l'activité enzymatique du complexe I (NADH déshydrogénase), du complexe II (succinate deshydrogénase) et du complexe III (COX) mais également dans la formation des super-complexes respiratoires F1F0 et la production de l'ATP (Perciavalle et al., 2012).

II.7.3. Régulation du métabolisme glucidique et lipidique

Les BH3-only sont également impliqués dans la régulation du métabolisme cellulaire. En effet, Bad et Noxa favorisent la consommation du glucose et régulent son turnover *via* la voie du pentose phosphate plutôt que la voie de la glycolyse (Giménez-Cassina and Danial, 2015). BNIP3 régule quant à lui le métabolisme lipidique *via* l'augmentation de l'oxydation des acides gras et l'inhibition de la synthèse des lipides. En effet, la suppression de BNIP3 provoque une augmentation de la synthèse des lipides au niveau du foie et une diminution de

l'oxydation des acides gras (Glick et al., 2012). La protéine Bid est également connue pour son rôle dans le métabolisme lipidique. En effet, la forme tronquée de Bid (t-Bid) inhibe l'oxydation des acides gras *via* l'inhibition de la carnitine palmitoyl-transferase-1 (CPT-1) (Giordano et al., 2005) .

II.7.4. Régulation de l'autophagie

L'autophagie est un processus cellulaire qui tend à mobiliser les métabolites et l'énergie pour la survie, tel que présenté plus haut. La protéine BH3-only Becline-1 en est l'un des régulateurs principaux. Cette protéine a initialement été considérée comme un partenaire des protéines anti-apoptotiques suggérant que l'autophagie et l'apoptose sont deux mécanismes très liés (Maiuri et al., 2007) .

Becline-1 possède un domaine BH3 par lequel il interagit en effet avec Bcl-2 et Bcl-xL. L'inhibition de cette interaction par des modifications post-traductionnelles (phosphorylation de la poche hydrophobe ou le domaine BH3), par des mutations touchant les résidus clés de l'interaction ou par la liaison d'un BH3-only sensibilisateur tel que BNIP3, favorise le déplacement de Becline-1 et l'induction de l'autophagie (Maiuri et al., 2007).

II.8. Altération des voies de l'apoptose dans les cancers

La dérégulation des voies de l'apoptose est un point très important dans le développement et la progression des cancers. Dans le but d'échapper à ce type de mort, les cellules cancéreuses développent divers mécanismes moléculaires qui peuvent être subdivisés en 2 types : les mécanismes préventifs de la perméabilisation de la membrane mitochondriale et les mécanismes d'inhibition de la fonction des caspases en aval de la dépolarisation mitochondriale.

II.8.1. Mécanisme de prévention de la perméabilisation mitochondriale :

Comme détaillé plus haut, l'intégrité de la mitochondrie est maintenue par un ensemble d'éléments parmi lesquels figurent les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Dans les cancers, les protéines anti-apoptotiques sont surexprimées, empêchant la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie en réponse au stress. Le déséquilibre moléculaire de la famille Bcl-2 au profit des anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-x_L et Mcl-1 est une altération qui

apparaît dans plus de la moitié des cancers, favorisant la progression des tumeurs et la résistance aux signaux de mort incluant les agents cytotoxiques à visée thérapeutique. Il a également été démontré que l'inhibition de l'activité de Bax et Bak ou la perte des BH3-only tels que Noxa, Puma et Bim suite à des mutations ou altérations épigénétiques constituent des facteurs responsables de la résistance au traitement dans plusieurs types de cellules cancéreuses (Lindsten et al., 2000). D'autres altérations, telles que la perte de fonction du gène suppresseur de tumeur *TP53*, permettent aux cellules cancéreuses d'empêcher l'induction de l'apoptose. Cette altération est très répandue dans différents types de tumeurs. C'est notamment le cas dans les cancers de l'ovaire séreux de haut grade parmi lesquels 96% des cas présentent une altération de *TP53*. Elle offre aux cellules cancéreuses l'opportunité de résister aux dommages à l'ADN qui surviennent suite à la chimiothérapie conventionnelle. *TP53* est aussi responsable de la régulation transcriptionnelle de l'expression des BH3-only Puma et Noxa, de l'inhibition de l'expression de Bcl-2, ou encore de l'activation des effecteurs Bax et Bak (Goldar et al, 2015).

II.8.2. Mécanismes de résistance à l'apoptose situés en aval de la perméabilisation mitochondriale

Ils consistent en l'inhibition de l'activité des caspases. Il a été admis que la perte du potentiel mitochondrial est un point de non-retour qui aboutit à l'induction de la mort par apoptose. Cependant, sous certaines conditions, les cellules cancéreuses peuvent survivre après la perméabilisation mitochondriale. Cela a été décrit dans certaines cellules neuronales qui subsistent même après la perméabilisation de la mitochondrie (Martinou, 1999). L'inhibition de la fonction des caspases implique entre autre l'inhibition de la formation de l'apoptosome par des altérations épigénétiques, la phosphorylation de la protéine APAF-1, ou la dégradation du cytochrome c cytosolique après ubiquitination (Gama et al., 2014). L'inhibition des caspases est aussi assurée par certaines protéines de la famille des IAP (Inhibitors of Apoptosis Proteins). Les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP), sont des protéines issues d'une famille très conservée dans l'évolution et sont aujourd'hui au nombre de 8 (NAIP, cIAP1, cIAP2, XIAP, Apollon, ML-IAP, ILP2, Survivine). La famille des IAP est définie par la présence, à l'extrémité aminoterminal des protéines, d'au moins une copie d'un domaine conservé d'interaction protéine-protéine nommé BIR (baculoviral IAP repeat) d'environ 70 acides aminés (Budhidarmo et Day, 2015). BIR2 et 3 de X-IAP jouent un rôle très important dans l'interaction avec les caspases 3, 7 et 9 bloquant ainsi leur action (Deveraux et al., 1997).

Certains de ces inhibiteurs de caspases possèdent en plus de leur domaine BIR un domaine RING (Really Interstion New Gene) situé à leur extrémité C-terminale qui leur confère une activité E3-Ligase conduisant à l'ubiquitination de leurs partenaires tels que les caspases et leur dégradation par le protéasome (Dubrez et al., 2013).

La sur-expression des IAP a été reportée dans plusieurs cancers dont les cancers du sein et de l'ovaire. Cette surexpression peut être due à l'oncogène Ras et E6. La dérégulation dans l'expression des IAP conduit à une baisse importante dans le niveau d'expression de la caspase 3 et une résistance à l'apoptose. La restauration du niveau basal de la caspase-3 dans les cellules telles que les cellules cancéreuses du sein MFC7, les sensibilisent à la chimiothérapie ce qui prouve l'importance du ratio Caspase3/IAP dans la réponse au traitement. En plus de leur action inhibitrice sur les caspases, cIAP 1 et 2 sont capables d'induire la prolifération cellulaire en stimulant activation de c-Myc et des cyclines A et E, et peuvent favoriser ainsi l'expression du facteur E2F et la répression de Mad1 permettant la progression dans le cycle cellulaire (Xu et al., 2007).

L'activité de XIAP est modulée par les protéines SMAC/Diablo libérées de la mitochondrie au moment de l'induction de l'apoptose en même temps que le cytochrome c. Ces protéines sont capables de se lier au domaine BIR2 et 3 de XIAP ou c-IAP1 et 2 par leur motif térapeptide AVPI (Alanine-Valine-Proline-Isoleucine) pour inhiber leur activité et lever ainsi l'inhibition des caspase et l'induction de l'apoptose (Liu et al., 2000). Cependant, la surexpression des IAP représente un véritable frein à l'activité des Smac/DIABLO et conduit à la résistance à l'apoptose dans plusieurs cancers. Ainsi, il a été démontré que la surexpression de la survivine induit une résistance à l'ABT-263 dans les cancers du sein.

II.9. Famille Bcl-2 et cancers : notion de “ Prime to death ”

La famille Bcl-2 est au sommet de la voie la plus altérée dans les cancers, l'apoptose. La dérégulation de cette famille est clairement reliée à l'apparition de cancers. L'étude menée par l'équipe de Beroukhim en 2010 dans laquelle un panel de plus de 3000 échantillons de tumeurs appartenant à 26 types histologiques différents ont été analysés pour leurs altérations moléculaires a permis de mettre en évidence environ 158 altérations somatiques. Parmi ces altérations, les amplifications des gènes *BCL2L1* (Bcl-x_L) et *MCL1* apparaissent très

fréquemment et suggèrent que les protéines encodées sont cruciales pour la survie des cellules cancéreuses (Beroukhim et al., 2010).

La protéine Bcl-x_L est fortement exprimée dans plusieurs cancers et cette expression est corrélée une résistance à 122 agents de chimiothérapie (Amundson, 2000). Elle est exprimée dans les cancers hématologiques (myélome multiple au stade avancé et récidivant) et solides comme dans les glioblastomes (Nagane et al., 1998), et dans les cancers de la prostate hormono-indépendants (Castilla et al., 2006). L’extinction de l’expression de Bcl-x_L par les petits ARNs interférents ou de son activité par l’utilisation de BH3-mimétiques tels que l’ABT-737 ou l’ABT-263 augmente l’apoptose induite par la chimiothérapie conventionnelle (Brotin et al., 2010 ; Dodier and Piché, 2006).

La surexpression de Mcl-1 a été observée dans plusieurs cancers solides, tels que le cancer du sein (Ding et al., 2007), de la prostate (Krajewska et al., 1996), des poumons (Song et al., 2005), et de l’ovaire (Shigemasa et al., 2002). Mcl-1 est également surexprimé dans les cancers hématologiques tels que les myélomes (Derenne et al., 2002) et les diverses leucémies (Andersen et al., 2005). Sa surexpression a été décrite comme un mécanisme de résistance à la chimiothérapie et est fréquemment associée à un mauvais pronostic. La déplétion de Mcl-1 par utilisation de siRNA ou des miRNA (Osaki et al., 2016 ; Cheng et al., 2016 ; Rao et al., 2013) conduit à la sensibilisation des cellules cancéreuses à la chimiothérapie. Inversement, la stabilisation de la protéine Mcl-1 par la deubiquitinase USP9X favorise la survie des cellules cancéreuses du lymphome folliculaire humain et de lymphome diffus à cellules B et provoque la résistance à l’ABT-737, un BH3-mimétique inhibiteur pharmacologique de Bcl-2/Bcl-x_L (Schwickart et al., 2010). Dans les cancers ovariens, notre équipe a également montré que le niveau de son expression était corrélé à la réponse à ce BH3-mimétique dans des échantillons de tumeurs ovariennes humaines exposés *ex vivo* (Lheureux et al., 2015).

Ainsi, la surexpression de Bcl-x_L et Mcl-1 dans les cellules cancéreuses permet l’échappement à l’apoptose. Cependant, cette caractéristique des cellules cancéreuses, fortement associée à la résistance aux traitements conventionnels, pourrait aussi représenter une opportunité thérapeutique exceptionnelle. En effet, le stress subi par les cellules cancéreuses lié aux nombreuses altérations moléculaires qu’elles présentent est susceptible de constituer un signal apoptotique majeur conduisant à l’activation des protéines BH3-only activatrices et des effecteurs Bax et Bak. La surexpression des protéines anti-apoptotiques

telles que Bcl-2, Bcl-x_L et Mcl-1 est donc un élément indispensable pour bloquer ce signal de mort, la survie de ces cellules devenant donc littéralement dépendante de la présence de ces protéines. Leur expression constitue donc un élément déterminant de la résistance à l'apoptose, mais constitue en même temps un point de fragilité remarquable puisque la simple inhibition de leur expression ou de leur activité est susceptible de provoquer la libération des protéines qu'elles séquestrent (BH3-only activateurs ou multi-domaines effecteurs) et de conduire de ce fait à la mort cellulaire par apoptose. Ce phénomène est appelé « priming », la cellule cancéreuse étant dite « préparée à la mort » (primed to death) (Figure 46) (Certo et al., 2006).

Les diverses stratégies en cours d'évaluation visant à inhiber l'expression des anti-apoptotiques, l'induction des BH3-only activateurs ou l'utilisation de molécules BH3-mimétiques capables d'inhiber l'activité des protéines anti-apoptotiques sont basées sur l'utilisation de ce point de fragilité des cellules cancéreuses, et leur mise en œuvre devrait permettre d'induire la mort par apoptose des cellules cancéreuses sans provoquer le moindre effet sur les cellules normales puisqu'elles ne sont pas « préparées à la mort » (Figure 46).

II.10. Bcl-x_L et Mcl-1 : un verrou moléculaire dans les cancers de l'ovaire

Les protéines Bcl-x_L et Mcl-1 sont fortement exprimées dans les cancers de l'ovaire et ont été associées à la chimiorésistance et à un mauvais pronostic (Marone et al., 1998 ; Liu et al., 1998 ; Shigemasa et al., 2002). Notre équipe a évalué l'inhibition deux à deux des différentes protéines anti-apoptotiques en utilisant des siRNA spécifiques. Cette expérience a permis de montrer que la sensibilisation des cellules cancéreuses ovariennes survient uniquement lorsque le couple Bcl-x_L/Mcl-1 est inhibé, et cela en absence de toute chimiothérapie (Brotin et al., 2010). Ainsi, les protéines Bcl-x_L et Mcl-1 forment un «verrou moléculaire» indispensable pour protéger les cellules cancéreuses ovariennes contre l'apoptose. Les cellules

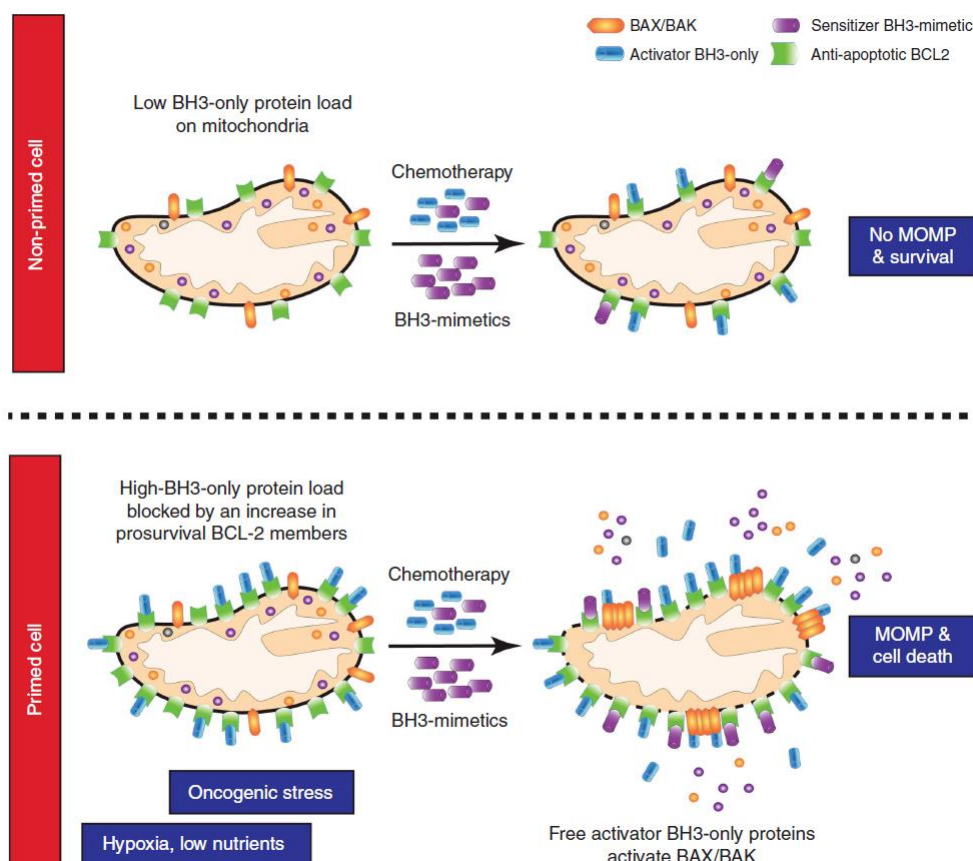


Figure 46 : Le modèle « Prime to death ».

Dans les cellules saines (panneau supérieur), la mitochondrie contient peu de protéines BH3-only et assez de protéines anti-apoptotiques pour les neutraliser en réponse à la chimiothérapie ou aux molécules BH3-mimétiques, empêchant ainsi la perméabilisation mitochondriale. En revanche, dans les cellules « primed to death », le stress oncogénique augmente l'expression des BH3-only qui sont piégés par les anti-apoptotiques au niveau de la membrane mitochondriale. L'exposition de ces cellules à un stress additionnel tel que la chimiothérapie qui augmente les BH3-only activateurs ou le traitement avec les BH3-mimétiques qui vont directement occuper la poche hydrophobe des anti-apoptotiques, résulte dans un excès de BH3-activateurs qui cause l'activation de Bax et Bak, la perméabilisation de la membrane mitochondriale et l'induction de l'apoptose (Lopez and Tait, 2015).

cancéreuses ovariennes sont donc « primed to death » par leur dépendance à ces deux protéines. Cette dépendance a également été montrée en combinant le cisplatine avec les petites molécules BH3-mimétique tel que HA14-1 et l'ABT-737 (Simonin et al., 2009 ; Simonin et al., 2013). Le cisplatine cible indirectement Mcl-1 (inhibition de son expression et augmentation des BH3-only) alors que les BH3-mimétique HA14-1 et ABT-737 inhibent Bcl-x_L en interagissant directement avec sa poche hydrophobe.

Le niveau d'expression de ces protéines dans les cellules cancéreuses ovariennes est très variable. Bcl-x_L est aussi bien exprimé dans les cellules constituant la tumeur solide

(Krajewska et al., 1996) que dans l'ascite de patientes (Liu et al., 1998). Néanmoins, le niveau d'expression de Bcl-x_L ne semble pas être lié à l'acquisition de résistance. En effet, dans notre unité, la comparaison du niveau d'expression de Bcl-x_L dans les cellules de carcinome ovariens sensibles au cisplatine (IGROV1, OAW42) vs résistantes (SKOV-3, IGROV1-R10) montre une expression équivalente (Villedieu et al., 2007). L'expression de la protéine Mcl-1 est, en revanche, assez différente. Elle est très fortement exprimée dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus normaux. Son expression est augmentée dans 85% des cancers, corrélée avec le stade avancé de la maladie et souvent associée au mauvais pronostic (Goncharenko-Khaider et al., 2012). La surexpression de Mcl-1 est impliquée dans le développement de chimiorésistance en réponse à plusieurs médicaments tel que le paclitaxel, vincristine ou la gemcitabine (Wertz et al., 2011). Mcl-1 est aussi un élément redoutable de résistance aux différentes molécules de thérapies ciblées telles que les inhibiteurs BH3-mimétiques de Bcl-x_L et de Bcl-2 (ABT-737, ABT-263 ou ABT-199) qui sont développés dans le chapitre suivant.

Partie III : Modulation de l'expression et de l'activité de la famille Bcl-2

III.1. Modulation par transfert de nucléotides

III.1.1. Oligonucléotides anti-sens

Les oligonucléotides anti-sens (OAS) sont des petites molécules d'ADN simple brin d'environ 20 nucléotides dont le rôle principal est de se fixer à l'ARN messager cible pour en empêcher la traduction (Jansen and Zangemeister-Wittke, 2002). Ces petits brins d'ADN pénètrent dans la cellule par endocytose. Une fois dans la cellule, les OAS se lient à leur ARNm et forment un duplexe ARNm/ADN par complémentarité. Ce complexe est alors reconnu par la RNase H, conduisant à la dégradation de l'ARNm ciblé (Figure 47) (Jansen and Zangemeister-Wittke, 2002). Les OAS peuvent également agir par d'autres mécanismes pour inhiber l'expression de leurs cibles, tels que l'inhibition de la transcription de l'ARNm, de son épissage ou de sa traduction en protéine.

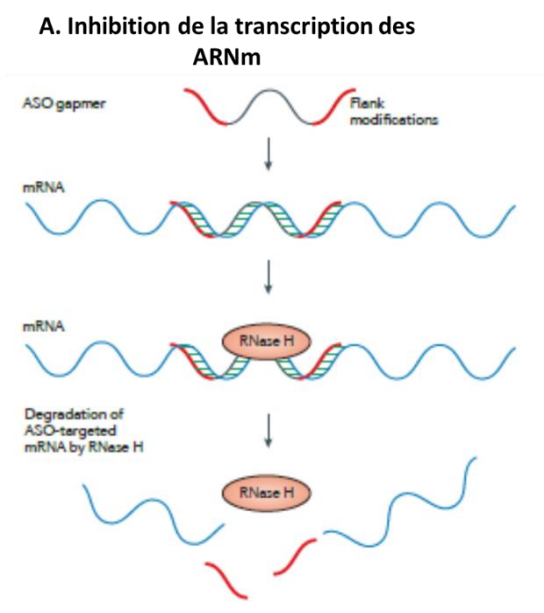


Figure 47 : Mécanisme d'inhibition de l'expression de l'ARNm par les OAS (D'après Kole et al., 2012).

Les stratégies utilisant les OAS mono ou bispécifiques de Bcl-2, Bcl-x_L (Jansen and Zangemeister-Wittke, 2002 ; Olie et al., 2002) et Mcl-1 (Thallinger et al., 2004) ont démontré des résultats *in vivo* prometteurs dans la restauration de l'apoptose et la re-sensibilisation à la chimiothérapie. En effet, le traitement par voie systémique des xénogreffes de mélanome avec des OAS en agent seul ou combiné avec la chimiothérapie conventionnelle telle que le dacarbazine a permis de réduire significativement l'expression de Mcl-1 dans ces tumeurs et de les re-sensibiliser à la chimiothérapie (Thallinger et al., 2004). La contrainte de ce genre

de thérapie est due aux propriétés pharmacologiques peu favorables des OAS et à leur grande instabilité intracellulaire. Cependant, divers travaux ont été menés pour apporter des modifications chimiques, principalement au niveau du squelette nucléotidique, afin de favoriser leur stabilité et leur affinité pour leurs cibles. Par exemple, l'introduction d'une liaison phosphorothioate inter-nucléotides suivie de modifications des nucléotides par apport de groupements 2-O-méthyle au niveau des extrémités 3' et 5' protègent les OAS de la dégradation par les nucléases et améliorent leur stabilité intracellulaire. Ainsi est synthétisé le Fomivirsén en 1998, un médicament pour la rétinite induite par le cytomégalo virus chez les personnes immunodéprimées atteintes du SIDA. Ce médicament est injecté en intraoculaire et a démontré des résultats très prometteurs qui lui ont permis d'être commercialisé. Cependant, différentes toxicités sont liées à ces modifications chimiques telles qu'une augmentation de la coagulation, un effet pro-inflammatoire ainsi que l'activation d'une réponse immunitaire (Kole et al., 2012).

Dans le domaine de l'oncologie, certains composés sont actuellement en essais cliniques. Cependant, les premiers résultats ne sont pas très encourageants. Parmi ces composés, l'Oblimersén est un OAS qui cible l'ARNm de la protéine Bcl-2. Ce composé a été développé par Genta comme un potentiel médicament anticancéreux. Cette molécule a extensivement été testée en clinique depuis 1999 sans succès. Parmi ces essais, l'étude clinique « AGENDA » portant sur l'effet de l'Oblimersén (G3139) en agent seul ou en association avec la Dacarbazine pour le traitement des patients atteints de mélanome au stade avancé n'a pas démontré d'amélioration dans la survie de ces patients et n'a pas amélioré leur réponse au Dacarbazine (Bedikian et al., 2014). De plus, cette étude a également révélé de graves effets secondaires sous forme de toxicité hématologique de type thrombocytopénie et neutropénie chez les patients traités par cette association. Ces toxicités ne semblent pas avoir de lien avec l'inhibition des cibles car les thrombocytes sont plutôt dépendants de Bcl-x_L que de Bcl-2 (Qi and Hardwick, 2007). L'intérêt de l'utilisation des OAS en clinique n'a donc pas été très convaincant.

III.1.2. ARN interférences

Une autre stratégie permettant la dégradation d'un ARNm cible spécifique consiste à utiliser des petits ARNs interférents (ARNi) non codant composés de 21 à 22 paires de bases. Leur rôle principal est de participer à la régulation génique, au contrôle du métabolisme cellulaire, au maintien de l'intégrité du génome et à la défense vis-à-vis des éléments étrangers tels que

les virus. Il existe deux grandes classes d'ARN interférents sur lesquelles je vais me focaliser: les siARN (small interferent RNA) et les miARN (micro-RNA). Il existe d'autres catégories d'ARN interférents tels que les shARN (short hairpin RNA), pi-ARN, Exo-siARN.

Les siARN sont des petits ARN issus de longs ARN doubles brins transformés par l'ARNase de type III Dicer. Une fois formés, les siARN assurent la dégradation des transcrits dont ils sont complémentaires. Ce mécanisme de formation des siARN intervient dans le processus physiologique de défense contre les virus. Dans le laboratoire, les siARN synthétiques sont directement introduits dans la cellule par un véhicule afin d'assurer l'inhibition de l'expression d'un ARN messager cible. Ils sont caractérisés par une grande spécificité, une bonne efficacité dans la dégradation des ARNm des cellules en culture.

Les miARN sont des ARNs issus de transcrits endogènes comportant une structure tige-boucle ou épingle à cheveux appelés ARN primaire ou pri-miARN. Le pri-miARN est ensuite maturé en miARN par deux clivages séquentiels réalisés par des ARNases de type III. Le premier clivage est assuré par la protéine nucléaire Drosha qui génère le pré-miARN alors que le second est réalisé par Dicer.

Le petit ARN double brin (siARN ou miARN) ainsi formé est ensuite incorporé dans le complexe RISC (RNA-inducing silencing complex). Cette incorporation est réalisée par la protéine Dicer et ses partenaires : TRBP (TAR RNA binding protein) et PACT (PKA activating protein), le tout formant le complexe RLC (RISC-loading complex) (Figure 48). Le petit ARN est ensuite transféré de RLC vers la protéine Ago pour constituer le pré-RISC. Dans cette étape les deux brins du petit ARN sont alors déroulés et séparés en un brin sens « guide » et un brin antisens « passager ». Le brin guide est pris en charge par la protéine Ago pour former le complexe RISC fonctionnel ou mature capable de reconnaître l'ARNm par complémentarité de base. Alors que le brin passager, non actif est clivé par Ago et dégradé par la suite (de Fougères et al., 2007).

Les petits ARN sont des outils expérimentaux essentiels dans les études de la fonction et de l'implication d'une protéine dans un processus pathologique ou en réponse au traitement (Kole et al., 2012). Par exemple, la répression de l'expression de Bcl-x_L et Mcl-1 en utilisant des siARN a permis à notre équipe de mettre en évidence la dépendance des cellules cancéreuses ovariennes à ces deux protéines et suggérer la pertinence de les cibler concomitamment pour sensibiliser ces cellules à l'apoptose (Brotin et al., 2010). Notre équipe a également démontré que le miARN491-5p induit une apoptose massive dans les cellules

cancéreuses ovariennes en inhibant l'expression de Bcl-x_L et du récepteur EGFR. L'inhibition de l'expression de ce dernier conduit à l'inhibition des voies AKT et MAPK, permettant ainsi l'induction de Bim (Denoyelle et al., 2014). Par ailleurs, l'expression des mi-ARN est souvent associée à des maladies cancéreuses telles que le cancer des poumons, du sein et certaines leucémies. Ils peuvent être utilisés comme marqueur pronostic, de diagnostic et constituer de nouvelles cibles thérapeutiques

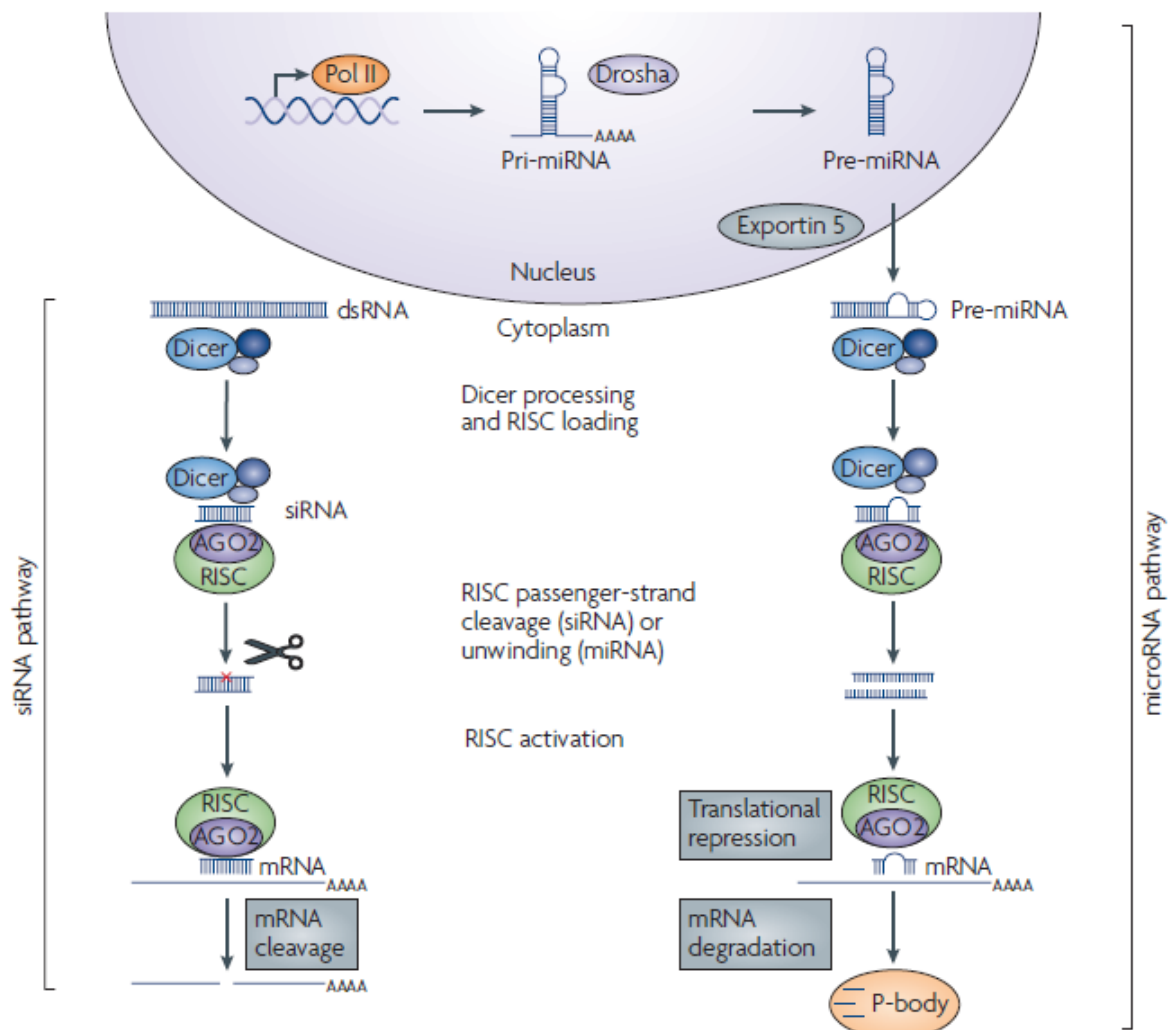


Figure 48 : Mécanisme d'action des ARNs interférents dans les cellules mammifères.

La voie des ARN interférents est orchestrée par des petits ARNs impliquant les petits ARN interférents (siRNA) et les micro-ARNs (miRNA) (d'après de Fougérolles et al., 2007).

En dépit de leur efficacité *in vitro* et dans quelques essais cliniques menés dans certaines pathologies, l'avenir thérapeutique de ces petits ARNs est pour l'instant très incertain, notamment du fait leur instabilité systémique, de leur faible pénétration cellulaire, de leur biodisponibilité hétérogène et de leur immunogénicité. Pour leur utilisation clinique, ces outils nécessitent une vectorisation efficace qui n'est actuellement pas encore adaptée à l'oncologie, laissant la communauté scientifique et médicale très prudente quant au potentiel thérapeutique de ces outils (Kole et al., 2012).

III.2. Modulation par les voies de signalisation

Les voies de signalisation sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires qui dictent le devenir de la cellule. Les voies PI3K/AKT/mTOR et MAPK/ERK, interagissent entre elles et jouent un rôle essentiel dans la cellule pour la promotion de la survie et de la prolifération notamment *via* la régulation de l'expression ou de l'activité des protéines de la famille Bcl-2 (Figure 49).

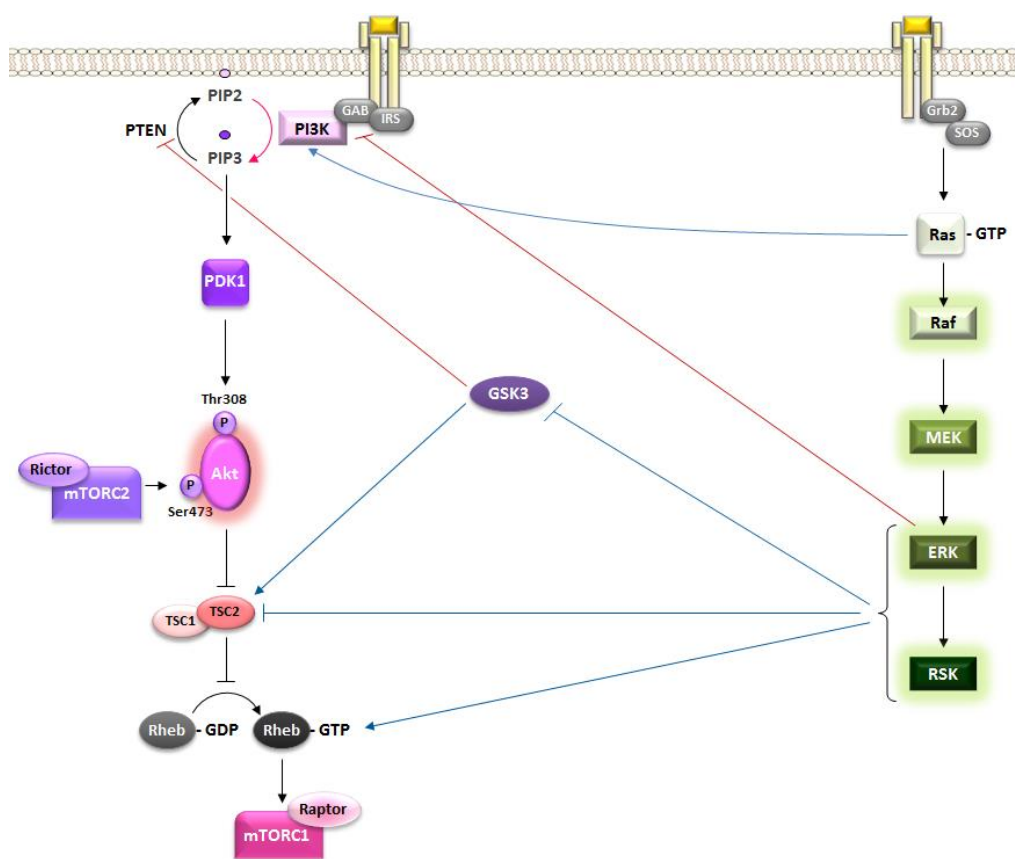


Figure 49 : Exemples d'interactions permettant à la voie MAPK/ERK de réguler la voie PI3K/Akt/mTOR. Les traits bleus correspondent aux interactions qui permettent d'induire la voie PI3K/Akt/mTOR et les traits rouges correspondent aux interactions qui l'inhibent.

Elles sont dérégulées dans plus de la moitié des cancers ovariens séreux de haut grade. L'inhibition de ces voies de signalisation semble donc être une approche pertinente pour inhiber l'expression ou l'activité de ces protéines et décider ainsi du devenir de la cellule. (Gruosso et al., 2015), d'autant qu'un nombre important d'inhibiteurs de ces voies sont actuellement en développement clinique.

III.2.1 Impact de la voie PI3K/AKT/mTOR sur l'expression de la famille Bcl-2

La voie PI3K/AKT/mTOR est impliquée dans plusieurs processus cellulaires tels que la prolifération, la survie, le métabolisme, la migration, l'angiogenèse, la chimiorésistance et l'instabilité génomique (Mabuchi et al., 2015). Cette voie est activée par les récepteurs tyrosine kinase stimulés par les facteurs de croissance et les cytokines. Elle fait intervenir trois protéines principales qui sont activées dans l'ordre chronologique suivant ; la PI3K (Phosphoinositide-3-Kinase), la protéine AKT (appelée aussi Protéines Kinase B (PKB)) et la protéine mTOR (mammalian Target Of Rapamycine). Ces protéines sont dotées d'une activité kinase qui permet d'apporter à leurs cibles une phosphorylation de type activatrice ou inhibitrice en fonction du contexte cellulaire).

En réponse aux signaux extracellulaires, la protéine PI3K est activée permettant la phosphorylation du phosphatidylinositol 4, 5-biphosphate (PIP2) et génère le phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate (PIP3) (Thorpe et al., 2015), conduisant au recrutement et à la phosphorylation d'AKT. Cette dernière est la cible de plusieurs régulations et est responsable de l'inhibition de la kinase glycogène synthase-3 (GSK-3) empêchant l'ubiquitination et la dégradation de Mcl-1 et de l'inhibition des facteurs de transcription tels que p53 et Foxo-3a entraînant la répression de l'expression des protéines pro-apoptotiques BH3-only Bim, Noxa et Puma (Laplanche and Sabatini, 2012 ; Manning and Cantley, 2007). Elle est aussi capable d'activer CREB (c-AMP response Element-binding protein) qui favorise la transcription de Mcl-1. AKT active mTOR de manière directe ou indirecte en passant par l'inhibition du complexe TSC1/2 (Laplanche and Sabatini, 2012). L'activation de m-TORC1 conduit à la phosphorylation activatrice du facteur de la traduction S6K-1 (S6 Kinase-1 appelé aussi P70S6K) et à la phosphorylation inactivatrice du facteur de répression de la traduction 4EBP-1 (4E Binding Protein-1) responsable de l'induction de la synthèse de la protéine Mcl-1 (Figure 50) (Jin et al., 2012 ; Coloff et al., 2011 ; Hsieh et al., 2010).

La voie PI3K/AKT/mTOR a fait l'objet du développement de plusieurs inhibiteurs pharmacologique afin de cibler les altérations responsables de l'apparition des maladies cancéreuses. L'inhibition de cette voie consiste en l'inhibition des 3 principaux facteurs à savoir PI3K, AKT et mTOR (Figure 50). La protéine PI3K est ainsi inhibée par les molécules suivantes : BKM120, GDC-0941, BAY80-6948 et PX-866. Ces inhibiteurs agissent sur toutes les isoformes de la PI3K sauvage ou porteuses de mutations (Dienstmann et al., 2014). D'autres inhibiteurs sont plus spécifiques aux différents isoformes des protéines PI3K. Par exemple, l'AZD8186 et le GSK263601 ciblent spécifiquement la sous-unité p110 α , fréquemment altérée dans les cancers. Ces derniers sont en essai clinique de phase I et II pour le traitement des cancers solides déficients en PTEN (Thorpe et al., 2015). En raison de l'implication de cette sous-unité dans le métabolisme, la majeure partie des toxicités liées à cette inhibition est une hyperglycémie (LoRusso, 2016). D'autre part, il existe des inhibiteurs qui sont spécifiques à la sous-unité p110 δ tels que TGR-1202, AMG-319 et GS-1110 (idelalisib). Ce dernier est utilisé en clinique en monothérapie pour le traitement des cancers de lymphome folliculaire ou en bithérapie avec le rituximab pour le traitement des leucémies lymphoïdes chroniques. Cette sous-unité étant impliquée dans le système immunitaire, son inhibition provoque une toxicité hématologique (Dienstmann et al., 2014).

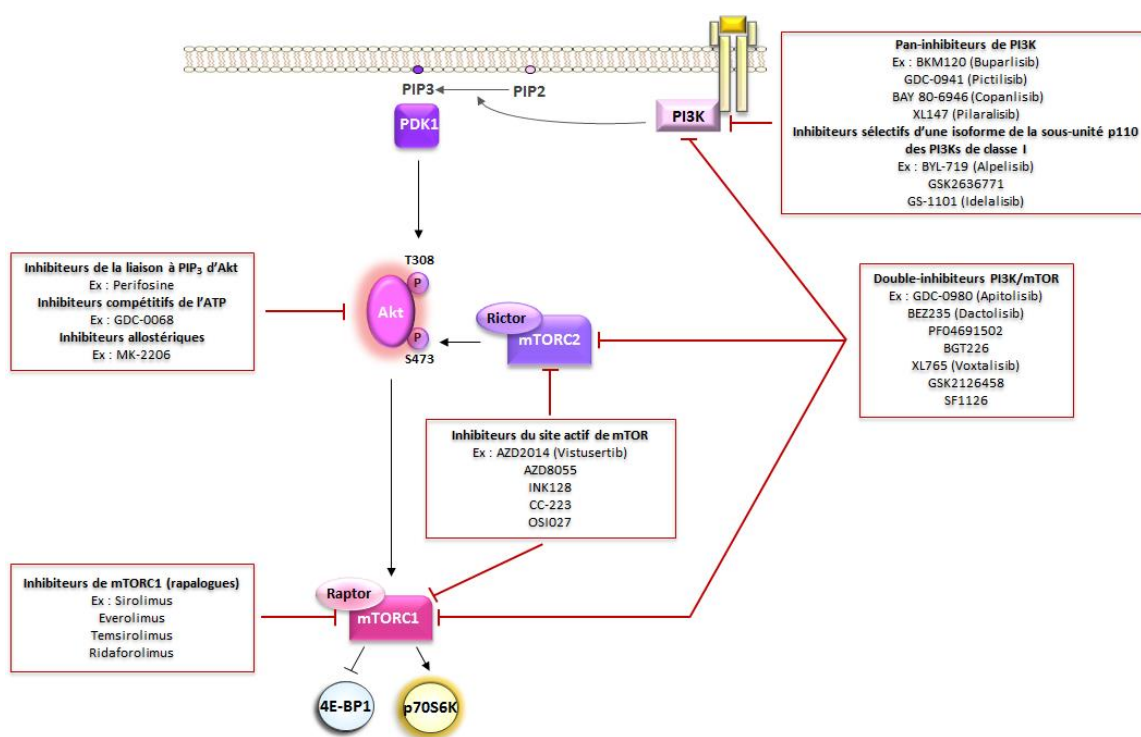


Figure 50 : Exemples de molécules ciblant des protéines de la voie PI3K/Akt/mTOR.

L'inhibition d'AKT constitue également une des stratégies de modulation des membres de la famille Bcl-2. Parmi les inhibiteurs les plus connus, se trouvent le GSK2110183, GSK2141795 et l'AZD-5363. Ces derniers ont démontré une activité antiprolifératives et anti-tumorale sur plusieurs cancers de l'ovaire *in vivo* (Altomare et al., 2010). Ils sont également en essai clinique en mono ou bithérapie avec d'autres molécules pour le traitement des cancers de l'ovaire. AKT est également inhibé par MK-2206 qui l'empêche de phosphoryler ses partenaires. Son efficacité antiproliférative a été établie sur plusieurs lignées cancéreuses, notamment celles des cancers de l'ovaire où il sensibilise *in vivo* et *in vitro* à d'autres agents dérivés du platine et de taxanes.

La voie PI3K/AKT/mTOR peut également être ciblée en aval *via* l'inhibition de la protéine mTOR. Cette dernière est inactivée par l'utilisation d'inhibiteurs tels que la rapamycine et ses dérivées, « les rapalogues », qui bloquent le site de fixation de Raptor et inhibent ainsi le complexe mTORC1 (Moshetta et al., 2014). Ces inhibiteurs ont une action cytostatique sur plusieurs lignées cancéreuses dont celle des cancers de l'ovaire et sensibilisent à la chimiothérapie à base de platine (Mabuchi et al., 2015). Néanmoins, l'expression de mTORC2 limite l'efficacité de ces molécules. Pour y remédier, des inhibiteurs du site actif de mTOR tel que les asTORis sont capable d'inhiber à la fois mTORC1 et mTORC2 et montrent une plus grande efficacité que les rapalogues (Laplane and Sabatini, 2012). Parmi ces inhibiteurs, l'AZD5055 a exhibé un effet antiprolifératif sur les cellules de plusieurs types de cancers et une activité anti-tumorale chez les souris porteuses de xénogreffes de cellules tumorales issues des cancers solides ou hématologiques (Chresta et al., 2010 ; Willems et al., 2012).

Par ailleurs, l'inactivation concomitante de PI3K et mTOR grâce à un inhibiteur agissant sur les deux protéines, le NVP-BEZ235, permet d'inhiber de manière plus efficace cette voie de signalisation. Notre unité a démontré que cette molécule sensibilise les cellules cancéreuses ovariennes chimiorésistantes à l'apoptose induite par l'ABT-737 en inhibant l'expression de Mcl-1 et induisant celle de Puma (Jebahi et al., 2014).

III. 2.1. Impact de la voie MAPK/ERK sur l'expression de la famille Bcl-2

La voie MAPK/ERK est aussi impliquée dans la régulation de la famille Bcl-2. L'activation des récepteurs tyrosines kinases par différents stimuli extracellulaires conduit à une cascade de phosphorylations activatrices aboutissant à l'activation de MEK1/2 qui phosphoryle et active à son tour ERK1/2 (Fey et al., 2016). Une fois activée, ERK phosphoryle une variété de substrats cytoplasmiques ou nucléaires. Ainsi, elle induit l'activation du facteur de transcription Elk-1 (E26 transformation-specific-like transcription factor 1) qui, en étant complexée avec la protéine SRF (Serum Response Factor), se lie au promoteur de Mcl-1 et induit sa transcription (Craig, 2002). ERK favorise aussi la stabilité de Mcl-1 en la phosphorylant directement sur sa Thr⁶⁹ ou bien en inhibant son ubiquitination et sa dégradation par GSK-3 β . Elle contrôle également les protéines pro-apoptotiques BH3-only ; par exemple, ERK est capable d'affecter directement Bim en le phosphorylant sur la Ser⁶⁹, conduisant à son ubiquitination et à sa dégradation par le protéasome (Ewings et al., 2007 ; Ewings et al., 2007b). ERK peut aussi agir sur les facteurs de transcription p53 et Foxo-3a, réprimant ainsi la transcription de la majorité des BH3-only tels que Bim, Puma et Noxa (Zhang et al., 2010 ; Yang et al., 2008).

La modulation des altérations de la voie MAPK/ERK est également effectuée à plusieurs niveaux en utilisant un panel d'inhibiteurs (Figure 51). L'inhibition de la protéine MEK a été assurée en utilisant des inhibiteurs tels que le Selumetinib et le Tramétinib. Ce dernier a été approuvé par la FDA en 2013 et il a obtenu son autorisation de mise sur le marché en 2014 pour le traitement des mélanomes avec une mutation BRAF. Étant donné qu'ERK est le seul substrat de MEK, ERK bénéficie de l'inhibition de MEK. Le Selumetinib présente une forte activité antiproliférative dans le modèle des cancers de l'ovaire de haut grade (Gruosso et al., 2015). Il a montré un intérêt dans le traitement des cancers de l'ovaire séreux de haut grade arborant des mutations *KRAS*.

Notre unité a montré que l'inhibition des deux voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et MAPK/ERK en utilisant la double combinaison AZD-8055/Tramétinib sensibilise les cellules cancéreuses ovariennes chimiorésistantes à l'ABT-737. Cet effet est le résultat de la diminution de l'expression de Mcl-1 et l'induction de la protéine BH3-only Bim non phosphorylée (Pétigny-Lechartier et al., 2017)

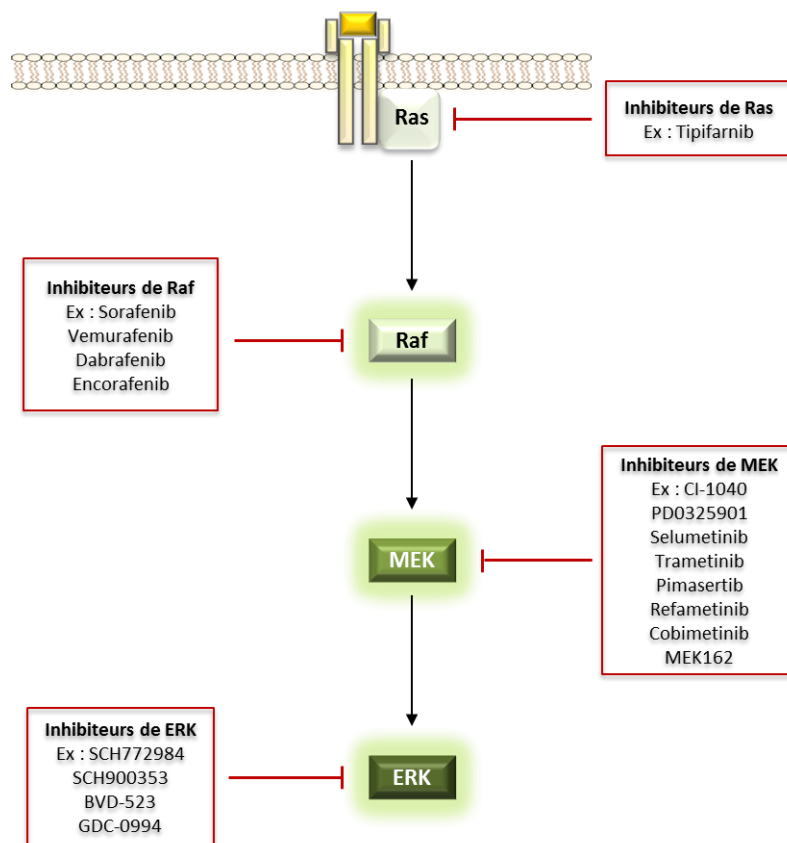


Figure 51 : Exemples de molécules ciblant les différents éléments de la voie MAPK/ERK

La stratégie visant à moduler les protéines de la famille Bcl-2 en ciblant les voies de signalisation qui régulent leur expression, leur stabilité ou leur dégradation, est une stratégie très pertinente à utilisation clinique très large. Cependant cette stratégie nécessite une combinaison médicamenteuse afin de pouvoir inhiber les différentes voies responsables de l'expression d'une seule protéine telle que Mcl-1. Par ailleurs la combinaison de plusieurs médicaments est à l'origine de toxicités cumulées ne pouvant pas être tolérées pour les patients.

III.3. Inhibition pharmacologique directe de l'activité des protéines anti-apoptotiques par utilisation de molécules BH3-mimétiques

III.3.1. Développement des BH3-mimétiques

En raison de l'importance des protéines anti-apoptotiques dans la progression et la résistance des cancers, il est devenu urgent de développer des stratégies visant à moduler leur activité et contrecarrer leur action anti-apoptotique. L'établissement de la structure du domaine BH3 et de son profil d'interaction avec les protéines anti-apoptotiques a été le point de départ de la conception de petites molécules dont l'activité est similaire à celle des BH3-only. Ces molécules sont qualifiées de « BH3-mimétiques », leur action étant similaire à celle du domaine BH3 : elles projettent des substitutions latérales qui miment les chaînes latérales de l'hélice α du domaine BH3 grâce auxquelles elles occupent les poches hydrophobes des anti-apoptotiques et inhibent leur activité (Figure 52). Deux catégories de BH3-mimétiques peuvent être distinguées : les peptides stabilisés issus des BH3-only ou les molécules synthétiques. Les BH3-mimétiques sont incapables d'activer directement les effecteurs de l'apoptose, leur rôle principal étant d'empêcher la séquestration des protéines BH3-only activatrices (Figure 52, modèle 1) ou leurs partenaires effecteurs (Figure 52, modèle 2) de la poche hydrophobe des anti-apoptotiques (Dai et al., 2016).

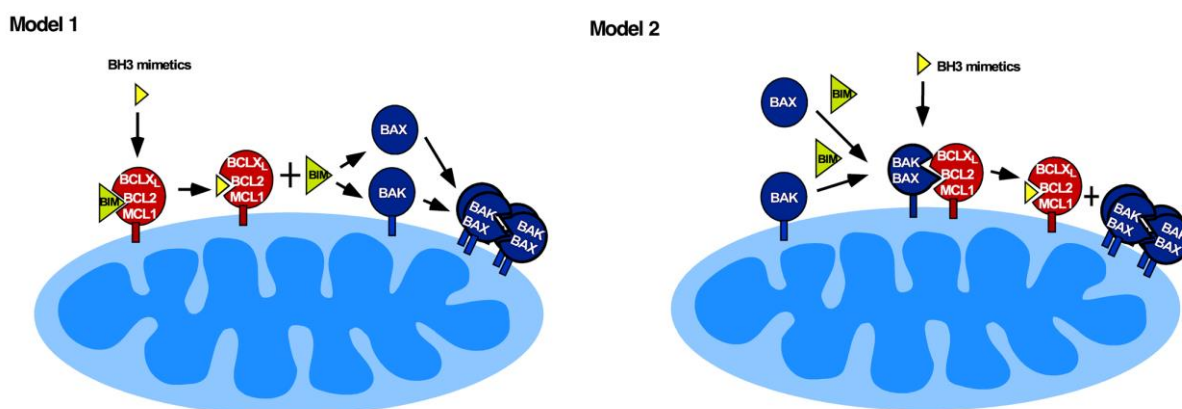


Figure 52 Mode d'action des BH3-mimétique au niveau de la mitochondrie (Dai et al., 2016).

L'idée de développer des BH3-mimétiques a été soutenue par la communauté scientifique pour différentes raisons. En premier lieu, la modulation des anti-apoptotiques utilisant des BH3-mimétiques semblerait plus efficace que la régulation en amont des voies de signalisation qui sont fréquemment l'objet d'altérations oncogéniques. En second lieu, le domaine BH3 se lie à la poche hydrophobe des anti-apoptotiques avec une affinité suffisante pour inhiber leur partenaire et rétablir ainsi l'apoptose (Baell and Huang, 2002). En troisième lieu, la taille d'un domaine BH3 est comprise entre 14-24 acides aminés, permettant ainsi des études structurales afin d'identifier de nouvelles molécules. Par ailleurs, les cellules cancéreuses expriment un fort niveau de certaines protéines anti-apoptotiques auxquelles elles deviennent dépendantes. L'inhibition de ces protéines pro-survie par les BH3-mimétiques permet de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses « primed to death » parmi les autres cellules, tel que présenté plus haut, et de limiter ainsi les effets « off-target » (Zhang et al., 2007). Enfin, il est admis que le domaine BH3 manifeste une sélectivité différentielle dans son interaction avec ses partenaires, ce qui suggère qu'un BH3-mimétique pourrait être conçu pour interagir avec un seul type de protéine à laquelle les cellules cancéreuses sont dépendantes. Cette interaction spécifique et sélective limite ainsi la toxicité liée à l'inhibition d'autres protéines. L'équipe de Colman a défini quatre critères pour qualifier une molécule de BH3-mimétique. Cette dernière doit se prévaloir ; **i)** d'une activité biologique dépendante de Bax et Bak, caractérisée par une inhibition de l'induction de l'apoptose induite par la molécule en absence de Bak et Bax, **ii)** d'une affinité d'interaction avec un ou plusieurs partenaires anti-apoptotiques de l'ordre du nanomolaire, **iii)** d'une cytotoxicité corrélée avec le niveau d'expression de la protéine cible et enfin, **iv)** d'une toxicité liée aux protéines inhibées après administration de ces BH3-mimétiques au modèle animal telle qu'une thrombocytopénie provoquée par l'inhibition de Bcl-x_L (Qi and Hardwick, 2007) et une lymphocytopénie induite par l'inhibition de Bcl-2 (Veis et al., 1993). A l'heure actuelle, aucun effet secondaire spécifique consécutif à l'inhibition de Mcl-1 n'a été identifié car aucun inhibiteur pour cette protéine n'a franchi les essais cliniques (Lessene et al., 2008).

III.3.2. Les différentes catégories des BH3-mimétiques

III.3.2.1. Les peptides

Les études d'interaction protéine-protéine ont précédemment démontré qu'un petit fragment du domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques suffisait pour interagir avec la poche hydrophobe des anti-apoptotiques (Sattler et al., 1997 ; Day et al., 2005), cette interaction

étant similaire à celle réalisée par la protéine entière (Sattler et al., 1997). Ainsi, l'utilisation de petits fragments peptidiques issus du domaine BH3 pour inhiber les partenaires anti-apoptotiques constitue une stratégie intéressante. Ces peptides, non nécessairement hydrophobes, sont capables d'interagir efficacement avec la poche de leur partenaire, en profondeur ou superficiellement. Cependant, ils souffrent de plusieurs inconvénients pharmacologiques : leur instabilité et leur difficulté à passer les membranes cellulaires limitent leur utilisation. Pour remédier à ces obstacles, différentes stratégies ont été employées pour améliorer leur affinité d'interaction (en stabilisant leur conformation hélicoïdale et leur stabilité vis-à-vis de la protéolyse). C'est dans ce but qu'ont été développés les peptides α/β et les peptides stabilisés.

III.3.2.1.1. Les peptides α/β

Ces peptides sont issus du domaine BH3 des pro-apoptotiques dans lesquels des acides β -aminés sont incorporés (Johnson et al., 2012). Ces oligomères contiennent à la fois des résidus d'acides α - et β -aminés. Le nombre de résidus β est suffisamment faible pour laisser le peptide adopter une conformation en hélice α , mais suffisamment élevé pour interférer avec l'activité des protéases (Peterson-Kaufman et al., 2015). La conformation hélicoïdale de ces peptides est maintenue par une conception de séquence de type $\alpha\beta\alpha\alpha\alpha\beta$ pour permettre leur reconnaissance par leur cible. Cette approche a permis de générer des peptides α/β de Bim et de Puma (Boersma et al., 2012 ; Smith et al., 2013). Le peptide α/β du BH3 de Puma contient toutes les liaisons covalentes retrouvées dans le domaine BH3 de Puma qui maintiennent son interaction avec ses partenaires. En plus de cette similitude structurelle, l'oligomère α/β de Puma conserve son affinité pour Bcl-x_L, Bcl-2 et Bcl-w. Néanmoins, son affinité pour Mcl-1 a diminué de 50 fois (Lee et al., 2011). Ce foldamère a également échoué dans l'induction de la mort des fibroblastes embryonnaire murins qui expriment Bcl-x_L et Mcl-1, contrairement au peptide BH3 de Puma (Willis et al., 2005). Récemment, l'équipe de W. Douglas Fairlie a démontré que la substitution de 3 acides α -aminés dans le précédent foldamère a permis d'augmenter de 250 fois l'affinité du peptide α/β de Puma pour Mcl-1 (Smith et al., 2013). De la même manière, la substitution des acides β -aminés du peptide α/β du BH3 de Bim par des acide β -aminé cycliques permet de générer un ligand résistant à la protéolyse et d'augmenter la reconnaissance avec Bcl-x_L et Mcl-1 (Peterson-Kaufman et al., 2015). Ce type de stratégie offre un avenir pour le développement de peptides BH3-mimétiques très sélectifs et structurellement plus stables.

III.3.2.1.2. Les peptides stabilisés

Les peptides stabilisés, désignés par SAHB « Stabilized α -Helices of Bcl-2 domain », sont des peptides issus du domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques stabilisés par incorporation d'une liaison covalente entre deux acides aminés situés sur la même face de l'hélice α (Walensky et al., 2004). Cette stratégie de stabilisation permet de conserver la conformation hélicoïdale de l'hélice α mais également de renforcer la liaison du peptide à sa cible (Okamoto et al., 2013). Le premier peptide stabilisé qui a été synthétisé est le peptide Bid SAHB_A. D'autres peptides ont été développés à partir du domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques BH3-only telles que Bim SAHB et Noxa SAHB (Beekman and Howell, 2016). Bim SHAB_A, désignée par A, est stabilisé par une double liaison carbonée entre les acides aminés en position i et $i+4$ (correspondant aux acides aminés 154 et 158). Il est parmi les peptides les plus puissants. Sa stabilité conférée par la double liaison carbone a permis d'améliorer ses propriétés biologiques et pharmacologiques tout en conservant son affinité pour ses partenaires (Edwards et al., 2015). Ce peptide a démontré une remarquable activité cytotoxique envers plusieurs lignées cancéreuses leucémiques résistantes à l'ABT-737. Il a également démontré une activité anti-tumorale et a réduit de 50% la progression des tumeurs leucémiques *in vivo* (LaBelle et al., 2012). De manière intéressante, ces peptides sont capables de déplacer les effecteurs et leurs activateurs de la poche hydrophobe des anti-apoptotiques mais également d'activer directement Bax/Bak et de permettre leur oligomérisation (Figure 53) (LaBelle et al., 2012). Des peptides stabilisés issus du domaine BH3 des anti-apoptotiques, tels que Mcl-1 SAHB, ont également été développés. Ce dernier représente actuellement l'inhibiteur le plus puissant et le plus sélectif de Mcl-1 et est utilisé comme sonde pour l'identification de nouveaux inhibiteurs sélectifs de Mcl-1 lors des tests de screening (Stewart et al., 2010).

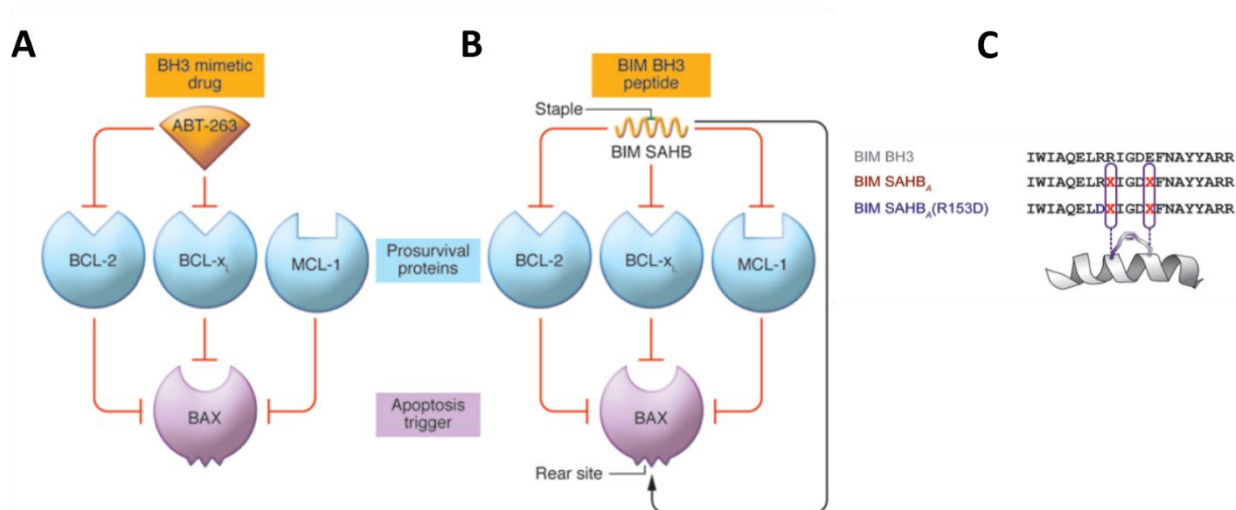


Figure 53 : Stratégie de sensibilisation des cancers hématologiques résistants aux inhibiteurs pharmacologiques par l'utilisation de molécules BH3-mimétiques.

(A) l'ABT-263 et (B) des peptides stabilisés (Bim SAHB). (C) Composition des séquences du BH3 de Bim, de Bim SAHB_A et de Bim SAHB_A (R153D) (D'après LaBelle et al., 2012 et (Adams, 2012).

L'efficacité de ces peptides *in vitro* ainsi qu'*in vivo* a été démontrée à plusieurs occasions. Ainsi, ces molécules ont été utilisées avec succès pour surmonter la résistance aux inhibiteurs pharmacologiques actuellement en clinique tels que l'ABT-263 induite par l'expression de Mcl-1 (Adams, 2012). Cependant, des études récentes ont démontré qu'ils présentaient certains inconvénients limitant leur utilisation. Okamoto et ses collègues ont démontré que la stabilité accrue de ces peptides leur fait perdre leur affinité envers leurs partenaires et qu'ils ne permettent pas l'induction d'une mort rapide des cellules traitées, suggérant une perméabilité lente et faible (Okamoto et al., 2013). En revanche, le peptide Bim SAHB, très efficace contre diverses lignées cellulaires, ne déclenche pas la mort de fibroblastes murins immortalisés à l'instar de la surexpression de Bim ou du traitement avec l'ABT-737 en absence de Mcl-1 (Adams, 2012). Enfin, le traitement des souris dotées d'un compartiment hématopoïétique reconstitué de cellules déficientes en Bim (*BIM*^{-/-}) induit la mort seulement d'une partie des lymphocytes B mais ne rétablit pas l'hypertrophie de la rate provoqué par l'absence de Bim (Adams, 2012). Tous ces résultats rejoignent les précédentes observations d'Okamoto sur l'incapacité de ces peptides à traverser la membrane cellulaire et à garder leur activité après encapsulation. A notre connaissance, aucune étude n'a pour l'instant démontré l'efficacité de ces peptides dans les tumeurs solides.

III.3.2.2. Les petites molécules BH3-mimétiques

Au cours de ces dernières années, des études intensives ont été menées dans le domaine du développement et de l'identification de nouvelles molécules ayant un comportement BH3-mimétiques pour inhiber et contrecarrer l'activité anti-apoptotiques des membres de la famille Bcl-2. Ces petites molécules se présentent sous forme de molécules naturelles ou synthétiques issues de différents criblages de banques de molécules. Ces molécules présentent l'avantage d'avoir une synthèse relativement facile et peu coûteuse par rapport à celle des peptides, et de s'affranchir des problèmes de pénétration cellulaire rencontrés avec les peptides. Deux catégories sont distinguées parmi ces molécules : les pan-inhibiteurs et les inhibiteurs sélectifs.

III.3.2.2.1. Les pan-inhibiteurs

Ces molécules présentent un large spectre d'activité. Elles sont censées être capable d'interaction avec plusieurs partenaires anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 avec une affinité plus ou moins importante. Quelques-unes des molécules les plus importantes sont présentées ci-dessous.

III.3.2.2.1.1. Le (-)-gossypol (AT-101) et ses dérivés

C'est un produit naturel retrouvé dans le coton. Le gossypol (Figure 54) se présente sous deux formes (+) ou (-) dont la première seulement (+) est active. La forme active du gossypol a été utilisée comme contraceptif masculin réversible.

Cependant, la forme non active (-)-gossypol (ou AT-101), a démontré un effet antiprolifératif et cytotoxique sur les cellules cancéreuses, et a donc été développée en tant que composé anticancéreux. Cette petite molécule se lie à la poche hydrophobe de Bcl-2, Bcl-x_L et Mcl-1 avec une affinité de l'ordre du micromolaire et régule ainsi leur

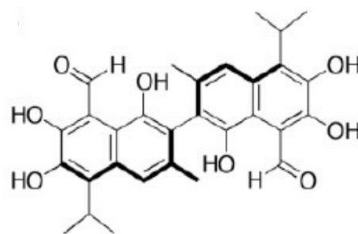


Figure 54 : Structure chimique du (-)-gossypol (AT-101).

activité (Khaw et al., 2011). L'étude de l'interaction protéine-protéine en utilisant la technique de transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET) a démontré que le (-)-gossypol déplace Bax et Bad de la poche hydrophobe de Bcl-x_L (Lessene et al., 2008 ; Meng et al., 2008). Il module aussi l'expression génique des membres de la famille Bcl-2 en diminuant l'expression des anti-apoptotiques et augmentant celle des protéines pro-apoptotiques (Huang et al., 2006 ; Meng et al., 2008). Le (-)-gossypol interagit aussi avec d'autres partenaires

cellulaires tels que la calréticuline, la lactate déshydrogénase et la glutathionne transférase (Baumgrass et al., 2001). Il induit l'apoptose dans plusieurs lignées cellulaires de manière dépendante de Bax et Bak. L'activité cytotoxique du (-)-gossypol a été évaluée dans plusieurs cancers solides tels que le cancer de la prostate (Huang et al., 2006), de la tête et de la nuque (cellules HNSCC) (Oliver et al., 2004), mais également dans les cancers hématologiques tels que les leucémies et les lymphomes (Balakrishnan et al., 2009). Il est connu que le (-)-gossypol induit l'expression de Puma et Noxa qui sont fortement impliqués dans son action sensibilisatrice à la chimiothérapie des cellules cancéreuses de la prostate (Meng et al., 2008). Ces BH3-only sont aussi régulés par la protéine suppresseur de tumeur p53. De ce fait, l'efficacité du (-)-gossypol est augmentée dans les cellules HNSCC exprimant la forme sauvage de p53, suggérant une activité pro-apoptotique indépendante d'une inhibition directe de protéines anti-apoptotiques. L'activité de la molécule serait en effet due à l'induction du stress du RE responsable de l'augmentation de l'expression des BH3-only et de la mort par apoptose (Oliver et al., 2004).

Une évaluation préclinique *in vivo* a été réalisée chez des souris inoculées avec des cellules issues du cancer de la tête et du cou. L'administration par voie orale de la dose de 15 mg/kg de gossypol pendant 21 jours a révélé une inhibition de la progression tumorale qui a duré jusqu'à 2 semaines après l'arrêt du traitement. Ces résultats, très encourageant *in vivo*, n'ont donné en clinique qu'un faible espoir dans le traitement des cancers de la prostate et aucun pour le traitement du carcinome du poumon à petites cellules (Ready et al., 2011). En effet, le traitement de 106 patients atteints d'un cancer de de poumon à petites cellules au stade avancé ou métastatique par l'AT-101 seul ou combiné au docétaxel n'a pas amélioré la survie des patients ni l'effet du docétaxel (7.8 mois docétaxel seul vs 5.9 mois docétaxel/AT-101). Par ailleurs, cette évaluation a permis de mettre en évidence des effets secondaires très prononcé dans le traitement avec l'AT-101 par rapport au docetaxel seul (Ready et al., 2011).

Plusieurs dérivés du gossypol ont été générés afin de limiter sa toxicité et d'accentuer son efficacité. Parmi ces dérivés, l'Apogossypolone (ApoG2), qui est un dérivé semi synthétique issu de la troisième génération du gossypol. Il présente une meilleure affinité pour les membres anti-apoptotiques que le gossypol ($K_i = 35\text{nM}$ pour Bcl-2 ; $K_i = 25\text{nM}$ pour Mcl-1 et $K_i = 660\text{nM}$ pour Bcl-x_L) et est capable de déplacer Bax de Mcl-1 et Bim de Bcl-2 (Banerjee et al., 2010 ; Zhang et al., 2010). L'évaluation préclinique de l'ApoG2 a montré une induction de l'apoptose dans plusieurs modèles de lymphome ainsi qu'une activité anti-tumorale dans différents types de cancers en agent seul ou en combinaison avec d'autres agents

chimiothérapeutiques tels que la gemcitabine (Arnold et al., 2008). Dans des modèles cellulaires de carcinome hépatique et de cancer de la prostate (les cellules LNCaP et PC3), l'ApoG2 inhibe la prolifération cellulaire *via* l'induction de l'autophagie par le déplacement de la Becline-1 de Bcl-2 et Bcl-x_L et *via* la formation de ROS. L'inhibition de l'autophagie produit une apoptose massive dans ces cellules soulignant ainsi le rôle important de cette dernière dans la résistance à l'ApoG2 (Cheng et al., 2013 ; Zhang et al., 2010).

Le Sabutoclax (BI-97C) est le nouveau dérivé du gossypol (Figure 55). Cette petite molécule présente une affinité de l'ordre du sub-nanomolaire pour les quatre protéines anti-apoptotiques majeures Bcl-x_L, Bcl-2, Mcl-1 et Bfl-1 (Wei et al., 2010). Le Sabutoclax induit une mort des cellules dépendantes de Bax et Bak et présente une efficacité *in*

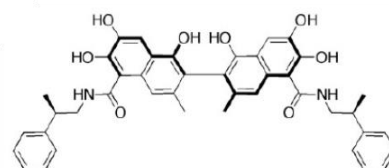


Figure 55 : Structure chimique du Sabutoclax (BI-97C).

vitro et *in vivo* sur un modèle de xénogreffe de cellules cancéreuses de la prostate (Jackson et al., 2012). Il a également été montré que le traitement des cellules cancéreuses du poumon avec le Subatoclax altère la fusion mitochondriale et favorise sa fragmentation de manière indépendante des protéines DRP1 impliquées dans la fission mitochondriale. Cet effet de fragmentation mitochondriale se produit en amont des étapes de l'apoptose et survient de manière totalement indépendante de Bax et Bak et de l'expression des BH3-only (Varadarajan et al., 2013). Cette investigation suggère que le Subatoclax présente une activité spécifique pour Mcl-1 puisque cette dernière est aussi impliquée dans la morphologie mitochondriale. Cependant, à notre connaissance aucune étude n'a démontré son efficacité en clinique, probablement due à une absence d'activité.

III.3.2.2.1.2. TW37

Le TW37 est un dérivé benzenesulfonyl qui présente une grande affinité pour Bcl-2 ($K_i=290\text{nM}$) et Mcl-1 ($K_i=260\text{nM}$) mais plus faible pour Bcl-x_L ($K_i=1110\text{nM}$) (Wang et al., 2006). Cette molécule est synthétisée en se basant sur le groupement polyphénol du gossypol qui a montré une grande importance dans l'interaction avec la poche hydrophobe de Bcl-2. Le TW37 a été obtenu en élargissant cette partie hydrophobe, permettant ainsi une insertion harmonieuse dans la poche de son partenaire (Figure 56).

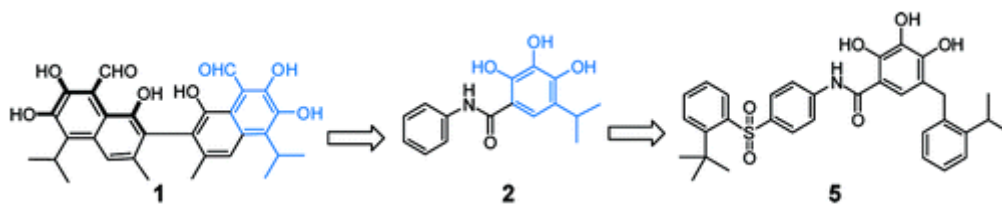


Figure 56 : Conception structurale de la molécule TW37 à partir de la structure du gossypol.

(1) Structure du gossypol. (2) Structure du produit intermédiaire composé du cycle polyphénol contenant les trois groupes hydroxyles (désigné en bleu) qui peuvent mimer les liaisons hydrogènes nécessaires à l'interaction du gossypol avec la protéine Bcl-2. (3) Structure de la molécule TW37 issue après agrandissement du produit intermédiaire (D'après Wang et al., 2006).

Le BH3 mimétique TW37 est capable de bloquer l'interaction entre les protéines pro-apoptotique Bax et Bim avec la poche hydrophobe de Bcl-2, Bcl-x_L et Mcl-1 et d'induire l'apoptose dans différentes lignées cancéreuses de lymphome B et des cellules de lymphome dérivées de tumeurs de patients (Al-Katib et al., 2009). De plus, le TW-37 exerce un effet anti-angiogénique en inhibant directement la protéine Bcl-2 dans les cellules endothéliales et induisant leur mort par apoptose. Cet effet n'a pas été entravé par la co-exposition de ces cellules à des facteurs de croissance sécrétés par les cellules tumorales. De même, le potentiel angiogénique des cellules endothéliales (migration, formation des capillaires) et l'expression des chimiokines CXCL1 et CXCL2 induite par la protéine Bcl-2 *via* la voie de survie NF-κB sont inhibés après exposition à de faibles doses de TW-37 (Zeitlin et al., 2006). Les auteurs dans cette publication montrent que le TW-37 présente un effet anti-angiogénique uniquement restreint à de la vascularisation tumorale (néo-vascularisation). Cependant, son effet sur les vaisseaux des différents organes n'a cependant pas été étudié (Zeitlin et al., 2006).

L'évaluation préclinique de cette molécule a également été évaluée dans un modèle de lymphome B. Cette étude a démontré qu'à la dose maximale de 40mg/kg administré par voie IV pendant 3 jours, le TW-37 induit une inhibition de prolifération tumorale de 28%, et un retard dans la progression tumorale d'uniquement 10 jours (Al-Katib et al., 2009). Cependant, les auteurs de cette étude n'ont pas mis en évidence l'induction d'apoptose qui pourrait être à l'origine de tel retard dans la progression tumorale. Par ailleurs, il semblerait que la dose utilisée dans cette étude est la dose maximale ayant un effet anti-tumoral et que l'augmentation de cette dose pourrait conduire à la mort des souris (Al-Katib et al., 2009). Sa combinaison avec la chimiothérapie cyclophosphamide-doxorubicine-vincristine-prednisolone (CHOP) utilisée pour le traitement des lymphomes diffus à larges cellules dans des modèles animaux, révèle seulement un léger effet synergique (T/C = 19% pour la CHOP en agents seul et 11% pour la combinaison CHOP/TW-37).

III.3.2.2.1.3. S1

La molécule S1 ((E,E)-2-(benzylaminocarbonyl)-3-styrylacrylonitrile) est un BH3-mimétique (Figure 57) pan-inhibiteur capable d'interagir avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 ($K_i = 310\text{nM}$) et Mcl-1 ($K_i = 58\text{nM}$) (Zhang et al., 2007 ; Zhang et al., 2011). Les tests de polarisation de fluorescence (FPA), la co-immunoprécipitation et le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes ont démontré que le BH3-mimétique S1 perturbe les différents complexes Bcl-2/Bax, Mcl-1/Bak et Bcl-2/Bim et induit une apoptose dépendante de Bax et Bak dans plusieurs lignées cancéreuses dont les cellules cancéreuses ovariennes SKOV-3 (Zhang et al., 2011 ; Song et al., 2012 ; Song et al., 2013). Il a également été démontré que cette molécule utilisée à faible dose est capable d'induire l'autophagie en libérant la Becline 1 de la poche hydrophobe de Bcl-2, favorisant ainsi la survie des cellules cancéreuses. Cependant, l'exposition prolongée à de fortes doses conduit à une sur-activation des caspases qui provoque la dégradation de la Becline 1 et inhibe l'action protectrice de l'autophagie (Zhang et al., 2011 ; Liu et al., 2013). Son évaluation préclinique a démontré une activité anti-tumorale en agent seul sur des xénogreffes de carcinome hépatique. Le BH3-mimétique S1, comme le gossypol ou même l'ABT-737 (décrit plus bas dans ce chapitre), est incapable d'interagir avec la poche hydrophobe des formes phosphorylées de Bcl-2 et Mcl-1 et le rapport entre les formes phosphorylées ou non de ces protéines conditionne la réponse des cellules cancéreuses à ce produit (Liu et al., 2013 ; Liu et al., 2014).

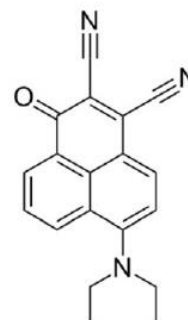


Figure 57 : Structure chimique du produit S1

III.3.2.2.1.4. Obatoclax

C'est un BH3-mimétique pan-inhibiteur décrit comme capable d'inhiber toutes les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 et Bfl1) (Zhai et al., 2006). L'Obatoclax (Figure 58) présente une affinité très faible, de l'ordre du micromolaire, envers les membres anti-apoptotiques ; Bcl-2 ($CI_{50} 1.1\mu\text{M}$), Bcl-x_L ($CI_{50} 4.7\mu\text{M}$), Bcl-w ($CI_{50} 7\mu\text{M}$), Mcl-1 ($CI_{50} 2.9\mu\text{M}$) (Lessene et al., 2008). L'Obatoclax est capable de dissocier Bak de la poche hydrophobe de Mcl-1 (Smoot et al., 2010). Il est aussi capable d'induire les

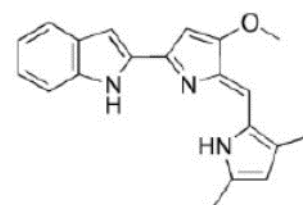


Figure 58 : Structure chimique de l'obatoclax (GX15-070)

protéines BH3-only tels que Bim, mais son activité cytotoxique n'est pas liée à leur présence (Trudel et al., 2007). Son activité cytotoxique a été révélée dans plusieurs cancers tels que le cancer des poumons à grandes cellules et une variété de leucémies (Konopleva et al., 2006). Il a été démontré que l'Obatoclax est capable d'induire une mort cellulaire dépendante ou indépendante de la perméabilisation mitochondriale. En effet, les expériences réalisées sur les cellules Jurkat dépourvues ou non de la caspase 9 ou de Bax et Bak ont démontré que le traitement de ces cellules n'abolit pas l'effet cytotoxique de l'Obatoclax. Cet effet n'est pas non plus limité par l'inhibition des caspases. De plus, il a été révélé que l'association de l'Obatoclax au Dexaméthasone induit l'autophagie en déplaçant la Becline1 de la poche hydrophobe de Mcl-1 et que l'inhibition de l'autophagie supprime cet effet cytotoxique (Khaw et al., 2011).

L'Obatoclax a été évalué dans des études précliniques et les premiers résultats obtenus lors de la phase I ont montré une tolérance au traitement seul allant jusqu'à 28 mg/m³. Cette dose a été recommandée dans les protocoles thérapeutiques (O'Brien et al., 2009). L'Obatoclax a également été combiné à la chimiothérapie conventionnelle telle que le topotécane (inhibiteur de la topo-isomérase I) dans le traitement des tumeurs solides (Paik et al., 2010) mais les résultats sont peu encourageants.

L'Obatoclax, comme le (-)-gossypol, présente une faible affinité pour les partenaires anti-apoptotiques (Lessene et al., 2008 ; (Khaw et al., 2011). Pourtant, l'ABT-737 (présenté ci-dessous) qui présente une affinité à Mcl-1 ($K_i = 550\text{nM}$) équivalente à celle des précédentes molécules *in silico*, ne semble pas avoir une affinité fonctionnelle *in cellulo*. Ceci remet en cause l'efficacité de l'Obatoclax ou du gossypol en tant que BH3-mimétique et suggère que leur action cytotoxique ne serait probablement pas due à l'inhibition directe des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. De plus, plusieurs études ont démontré que les différentes molécules présentées ci-dessus (le (-)-gossypol et ses dérivés, le TW37, S1, et l'Obatoclax) induisent un stress du RE qui augmente l'expression de la protéine BH3-only Noxa au niveau transcriptionnel et traductionnel et qui pourrait être à l'origine de leur effet. En effet, ces molécules favoriseraient l'effet cytotoxique de l'ABT-737 probablement par l'inhibition de Mcl-1 et Bfl1 par Noxa (Albershardt et al., 2011), suggérant que l'effet observé ne soit pas un effet direct comme on pourrait s'y attendre en tant que BH3-mimétiques.

III.3.2.2.2. Les BH3-mimétiques Bcl-2-like : ABT-737 et son analogue ABT-263

Le BH3-mimétique ABT-737 a été découvert par le laboratoire Abbvie (anciennement Abbott) et représente le prototype d'un BH3-mimétique. C'est un inhibiteur puissant de la majorité des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, et Bcl-B) à l'exception de Mcl-1 et de Bfl-1/A1 (Oltersdorf et al., 2005). Les affinités de l'ABT-737 pour Bcl-2 et Bcl-xL sont (CI_{50}) <1 nM et <0.5 nM respectivement. Cette différence dans l'affinité pour ces protéines est due aux différences structurales citées dans le précédent chapitre. L'ABT-737 a été soumis à différentes études et analyses qui ne laissent aucun doute sur son mode d'action, qui se base sur son interaction directe avec la poche hydrophobe des partenaires anti-apoptotiques (Konopleva et al., 2006 ; van Delft et al., 2006 ; Tse et al., 2008 ; Del Gaizo Moore et al., 2008). Le profil d'interaction de l'ABT-737 ressemble à celui du BH3-only Bad, suggérant que ces deux molécules interagissent avec les mêmes résidus dans la poche de leur partenaire. Sur le plan structurel, l'ABT-737 occupe deux poches hydrophobes (p2 et p4) parmi les quatre constituants la cavité hydrophobe des anti-apoptotiques (Figure 59A et B). Le chlorobiphényl de l'ABT-737 apporte un important remodelage à la poche p2 nécessaire pour renforcer son interaction avec ses partenaires (Lee et al., 2007).

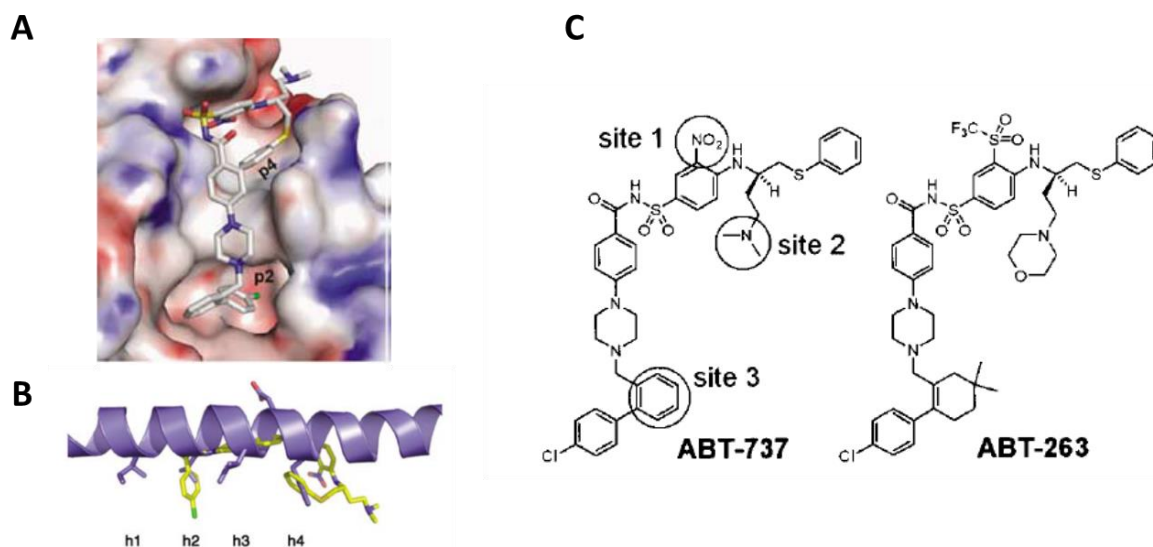


Figure 59 : Structure de l'ABT-737 et de son analogue ABT-263.

(A) Structure du complexe Bcl-xL/ABT-737 révélant les poches p2 et p4 de la cavité hydrophobe de Bcl-xL dans lesquelles se logent les groupements chlorobiphényl et thiophényl de l'ABT-737. Les codes couleurs de la surface correspondent au potentiel positif (bleu) ; potentiel négatif (rouge) ; potentiel zéro (blanc). (B) Superposition de l'ABT-737 et de l'hélice α du domaine BH3 de Bim suivant leur alignement dans la poche de Bcl-xL. (C) Structure chimique de l'ABT-737 et de l'ABT-263, les groupements chimiques modifiés pour améliorer la solubilité de l'ABT-737 sont entourés dans un cercle (Tse et al., 2008 ; Lee et al., 2007).

L'ABT-737 est une molécule hydrophobe peu soluble, ce qui limite son utilisation en clinique. Pour cette raison, le même groupe pharmaceutique a développé une molécule dérivée de l'ABT-737 et administrable par voie orale en substituant certains motifs chimiques, conduisant à la conception de l'ABT-263 (975Da), appelé aussi « Navitoclax[®] » (Figure 59 C).

Ces deux molécules présentent une affinité similaire pour leurs partenaires anti-apoptotiques, une efficacité comparable et induisent toutes les deux une apoptose dépendante de Bax et Bak (van Delft et al., 2006). L'ABT-737 et -263 sont dotés d'une activité cytotoxique robuste vis-à-vis de nombreuses lignées cellulaires, particulièrement celles issues des hémopathies malignes présentant un faible taux de Mcl-1 (Tahir et al., 2017 ; Tse et al., 2008) mais aussi envers certaines tumeurs solides telles que le carcinome du poumon à petites cellules (Tahir et al., 2017 ; Oltersdorf et al., 2005). Son efficacité a été confirmée dans plusieurs modèles de xénogreffes avec une diminution significative du volume tumoral (Shoemaker et al., 2008 ; Konopleva et al., 2006 ; Trudel et al., 2007). L'ABT-737 est aussi capable d'induire une mort autophagique. Cela a été longuement considéré comme une action « off-target » de l'ABT-737. Or, l'autophagie est le résultat de l'action de la Beclin-1 qui est libérée de la poche hydrophobe de Bcl-2 et Bcl-x_L par la molécule d'ABT-737 (Maiuri et al., 2007). Ce résultat démontre que l'ABT-737 ou son analogue peuvent induire une mort dépendante ou indépendante de l'apoptose, de façon directement reliée à leur activité BH3-mimétique.

La thérapie ciblée est optimale lorsqu'elle est appliquée au contexte moléculaire approprié. Ainsi, certains cancers résistent à l'action de ces molécules car elles expriment d'autres protéines anti-apoptotiques que l'ABT-737 ne peut pas inhiber. C'est le cas des protéines Mcl-1 ou Bfl-1. Ainsi, l'association de l'ABT-737 ou de son analogue avec la chimiothérapie conventionnelle ou des molécules de thérapies ciblées visant à contrecarrer les protéines sources de cette résistance conduit à la sensibilisation de ces cancers (Chen, 2007 ; (Konopleva et al., 2006 ; van Delft et al., 2006).

Dans les cancers de l'ovaire, notre équipe ainsi que d'autres ont démontré l'intérêt d'associer l'ABT-737/-263 au traitement standard de chimiothérapie tels que le paclitaxel et le carboplatine pour sensibiliser les cellules cancéreuses ovariennes à l'apoptose (Simonin et al., 2013 ; Stamelos et al., 2013); Witham et al., 2007 ; Wong et al., 2012). Néanmoins, notre équipe a pu montrer que certaines tumeurs issues de patientes atteintes de cancer de l'ovaire sont sensibles à l'action de l'ABT-737 en agent seul, que l'association avec la chimiothérapie

n'améliore pas cette efficacité, et que les niveaux relatifs d'expression des protéines Bim, Mcl-1 et P-ERK constituaient ensemble une signature prédictive de la réponse à l'ABT-737 (Lheureux et al., 2013).

En clinique, l'ABT-263 est entré dans 15 essais visant à évaluer son efficacité en agent seul ou en combinaison avec la chimiothérapie conventionnelle telle que le cisplatine, le paclitaxel (Vlahovic et al., 2014) ou avec des agents de thérapie ciblée tels que le Rituximab (Seymour et al., 2017) ou l'Erlotinib, inhibiteur de l'EGFR (Tolcher et al., 2015). Les premiers résultats ont démontré une tolérance au traitement (100mg/kg) associée néanmoins (Vlahovic et al., 2014) à une forte thrombocytopénie. Cette toxicité est due à l'inhibition de Bcl-x_L à laquelle les plaquettes sanguines sont sensibles. De plus, si l'association de l'ABT-263 avec la chimiothérapie ne présente pas d'interaction médicamenteuse, elle n'améliore cependant pas l'efficacité de l'ABT-263 et conduit à une forte toxicité, difficilement gérable, qui a fait interrompre la plupart de ces essais (Vlahovic et al., 2014).

En 2016, sur la proposition de notre équipe, un nouvel essai clinique de phase II a été lancé dans plusieurs Centres de Lutte Contre le Cancer en France dont le Centre François Baclesse à Caen (qui coordonne cet essai). Cet essai, baptisé MONAVI, évalue l'intérêt du Navitoclax (ABT-263) en monothérapie dans le traitement des cancers de l'ovaire chimiorésistants. Les résultats de cet essai sont en cours d'analyse, notre équipe cherchant à démontrer que la réponse au traitement est corrélée à la signature moléculaire prédictive précédemment identifiée.

Quoi qu'il en soit, la thrombopénie induite par l'ABT-737, inhérente à l'activité d'inhibition de Bcl-x_L, incite les laboratoires à rechercher des molécules BH3-mimétiques plus spécifiques (de Bcl-2 ou de Mcl-1 en particulier). C'est le cas des inhibiteurs présentés ci-dessous.

III.3.2.2.3. Les BH3-mimétiques spécifiques de Bcl-2 ou de Bcl-x_L

III.3.2.2.3.1 : ABT-199 : inhibiteur spécifique de Bcl-2

L'ABT-199, connu sous le nom de Venetoclax ou Venclaxta[®], a été développé par le groupe Abbvie pour remédier à la toxicité causée par l'inhibition de Bcl-x_L. Ce BH3-mimétique est un inhibiteur puissant et sélectif de Bcl-2 ($K_i < 0.001\text{nM}$ pour Bcl-2 et 48nM pour Bcl-x_L). Il occupe la même position que l'ABT-737 dans la poche hydrophobe de Bcl-2 (p2 et p4) de Bcl-x_L (Souers et al., 2013). Il induit une apoptose dépendante de Bax et Bak et sensibilise ainsi plusieurs types cellulaires d'hémopathies malignes. L'ABT-199 induit une régression

tumorale dans plusieurs modèles *in vivo* de cancers hématologiques sans effets indésirables sur les plaquettes (Souers et al., 2013).

En essai clinique de phase I, l'ABT-199 n'a pas été associé à une toxicité de type thrombocytopénie, et les premiers résultats ont montré une grande efficacité de la molécule contre différentes hémopathies malignes telles que le lymphome non Hodgkinien mais également il semble bien être toléré par les patients sans aucune toxicité importante (Parikh et al., 2017). L'utilisation de l'ABT-199 pourrait également avoir un intérêt dans le traitement des tumeurs solides telles que les cancers du sein récepteurs d'œstrogène positifs qui expriment fortement Bcl-2 (Mérino et al., 2009). L'ABT-199 a par ailleurs bénéficié d'une autorisation accélérée par la FDA en 2016 pour le traitement des leucémies lymphoïdes chroniques particulièrement agressives.

En dépit de son efficacité dans le traitement des cancers hématologiques sur-exprimant Bcl-2, l'inhibition de cette protéine dans les tissus du sein pourrait engendrer de graves conséquences en clinique. En effet, Khaw et ses collaborateurs ont démontré qu'en plus de son efficacité sur les cellules cancéreuses leucémiques, l'ABT-199 impacte aussi la survie des lymphocytes B matures circulantes. Ce résultat prédit que l'inhibition pharmacologique de Bcl-2 pourrait influencer les cellules hématopoïétiques matures et que cela doit être surveillé de près lors de son utilisation clinique. Par ailleurs, à l'instar de l'ABT-737 ou de son analogue ABT-263, les cellules cancéreuses pourraient développer des résistances à l'ABT-199 notamment dues à l'expression de Bcl-x_L et Mcl-1. Ces différentes résistances sont illustrées plus bas dans ce chapitre (Choudhary et al., 2015 ; Tahir et al., 2017).

III.3.2.2.3.2 : WEHI-539 et A-1155463 : inhibiteurs spécifiques de Bcl-x_L

Le WEHI-539

Le WEHI-539 est un BH3-mimétique spécifique de Bcl-x_L qui doit son nom à l'Institut de recherche médical Walter and Eliza Hall en Australie. En dépit de l'effet thrombopéniant engendré par l'inhibition de Bcl-x_L dans les plaquettes (Mason et al., 2007), la stratégie de cibler spécifiquement cette protéine pourrait être une très bonne alternative pour sensibiliser la plupart des tumeurs solides. De plus, le problème de la cythrombopénie pourrait être gérable en adaptant la posologie ainsi que la fréquence d'administration. Cet inhibiteur a été identifié suite à un criblage à haut débit de 100.000 composés pour leur capacité à lier Bcl-w dont la structure est très proche de celle de Bcl-x_L. Les hits obtenus ont été ensuite évalués

pour leur capacité à perturber le complexe Bcl-x_L/Bim BH3 et/ou Mcl-1/Bim BH3. Parmi les molécules capable de déplacer Bim de Bcl-x_L sans aucun effet sur le complexe Mcl-1/ Bim BH3, a été identifié WEHI-539. Cette molécule de 584Da interagit avec une affinité identique à celle de l'ABT-737 avec la poche hydrophobe de Bcl-x_L (CI₅₀ = 0.6nM pour WEHI-539/Bcl-x_L, CI₅₀ = 0.4nM pour ABT-737/Bcl-x_L) (Lessene et al., 2013) alors que son affinité est environ 400 fois plus faible pour Bcl-2, Bcl-w, Mcl-1 et A1. Les études structurales ont démontré que le WEHI-539, comme l'ABT-737, interagit avec Bcl-x_L au niveau des poches p2 et p4, favorisant une parfaite complémentarité structurale. Le fragment Benzothiazole-hydrazone, constituant le cœur de cette molécule, se loge dans la poche profonde p2 et lui confère une grande sélectivité pour Bcl-x_L (Lessene et al., 2013). Cette action sur Bcl-x_L a également été confirmée par son activité cytotoxique sur les cellules plaquettaires.

Le composé WEHI-539 induit l'apoptose dans les fibroblastes murins exprimant Bcl-x_L et dépourvus de Bcl-2 et Mcl-1, et cela de façon dépendante de Bax et Bak (Lessene et al., 2013). Dans les cellules exprimant Bcl-2, WEHI-539 est moins efficace que l'ABT-737 (Concentration Effective (CE) = 0.48μM et 2.5nM respectivement) alors qu'il est sans effet sur les cellules exprimant Mcl-1 (Lessene et al, 2013).

Une étude récente a démontré que WEHI-539 sensibilise plusieurs lignées cancéreuses de l'ovaire à la chimiothérapie conventionnelle à base de sel de platine (Abed et al., 2016). L'équipe de Medema a évalué son efficacité sur les cellules souches cancéreuses (CSC) du colon issues de patientes. Ces cellules sont à l'origine de l'hétérogénéité tumorale et la résistance aux traitements chimiothérapeutiques tels que l'oxaliplatine. Dépendantes de Bcl-x_L, elles se sont révélées sensibles à l'action de WEHI539 et résistantes à celle de l'ABT-199 (Colak et al., 2014).

BXI-61 et BXI-72

Deux autres molécules inhibitrices de Bcl-x_L, **BXI-61** et **BXI-72**, ont été identifiées par la même approche que celle utilisée pour le WEHI-539. Ces deux molécules sont issues du criblage de la chimiothèque du NCI. Les études de polarisation à fluorescence ont démontré que ces deux composés interagissent avec la poche hydrophobe de Bcl-x_L et présentent une affinité de l'ordre du sub-nanomolaire (K_i (BXI-61) = 14.8 ± 1.54 nM ; K_i (BXI-72) = 0.9 ± 0.15 nM). Toutefois, leur affinité pour les autres membres anti-apoptotiques est très faible (Park et al, 2014). Ces composés déclenchent l'apoptose dans les cellules cancéreuses du poumon en addiction à Bcl-x_L de façon dépendante de Bax et Bak et provoquent une

régression tumorale dose-dépendante dans les modèles de xénogreffe établis à partir de ce cancer. Les résultats obtenus *in vivo* avec ces composés ont révélé une toxicité hépatique aux doses les plus élevées, qui disparaît pour des doses plus faibles tout en conservant son efficacité anti-tumorale. De plus, l'évaluation de l'effet de ces molécules sur le taux des thrombocytes a révélé que les inhibiteurs BXI-61 et BXI-72 ont un effet très modéré sur les plaquettes sanguines par rapport à l'ABT-737. Cette observation révèle donc un intérêt clinique de ces molécules pour le traitement des cancers dépendants de Bcl-x_L.

A-1155463

Récemment, le groupe Abbvie a développé un nouvel inhibiteur de Bcl-x_L, l'A-1155463 dont l'activité est nettement supérieure à celle du WEHI-539. Il interagit avec une affinité de l'ordre du picomolaire avec Bcl-x_L ($K_i > 0.01\text{nM}$). Cette affinité est beaucoup plus faible envers Bcl-2 ($K_i = 80\text{nM}$) et Mcl-1 ($K_i = 440\text{nM}$) (Tao et al., 2014). Comme l'ABT-263, l'A1155463 cause une déplétion rapide et réversible des plaquettes suggérant une activité « on-target » *in vivo*. Il induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses du poumon H146 dépendantes de Bcl-x_L et retarde la progression des tumeurs issues de cette lignée *in vivo*. Cependant, l'effet de cette molécule ne persiste pas après traitement, conduisant à une reprise de la prolifération tumorale similaire à celle du groupe contrôle (Tao et al., 2014).

III.3.2.2.4. Mécanismes de résistance aux inhibiteurs Bcl-2/Bcl-x_L

L'efficacité de l'ABT-737, de l'ABT-263 et de l'ABT-199 dans le traitement des cancers est convaincante. Cependant, certains cancers sont initialement résistants ou développent une résistance intrinsèque permettant aux cellules cancéreuses d'échapper à l'action de ces molécules. Différents mécanismes expliquant cette résistance ont été décrits dans la littérature et leur identification précoce pourrait permettre de prédire la réponse au traitement (Figure 60).

L'état de phosphorylation des membres de la famille Bcl-2 est l'un des facteurs de résistance aux BH3-mimétiques. En effet, la phosphorylation de Bcl-2 (p-Bcl-2) a été identifiée comme un mécanisme de résistance des lignées leucémiques aux BH3-mimétiques avec une action modérée tels que la molécule S1 (Zhang et al., 2013) et l'Obatoclax (Pérez-Galán et al., 2008) ainsi qu'aux BH3-mimétiques puissants tels que l'ABT-737, l'ABT-263 et l'ABT-199 (Konopleva et al., 2006 ; Song et al., 2016). La protéine Bcl-2 peut être phosphorylée sur différents sites au niveau de sa boucle non structurée. Parmi ces sites, la phosphorylation de la Ser⁷⁰ par la voie MAPK/ERK est impliquée dans la modulation du site d'interaction du

domaine BH3 des pro-apoptotiques (Deng et al., 2004 ; Konopleva et al., 2006). Cette phosphorylation provoque un changement de conformation de la protéine Bcl-2 qui renforce son interaction avec ses partenaires pro-apoptotiques Bax et Bim et réciproquement, diminue son affinité pour les composés ABT d'environ 100 à 300 fois. Cela empêche donc le déplacement de Bax et Bim et l'induction de l'apoptose (Sang et al, 2015). L'évaluation du ratio p-Bcl-2/ (Bcl-2+Mcl-1) dans les leucémies permet ainsi de prédire la réponse au BH3-mimétiques (Song et al., 2016).

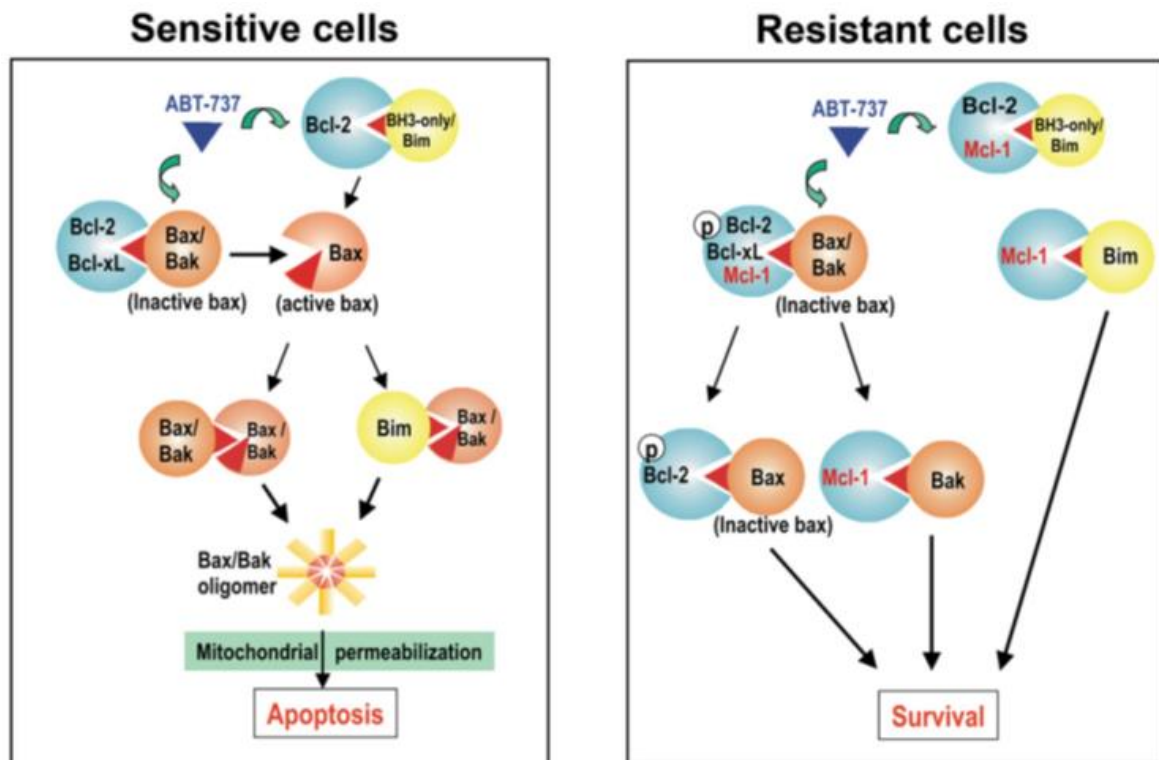


Figure 60 : Mécanismes de sensibilité et de résistance aux molécules d'ABT.

Dans les cellules sensibles à l'ABT-737 ayant un faible niveau d'expression de Bcl-2, les protéines Bax, Bak ainsi que les BH3-only activateurs sont neutralisés par les anti-apoptotiques. Suite au traitement par l'ABT-737, les protéines Bax et Bak et leur activateurs sont déplacés de Bcl-2 et Bcl-xL et s'oligomérisent pour perméabiliser la membrane mitochondriale et induire l'apoptose. Dans les cellules résistantes à l'ABT-737, Mcl-1 et p-Bcl-2 sont fortement exprimés, conduisant à la séquestration de Bax, Bak et leur BH3-only activateurs. Ces molécules pro-apoptotiques ne peuvent être libérées par l'action de l'ABT-737, favorisant ainsi la résistance à l'ABT-737 et la survie cellulaire (D'après Konopleva et al., 2006).

La résistance aux BH3-mimétiques est principalement liée aux protéines se retrouvant en dehors de leur spectre d'action. Les composés ABT, entre autre, ont très peu d'affinité avec Mcl-1. Cette dernière a donc un rôle crucial dans la résistance à ces composés (Konopleva et al., 2006 ; Van Delft et al., 2006 ; Cory and Adams, 2005) puisqu'elle est capable de prendre le relai des protéines Bcl-2-like en séquestrant les protéines pro-apoptotiques libérées par le BH3-mimétique. La protéine Mcl-1 contribue ainsi à la résistance aux composés ABT en

séquestrant Bak déplacé par les molécules d'ABT de la poche hydrophobe de Bcl-x_L, empêchant ainsi l'induction de l'apoptose (Konopleva et al., 2006). Les analyses d'immunoprécipitation et le test FPA (Fluorescence Protein Assay) montrent par ailleurs que les composés ABT sont incapables de déplacer Bim ou Bak de la poche hydrophobe de Mcl-1 et la résistance à ces composés corrèle parfaitement avec le niveau d'expression de Mcl-1 (Konopleva et al., 2006). La modulation de l'expression de Mcl-1 pourrait donc améliorer ou restaurer la sensibilité aux composés ABT-737. En effet, l'inhibition de l'expression génique de Mcl-1 par l'utilisation de petits ARN interférents ou d'inhibiteurs de kinases dépendantes de cycline (Roscovitine ou CY202), actuellement en essais clinique, bloquent la transcription de l'ARNm de Mcl-1 et sensibilisent les cellules aux composés ABT (Konopleva et al., 2006 ; Van Delft et al., 2006). De même, la neutralisation de l'activité anti-apoptotique de Mcl-1 par la surexpression de Noxa, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de la synthèse protéique (cycloheximide) ou des voies de signalisation MEK/ERK, réduit le niveau d'expression de Mcl-1 et sensibilise remarquablement les cellules cancéreuses à l'apoptose induite par les composés ABT (Chen, 2007 ; Konopleva et al., 2006 ; van Delft et al., 2006). Réciproquement, la surexpression de Mcl-1 rend les cellules cancéreuses résistantes aux composés d'ABT (van Delft et al., 2006).

Certaines études ont démontré que le niveau d'expression des BH3-only joue également un rôle crucial dans la résistance aux molécules d'ABT. C'est le cas de la protéine Bim. Ce BH3-only est considéré comme un ligand universel pour les protéines multidomaines de la famille Bcl-2. L'interaction des composés ABT avec les protéines anti-apoptotiques libèrent Bim piégé qui va à son tour activer Bax et Bak et induire l'apoptose (Del Gaizo Moore et al., 2008). L'inhibition de l'expression de Bim ou l'augmentation de sa dégradation et/ou de sa séquestration dans le cytosol suite à sa phosphorylation par p-ERK ou p-AKT provoque une importante résistance au traitement aux molécules d'ABT, notamment à l'ABT-199 (Konopleva et al., 2006 ; Bodo et al., 2016). Notre équipe a également observé cet effet sur les nodules tumoraux issus de patientes atteintes de cancer de l'ovaire chez lesquels la surexpression de Bim est un déterminant essentiel de la sensibilité de ces nodules à l'ABT-737, alors que la surexpression concomitante de p-ERK et de Mcl-1 les rendent résistants à cette molécule (Lheureux et al., 2015).

Les investigations sur les résistances envers les inhibiteurs spécifiques de Bcl-x_L n'ont pas été très approfondies. Cependant il a été rapporté dans plusieurs études que les cellules surexprimant Mcl-1 sont résistantes au BH3-mimétique spécifique de Bcl-x_L WEHI-539 (Lessene et al., 2013 ; Tao et al., 2014).

En conclusion, Mcl-1 est au centre des différents mécanismes de résistance aux traitements de chimiothérapie conventionnelle (Figure 61A) mais également aux inhibiteurs spécifiques de Bcl-2-like et semble représenter une barrière critique pour répondre à ces traitements très prometteurs (Figure 61B). Cette protéine est très différentes des autres membres de la famille Bcl-2, dans sa structure, son affinité pour ses partenaires mais également au niveau de son mode de régulation et ces différences sont à l'origine des difficultés rencontrées dans l'identification d'inhibiteurs capables d'inhiber spécifiquement son activité.

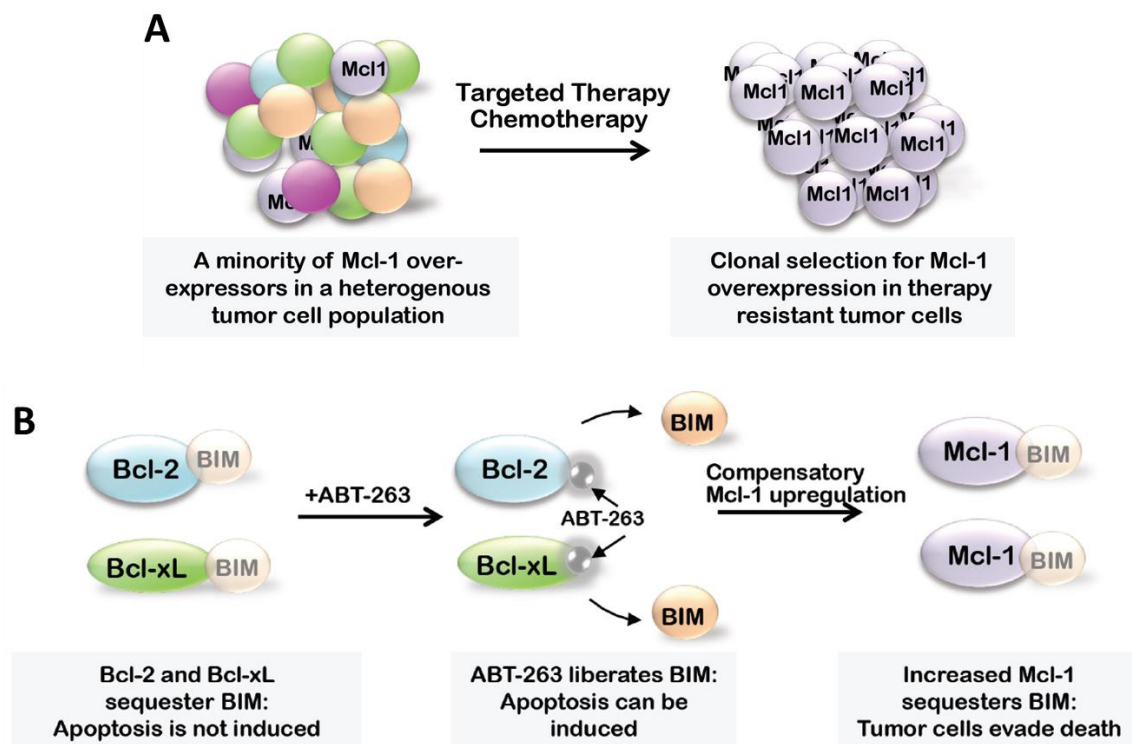


Figure 61 : Modèles de résistance à la chimiothérapie (A) et aux thérapies ciblées (B) occasionnés par l'expression ou l'activité de la protéine Mcl-1 (d'après Williams and Cook, 2015).

III.4. Mcl-1 : une protéine unique en son genre et une potentielle cible thérapeutique

III.4.1. Généralités

La protéine Mcl-1 est une des principales protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Comparé à Bcl-2 (239 acides aminés) et Bcl-x_L (233 acides aminés), Mcl-1 est une grosse protéine, constituée de 350 acides aminés (40/42 kDa) qui présente une longue extrémité N-terminale constituée de 180 acides aminés (Thomas et al., 2010). Cette région contient quatre séquences répétées PEST riches en Proline (P), Glutamate (E), Sérine (S), Thréonine (T) et des motifs Arg:Arg, communément retrouvés chez les protéines à turnover rapide. Ces séquences sont des régulateurs majeurs de l'expression, de la fonction et de la localisation subcellulaire de Mcl-1, faisant d'elle une protéine unique parmi les autres membres de la famille Bcl-2 (Germain and Duronio, 2007). Mcl-1 diffère également par son extrémité C-terminale hydrophile, responsable de sa localisation subcellulaire et qui influe sur sa fonction.

La localisation de Mcl-1 dans les différents compartiments cellulaires varie selon l'état de la cellule. Ainsi, au cours du processus apoptotique, Mcl-1 est localisée au niveau de la membrane mitochondriale où elle exerce sa fonction anti-apoptotique en séquestrant les membres pro-apoptotiques (Bak, Bim). Le motif EEDL permet à Mcl-1 d'être dirigée vers la mitochondrie où elle s'ancre *via* les 79 premiers résidus aminés de sa partie N-terminale tandis que son extrémité C-terminale interagit avec le récepteur mitochondrial Tom70 (Belmar and Fesik, 2015). En plus de sa localisation mitochondriale, Mcl-1 est également exprimée dans le cytosol sous forme d'un hétérodimère probablement complexée à la protéine Bax, ou encore au niveau de l'enveloppe nucléaire (Leuenroth et al., 2000). Plusieurs études ont également démontré que Mcl-1 est aussi localisée dans le compartiment nucléaire. Il s'agit d'une forme tronquée de la protéine Mcl-1 (snMcl-1 pour short nuclear Mcl-1) qui possède de fortes propriétés antiprolifératives (Fujise et al., 2000 ; Jamil et al., 2005). Contrairement aux autres protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L qui affectent la transition G0/G1 du cycle cellulaire, Mcl-1 intervient au niveau de la transition S/G2/M (Germain and Duronio, 2007). Une fois dans le noyau, snMcl-1 interagit avec des régulateurs du cycle cellulaire tels que la protéine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) impliquée dans la régulation de la phase S du cycle cellulaire (Fujise et al., 2000), mais également avec la kinase dépendante des

cyclines 1 (Cdk1) dont elle perturbe l'interaction avec son partenaire, la cycline B1, bloquant ainsi la progression du cycle en G2/M (Jamil et al., 2005).

Mcl-1 est retrouvée dans divers types cellulaires et est différentiellement exprimée par rapport aux autres protéines de la famille Bcl-2. Contrairement à la protéine Bcl-2 qui est exprimée dans les cellules peu différenciées, Mcl-1 est exprimée dans les cellules bien différenciées (Krajewska et al., 1996 ; Krajewski et al., 1994 ; Krajewski et al., 1995). Les études d'immunohistochimie effectuées par cette équipe ont démontré que Mcl-1 est présente dans les cellules épithéliales de divers tissus, à savoir l'épithélium de la prostate, du sein, de l'estomac, des intestins, du colon, des poumons, de l'endomètre et de l'épiderme (Krajewski et al., 1995). Elle est aussi exprimée dans le muscle cardiaque et squelettique, dans les hépatocytes et les chondrocytes déficients en Bcl-2 (Krajewski et al., 1995). Mcl-1 est aussi retrouvée dans plusieurs types cellulaires endocriniens tels que les cellules adrénergiques corticales, les cellules des îlots pancréatiques, les cellules de Leydig dans les testicules, les cellules de la granulosa de l'ovaire ainsi que dans les neurones sympathiques (Krajewski et al., 1995). En revanche, Mcl-1 est peu ou pas du tout exprimée dans les neurones du cerveau, la moelle osseuse et l'épithélium thyroïdien (Krajewski et al., 1995).

Mcl-1 est très importante pour le maintien de l'équilibre du système hématopoïétique. La délétion de Mcl-1 au stade embryonnaire étant létale, les études sur sa fonction ont fait appel à des techniques de mutagenèse conditionnelle. La délétion de Mcl-1 murin a démontré son rôle important dans le maintien des cellules souche hématopoïétiques (Opferman et al., 2005), des progéniteurs immatures et des lymphocytes T et B matures (Opferman et al., 2004). Elle est indispensable pour la formation et la persistance du centre germinale et des cellules B mémoires (Krajewski et al., 1994 ; Vikstrom et al., 2010). Elle est également impliquée dans le maintien des cellules du plasma sanguin, des lymphocytes (Opferman et al., 2004), des plasmocytes (Peperzak et al., 2013), des neutrophiles et des macrophages (Dzhagalov et al., 2008). Elle est en effet très importante pour la survie des lymphocytes B périphériques dont la mort spontanée coïncide avec la dégradation de Mcl-1 sans variations d'expression des autres protéines anti-apoptotiques. Enfin, la protéine Mcl-1 est aussi importante pour la survie des lymphocytes T (Opferman et al., 2004). Néanmoins, contrairement aux cellules B, la perte d'hétérozygotie de *MCL1* n'induit pas la mort des lymphocytes T (Opferman et al., 2004), ce qui pourrait favoriser l'émergence de stratégies anti-Mcl-1 pour le traitement de pathologies liées aux cellules B et qui épargneraient les lymphocytes T.

III.4.2. Régulation de Mcl-1

La stabilité protéique de Mcl-1, sa localisation intracellulaire et sa fonction sont finement régulées au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel. Ces modifications sont apportées par des voies de signalisation majeures faisant de Mcl-1 le carrefour des signaux pro- et anti-survie responsables du devenir de la cellule.

III.4.2.1. Régulation au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel

La transcription de Mcl-1 est induite par de multiples cytokines telles que l'interleukine-3 (IL-3) (Wang et al., 1999), l'IL-5 (Huang et al., 2000), l'IL-6 (Jourdan et al., 2000). Elle est aussi stimulée par de nombreux facteurs de transcription, eux-mêmes potentiellement induits par les précédents inducteurs tels que le facteur STAT3 activé par l'IL6, le VEGF et l'IL-3 (Puthier et al., 1999 ; Wang et al., 2003), STAT5 mais également d'autres facteurs déclenchés par les signaux environnementaux à l'instar du facteur d'hypoxie Hif-1 α (Thomas et al., 2010). Dans la plupart des cas, la sous-expression de Mcl-1 passe par l'inactivation des facteurs de transcription stimulant son expression (Thomas et al., 2010). Néanmoins, le promoteur de *MCL1* peut être directement réprimé par le facteur de transcription E2F1 (Croxtton et al., 2002).

Le taux d'expression de Mcl-1 est régulé au niveau post-transcriptionnel conduisant à une demi-vie très courte de son ARNm comme de sa protéine. Parmi ces mécanismes, des microARNs ont été impliqués dans l'inhibition de la traduction de Mcl-1, à l'instar des miR-29 et miR-125b qui réduisent l'expression de Mcl-1 en ciblant directement l'extrémité 3'UTR de son ARNm ou en inhibant les voies impliquées dans l'induction de cette protéine (Mott et al., 2007 ; Gong et al., 2013). L'ARNm de Mcl-1 est l'objet de plusieurs épissages alternatifs produisant deux isoformes plus courtes : la première, Mcl-1_S, est dépourvue de l'exon 2, et ne contient que le domaine BH3 (Bingle et al., 2000 ; Bae et al., 2000). La seconde, Mcl-1_{ES}, est dépourvue de l'exon 1 et contient les 3 domaines d'homologie (Kim and Bae, 2013). Les analyses de séquences indiquent que ces deux variant sont générés d'un épissage alternatif au niveau des séquences GC-AG donneur-accepteur, située dans l'exon 1 de Mcl-1. Ces deux isoformes ont une fonction pro-apoptotique et interagissent avec la poche hydrophobe de Mcl-1 (Bingle et al., 2000 ; Kim et Bae, 2013).

La voie PI3K/AKT est impliquée dans la transcription et la traduction de Mcl-1. En réponse à la signalisation induite par IL-3, Akt est transloquée dans le noyau où elle phosphoryle directement ou indirectement le facteur de transcription CREB (c-AMP Response Element-binding protein), permettant l'activation de la transcription de l'ARNm de Mcl-1 (Wang et al., 1999). Akt est aussi impliquée dans la traduction de Mcl-1 en activant le complexe mTORC1. L'activation de ce dernier conduit à la phosphorylation inhibitrice de 4EBP-1 et favorise ainsi la traduction de l'ARNm de Mcl-1 et son expression dans les cellules (Coloff et al., 2011 ; Hsieh et al., 2010).

III.4.2.2. Régulation au niveau post- traductionnel

Mcl-1 est composée d'une longue extrémité N-terminale non structurée constituée de quatre régions PEST qui sont la cible de plusieurs modifications post-traductionnelles de type phosphorylation et ubiquitination (Figure 62). Ces modifications influencent fortement la stabilité de Mcl-1 et rendent son turnover très court (30min-2h) (Akgul et al., 2000).

III.4.2.2.1. Régulation par clivage protéolytique

Au niveau des régions PEST, la protéine Mcl-1 est soumise à un clivage protéolytique assuré par les caspases ou par les Granzymes B en réponse à un signal apoptotique. Le clivage de Mcl-1 par la caspase-3 est effectué au niveau des résidus acide aspartique 127 et 157 permettant de générer des fragments de différentes tailles, 24, 19, 17 et 12 kDa (Herrant et al., 2004). Le clivage de Mcl-1 par les Granzymes B se fait après les résidus aspartates 177, 127 et 157 et génère principalement un fragment de 232 acides aminés constitué des trois domaines BH (BH1, BH2 et BH3) (Weng et al., 2005). Ces différents clivages de Mcl-1 aboutissent à l'abolition de son activité anti-apoptotique, à sa dégradation (Herrant et al., 2004), ou à sa conversion en une protéine pro-apoptotique capable d'induire l'apoptose, seule ou en association avec des protéines pro-apoptotiques telles que Bim (Weng et al., 2005 ; Michels et al., 2004).

III.4.2.2.2. Régulation par phosphorylation

Les régions PEST de l'extrémité N-terminale de Mcl-1 sont également cibles de plusieurs kinases. Ces régions, riches en thréonines et sérines, sont susceptibles d'être phosphorylées par des kinases. Ce type de modification, qualifiée de modification rapide et irréversible, influence fortement la stabilité et la fonction de Mcl-1 mais également son affinité envers ses partenaires (Figure 62). A titre d'exemple, la phosphorylation de la Ser⁶⁴ par les Cdk1, Cdk2

ou par JNK (C-JUN-N-terminal Kinase) est principalement réalisée au moment de la transition G2/M du cycle cellulaire, conduisant au renforcement de l'affinité de Mcl-1 envers ses partenaires pro-apoptotiques et favorisant ainsi son activité anti-apoptotique (Thomas et al., 2010). La phosphorylation de la Thr¹⁶³ est l'une des phosphorylations les plus conservées entre les espèces et représente l'une des plus importantes modifications dans la régulation de Mcl-1. Elle est ciblée par plusieurs kinases telles que Erk1, JNK et la GSK-3 en fonction desquelles la protéine Mcl-1 est différemment modulée (Thomas et al., 2010). Ainsi, la phosphorylation de la Thr¹⁶³ seule par Erk-1, elle-même induite par le TPA, favorise la stabilité de Mcl-1. Néanmoins, cette phosphorylation est souvent associée à la phosphorylation d'autres sites conduisant à une régulation différente de la protéine Mcl-1. Ainsi, la co-phosphorylation des Thr⁹² et Thr¹⁶³ par Erk-1 favorisent la stabilisation de Mcl-1 et stimule son activité anti-apoptotique (Ding et al., 2008). En revanche, la co-phosphorylation de la Thr¹⁶³ et la Ser¹²¹ par la kinase JNK inactive Mcl-1 et entrave son activité anti-apoptotique. De manière similaire, les phosphorylations de la Ser¹⁵⁵ et Ser¹⁵⁹ induites par la GSK-3 en association avec la phosphorylation de la Thr¹⁶³ conduit à la déstabilisation de Mcl-1 et à l'interruption de son interaction avec Bim, favorisant ainsi sa dégradation par le protéasome (Ding et al., 2007). La phosphorylation de Mcl-1 induite par les voies JNK et GSK-3 favoriserait l'ubiquitination de Mcl-1 et augmenterait son élimination par le protéasome. Cependant, dans la plupart des cancers, l'expression de Mcl-1 est augmentée et coïncide d'une part avec l'activation de la voie ERK qui induit sa stabilisation *via* la phosphorylation de la Thr¹⁶³, et d'autre part avec l'inactivation de la voie GSK-3 impliquée dans sa dégradation du fait de l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR (Mojsa et al., 2014).

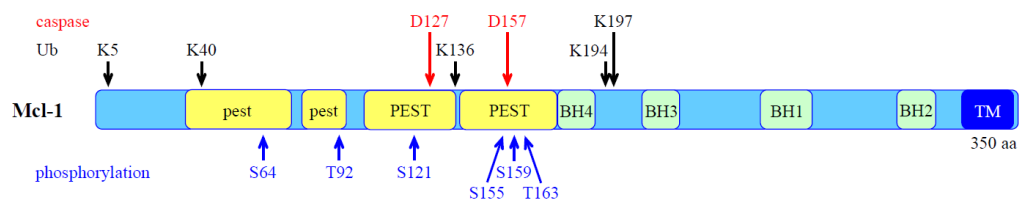


Figure 62 : Représentation schématique de la protéine Mcl-1 humaine illustrant les régions fonctionnelles et les différents sites de modifications post-traductionnelles.

Cette représentation contient les quatre domaines BH (BH1-BH4), le domaine transmembranaire (TM), les séquences PEST, sites de clivage par les caspases et les Granzymes B (en rouge), les sites de phosphorylation (en bleu), et les sites d'ubiquitination (en noir) (d'après Mojca et al., 2014).

III.4.2.2.3. Régulation par ubiquitination

La protéine Mcl-1 est également régulée par des modifications post-traductionnelles de type ubiquitination. Cette modification est portée au niveau des résidus lysines répartis principalement dans la partie N-terminale de la protéine Mcl-1 (Figure 62). L'ubiquitination est contrôlée par quatre enzymes d'E3-ubiquitines ligases différentes : Mule, SCF^{βTrCP}, SCF^{Fbw7} et Trim17 et une deubiquitinase (USP9X) qui, respectivement, favorisent ou entravent l'ubiquitination de Mcl-1. L'action de ces enzymes sur Mcl-1 est différemment modulée. Ainsi, l'interaction de Mule avec Mcl-1 est régulée par l'intervention des autres membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 alors que les autres E3 ubiquitines ligases sont influencées par les phosphorylations de résidus spécifiques au niveau des régions PEST de Mcl-1.

L'enzyme majeure responsable de l'ubiquitination de Mcl-1 est l'E3 ubiquitine ligase Mule (appelée aussi LASU1 ou ARF-BP1). Elle est constituée d'un domaine BH3 qui permet son insertion dans la poche hydrophobe de Mcl-1 conduisant à son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Warr et al., 2005 ; Pervin et al., 2011). La protéine Mule ne présente aucune affinité pour les autres membres multidomaines de la famille Bcl-2 et son affinité envers Mcl-1 est faible par rapport à celle de Bim, Puma, Bak, Bid et Noxa. Ainsi, la surexpression de Bim ou de Puma conduit elle au déplacement de Mule de la poche hydrophobe de Mcl-1 et à sa stabilisation (Mei et al., 2005 ; Czabotar et al., 2007). Par ailleurs, l'interaction de Noxa avec la poche hydrophobe de Mcl-1 favorise sa dégradation par le protéasome (Willis et al., 2005). Cette interaction favoriserait la liaison d'E3-ubiquitine ligases à l'instar de Mule ou d'autres protéines adaptatrices responsables de la diminution de l'association de la deubiquitinase USP9X avec Mcl-1 et de sa dégradation (Czabotar et al., 2007 ; Gomez-Bougie et al., 2011). Cependant, le mécanisme d'intégration de Mule avec le complexe Noxa/Mcl-1 n'est pas encore totalement élucidé.

Contrairement à ce qui est observé avec Noxa, l'interaction de Bim avec Mcl-1 n'induit pas sa dégradation. La liaison de Bim et Noxa à Mcl-1 pourrait modifier la conformation de Mcl-1 et faire apparaître des épitopes différents menant à sa stabilisation ou à sa dégradation par le protéasome. De plus, Bim et Noxa diffèrent par leurs extrémités C et N-terminales, mais possèdent une région centrale du domaine BH3 commune, à l'exception de la Lys³⁵ caractéristique de Noxa dont la mutation conduit à l'abolition de sa capacité à induire la dégradation de Mcl-1. Au niveau de ce domaine, Noxa possède une séquence -FRQKLL- qui

semble être très importante pour la dégradation de Mcl-1 et sa substitution par la séquence correspondante de Bim, -A_{YY}ARR-, empêche la dégradation de Mcl-1 par le protéasome (Czabotar et al., 2007).

La dégradation de Mcl-1 est aussi régulée par les autres E3-ubiquitines ligases et dépend des phosphorylations effectuées par les voies JNK et GSK-3 β . La phosphorylation de Mcl-1 au niveau des résidus Ser¹⁵⁵, Ser¹⁵⁹, Thr⁹² et Thr¹⁶³ est reconnue par les E3-ubiquitines ligases SCF ^{β -TrCP} et SCF^{Fbw7}, conduisant à l'ubiquitination de Mcl-1 et son élimination par le protéasome (Ding et al., 2007). La mutation des différents sites de phosphorylation, l'inactivation des kinases ou des enzymes d'ubiquitination conduit à la stabilisation de Mcl-1 et à la résistance à la chimiothérapie et aux thérapies ciblées telle que l'ABT-737 (Wertz et al., 2011 ; Inuzuka et al., 2011 ; Schwickart et al., 2010).

L'ubiquitination de Mcl-1 menant à sa dégradation est une modification réversible pouvant être abrogée par des enzymes spécifiques appelées les déubiquitinases de la famille des USPs. Parmi ces enzymes, l'USPX9 a été retrouvée immunoprécipitée avec la protéine Mcl-1 (Schwickart et al., 2010). Les USPX9 interagissent directement avec Mcl-1 et la stabilisent par l'élimination des chaînes de poly-ubiquitination portées sur la Lys⁴⁸ (Schwickart et al., 2010). L'action de la déubiquitinase USPX9 est régulée par la phosphorylation des résidus retrouvés au niveau des régions PEST. A titre d'exemple, la phosphorylation des résidus Ser¹⁵⁵, Ser¹⁵⁹ et Thr¹⁶³ par la GSK-3 β perturbe l'interaction de l'USPX9 avec Mcl-1 alors que l'inactivation de la GSK-3 β par la voie PI3K/AKT renforce cette interaction (Schwickart et al., 2010). Ainsi, les phosphorylations facilitant le recrutement des E3-ubiquitine ligase telles que SCF ^{β -TrCP} et SCF^{Fbw7} empêchent l'interaction d'USPX9 avec Mcl-1, créant une compétition entre ses partenaires antagonistes et permettant une régulation fine de Mcl-1.

III.4.3. Inhibition de l'expression et de l'activité de Mcl-1

III.4.3.1. Inhibition indirecte par la modulation des voies de signalisation

Comme évoqué plus haut, Mcl-1 est modulée par les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et MAPK/ERK permettant son expression et sa stabilité. Ces voies sont souvent dérégulées dans les pathologies malignes conduisant à leur activation constitutive. Cette dérégulation se traduit dans la plupart des cas par une surexpression et une grande stabilité de la protéine anti-apoptotique Mcl-1. Dans le but de restaurer la sensibilité aux traitements thérapeutiques, de

nombreux inhibiteurs ont été développés pour réguler directement ou indirectement Mcl-1 en ciblant à différents niveaux les voies de signalisation.

La voie PI3K/AKT/m-TOR est impliquée dans l'expression et la stabilité de Mcl-1. L'inhibition de cette voie aboutit à la déstabilisation et à la dégradation de cette protéine. Il existe actuellement plusieurs inhibiteurs des différents acteurs de cette voie dont la plupart sont utilisés en clinique (AMM ou en développement). L'inhibition de la PI3K par le GDC-0941 réduit l'expression de Mcl-1 en induisant son élimination par le protéasome et en sensibilisant ainsi les cellules cancéreuses et les xénogreffes dérivées du cancer du sein à l'ABT-737. L'inhibition d'AKT est aussi ciblée par différents inhibiteurs tels que le MK2206 (Carneiro et al., 2015). Ce dernier inhibe efficacement AKT et empêche la phosphorylation de ses substrats. Cet inhibiteur est en essais cliniques pour le traitement de plusieurs cancers dont les cancers de l'ovaire. Enfin, l'inhibition de mTOR permet de déphosphoryler 4E-BP1, entraînant une inhibition de la traduction de l'ARNm de Mcl-1, l'inhibition de la phosphorylation d'AKT et l'amplification du signal de survie induite par mTORC2 (Laplane and Sabatini, 2012). L'inhibition efficace de mTOR est basée sur le ciblage de son site actif, permettant d'inhiber simultanément les deux formes de mTORC1/C2. Parmi ces inhibiteurs, il existe notamment l'AZD-2014, l'AZD-8055 et l'INK128. La plupart de ces inhibiteurs sont en cours de développement clinique. La double inhibition de PI3K/mTOR peut être effectuée par plusieurs inhibiteurs tels que le BEZ235, le GDC0980 ou encore le GSK2126458. A titre d'exemple, plusieurs études ont démontré que l'AZD-235 diminuait efficacement l'expression de Mcl-1 dans plusieurs lignées cancéreuses de leucémie myéloïde aigüe (Rahmani et al., 2013), de leucémie lymphoïde aigüe (Hall et al., 2016) et de cancer du poumon (Faber et al., 2009). Ces inhibiteurs sont également pour la plupart en développement clinique pour le traitement de différents cancers solides.

La neutralisation de la voie MAPK/ERK est également rendu possible par des inhibiteurs de MEK à l'instar du PD0325901, de l'AZD6244 et du Tramétinib, ce dernier étant déjà en clinique. L'AZD6244 (selumetinib) a démontré un grand intérêt dans un essai clinique de phase II chez les patientes atteintes de cancer de l'ovaire séreux de bas grade (Ferley et al., 2013), mais également dans les cancers de l'ovaire de haut grade *KRAS* muté (Takekuma et al., 2016).

Notre équipe s'est également intéressée à l'intérêt d'inhiber les voies de signalisation PI3K/AKT/m-TOR et MAPK/ERK pour l'inhibition de Mcl-1 et la sensibilisation à l'ABT-

737. En effet, le traitement des cellules cancéreuses ovariennes dépendantes de Bcl-x_L et Mcl-1 par le BEZ235, double inhibiteur PI3K/mTOR, inhibe l'expression de Mcl-1, induit celle de Puma et sensibilise ces cellules cancéreuses à l'ABT-737 de façon dépendante de l'expression de Bim (Jebahi et al., 2014). Dans la même optique, la combinaison de l'inhibition de mTOR (AZD8055), qui réprime l'expression de Mcl-1, avec l'inhibiteur de MEK (Trametinib), qui augmente l'expression de Bim actif (non phosphorylé), sensibilise efficacement différentes cellules cancéreuses ovariennes à l'ABT-737 (Pétigny-Lechartier et al., 2017). Ces stratégies multi-cibles sont très efficaces pour inhiber Mcl-1 et sensibiliser les cellules cancéreuses. Cependant, la toxicité combinée de ces molécules et leurs effets « hors cibles » déjà identifiés pourrait limiter l'utilisation clinique de ces associations.

III.4.3.2. Inhibition directe par les BH3-mimétiques

III.4.3.2.1. MIM1 (*Mcl-1 inhibitor-molecule 1*)

MIM1 un BH3-mimétique spécifique de Mcl-1, découvert en 2010 par l'équipe de Walensky lors d'un criblage à haut débit de 71296 composés pour leur capacité à déplacer le peptide Mcl-1-SAHB_A de la poche hydrophobe de la protéine Mcl-1 (Stewart et al., 2010). Les molécules sélectionnées pendant ce premier criblage ont été soumises à un autre criblage afin d'identifier les molécules qui sont incapables de déplacer le peptide BH3 de Bad de la cavité hydrophobe de Bcl-x_L. Ainsi, le BH3-mimétique MIM1, qui s'est montré capable de déplacer le peptide Mcl-1-SAHB_A de la cavité hydrophobe de Mcl-1 sans aucun effet sur le complexe Bad/Bcl-x_L, a été sélectionné à l'issue de ce criblage (Kritzer, 2012). Son efficacité *in vitro* a été évaluée dans plusieurs lignées de leucémie.

Dans notre laboratoire, l'évaluation de l'effet cytotoxique de MIM1 à la concentration préconisée dans les précédentes études (10μM) sur les cellules cancéreuses ovariennes co-exprimant Bcl-x_L et Mcl-1 (SKOV3 et IGROV1-R10) ne les a pas sensibilisé à l'ABT-737. Néanmoins, une activité pro-apoptotique modérée a été observée sur ces même cellules à la concentration de 25μM. En revanche, l'exposition de cellules cancéreuses ovariennes dont la survie dépend uniquement de Mcl-1 (lignée A2780) à une concentration de 50μM n'a pas permis l'induction d'une apoptose massive. Par ailleurs, aucune étude *in vivo* n'a été effectuée avec cette molécule.

III.4.3.2.2. Marinopyrrole et ses dérivés

Le Marinopyrrole, ou Maritoclax, est un agent naturel dérivé d'une espèce de streptomycète marin doté d'une action antibiotique et antiproliférative (Liu et al., 2014). Il a été sélectionné pour sa capacité à perturber l'interaction de Bim avec la poche hydrophobe de Bcl-x_L et Mcl-1 en utilisant un test ELISA (Doi et al., 2012). Le Maritoclax a été décrit comme un inhibiteur spécifique de Mcl-1 qui bloque l'interaction Bim/Mcl-1 et interagit avec une affinité comparable à celle de l'Obatoclax (CI₅₀ = 10.1μM et CI₅₀ = 9.6μM respectivement). Cependant, son affinité pour Bcl-x_L est plus faible que celle de l'Obatoclax (CI₅₀ > 80μM et CI₅₀ = 19μM respectivement) (Doi et al., 2012).

Des études plus approfondies ont démontré que le Maritoclax est un inhibiteur de Mcl-1 de type différent. En effet, contrairement aux autres inhibiteurs BH3-mimétiques qui stabilisent Mcl-1 et augment son taux intracellulaire, le Maritoclax interagit avec Mcl-1 et conduit à sa dégradation par le protéasome, induisant ainsi l'apoptose dans plusieurs lignées cancéreuses leucémiques (Doi et al., 2012 ; Doi et al., 2014 ; Pandey et al., 2013). Il est aussi capable d'induire l'expression des protéines BH3-only Bim et Bmf et la sensibilisation de cellules cancéreuses aux stratégies d'inhibition de Bcl-x_L (Doi et al., 2012 ; Pandey et al., 2013).

Le Maritoclax induit également l'apoptose dans les cellules normales (Mouse Embryonic Fibroblats) et les cellules cancéreuses NSCLC (Non-Small Cell Lung Cancer) indépendamment de l'inhibition de Mcl-1. Ainsi, il provoque la fragmentation de la mitochondrie consécutive à la génération et l'accumulation de ROS, et cela de manière dépendante de Bax et Bak (Varadarajan et al., 2015). Ce résultat suggèrerait que le Maritoclax est capable d'induire différents types de mort en fonction du contexte cellulaire.

L'efficacité *in vivo* du Maritoclax a été évaluée sur des xénogreffes issues de l'injection d'une lignée de leucémie myéloïde aigüe (U937), caractérisée par une surexpression de Mcl-1. Ce composé a été administré par voie intrapéritonéale (IP) à la dose de 20mg/kg/jour pendant 28 jours. Cette étude a montré une diminution significative de la croissance tumorale qui est restée maintenue jusqu'à plus de 45 jours après la fin du traitement, avec un taux de 36.4% de réponse complète et plus de 50% de réduction dans le volume tumoral par rapport aux témoins. Cette étude n'a révélé aucune toxicité hématopoïétique, cardiaque ou d'histopathologies qui auraient pu être la conséquence de l'inhibition directe et efficace de Mcl-1 (Doi et al., 2014). Cependant, les souris traitées avec cette molécule manifestent une somnolence temporaire de 2h post traitement avec une perte de poids équivalente à 5% par

rapport aux souris non traitées. Ces observations incriminent donc un effet secondaire lié au traitement. Par ailleurs, aucune évaluation de la diminution dans la prolifération tumorale et l'augmentation de l'apoptose n'a été évaluée au niveau de la tumeur afin de démontrer un réel effet sur Mcl-1. Enfin, l'effet du Maritoclax a été évalué sur un modèle tumoral d'hémopathie maligne en addition totale à Mcl-1 mais, selon nos connaissances, aucune étude n'a démontré l'effet de cette molécule sur des tumeurs solides exprimant Bcl-x_L et Mcl-1 en agent seul ou en association avec les autres stratégies thérapeutiques.

De nouveaux dérivés du Marinopyrrole très puissants capables de perturber spécifiquement le complexe Bim/Mcl-1 ont été conçus. Parmi ces dérivés, une molécule «lead» a été identifiée. Cette dernière est capable de diminuer significativement le niveau de Mcl-1 et d'induire le clivage de la caspase 3 dans plusieurs lignées du cancer du sein. Aucune évaluation de ces molécules *in vivo* n'a pour l'instant été rapportée.

III.4.3.2.3. A-1210477

Le BH3-mimétique A1210477 est une petite molécule conçue par le groupe Abbvie dans le but d'inhiber spécifiquement la protéine Mcl-1 (Leverson et al., 2015). Son affinité est extrêmement forte pour Mcl-1 ($K_i = 0.45\text{nM}$) et ne manifeste qu'une faible affinité pour Bcl-2 ($K_i = 0.132\mu\text{M}$) et Bcl-x_L ($K_i = 0.660\mu\text{M}$). L'analyse d'interaction en utilisant le test de la co-immunoprécipitation des protéines a démontré que la liaison de l'A1210477 à Mcl-1 permet de déplacer Bim de sa poche hydrophobe et d'empêcher Mcl-1 d'interagir avec son partenaire spécifique Noxa (Leverson et al., 2015). A l'inverse, l'A1210477 est incapable de déplacer Bim ou Bcl-xs de la poche hydrophobe de Bcl-2 et Bcl-x_L respectivement. Il est également incapable de perturber l'interaction de Bad avec ces deux protéines (Leverson et al., 2015).

Cet inhibiteur est très puissant contre différentes lignées cancéreuses dépendantes de Mcl-1 telles que les cellules cancéreuses de myélome multiple (Leverson et al., 2015), de lymphomes B diffus à grandes cellules (Quentmeier et al., 2016), de cancer des poumons à petites cellules (Leverson et al., 2015) et de cancer du sein (Xiao et al., 2015). L'A1210477 sensibilise également les cellules cancéreuses à la chimiothérapie conventionnelle et manifeste une synergie avec les inhibiteurs pharmacologiques de Bcl-x_L et Bcl-2 (Kawakami et al., 2016 ; Leverson et al., 2015).

Une étude récente a démontré que l'A1210477 induit une fragmentation importante de la mitochondrie indépendante de l'inhibition de Bcl-x_L et Mcl-1. Cet effet non spécifique est dépendant de la protéine DRP-1 impliquée dans la fission mitochondriale car la répression de

cette dernière empêche la fragmentation mitochondriale et réduit significativement l'apoptose induite par cet inhibiteur (Milani et al., 2017). Le mécanisme par lequel l'A1210477 régule DRP-1 et la mitomorphologie reste encore à élucider. Ce résultat suggère un effet « hors cible » de cette molécule (Milani et al., 2017). De plus, en dépit de sa forte affinité pour Mcl-1, son efficacité sur les cellules *in vitro* est de l'ordre du micromolaire (10 μ M), et aucune étude évaluant son action anti-tumorale *in vivo* n'a été publiée, suggérant une absence d'efficacité dans les modèles précliniques.

III.4.3.2.4. S63845

La molécule S63845 est l'un des rares inhibiteurs très puissant de Mcl-1 récemment identifié par le groupe Servier. Son affinité pour Mcl-1 est remarquablement forte avec une constante de dissociation (K_D), estimée de 0.19nM par SPR et 1.2nM par FPA. De plus, son affinité est très faible pour Bcl-2 et Bcl-xL (K_D = 10,000nM par FPA), le désignant comme un inhibiteur spécifique de Mcl-1. En comparaison, le S63845 est 20 fois plus affin pour Mcl-1 que l'inhibiteur A1210477 conçu par Abbvie. La structure co-cristallisée du complexe S63845/Mcl-1 révèle que cet inhibiteur est un BH3-mimétique capable d'interagir avec la cavité hydrophobe de Mcl-1 et d'occuper par son squelette aromatique et son groupement trifluorométhyle terminal les poches p2 et p4 respectivement. Son groupement carboxyle interagit avec l'Arg²⁶³ et mime ainsi le résidu Aspartate du domaine BH3 (Kotschy et al., 2016).

Le composé S63845 inhibe efficacement Mcl-1 *in vitro* et induit une apoptose massive dans des modèles cellulaires d'hémopathies malignes et cancers solides exprimant fortement Mcl-1. Les analyses de co-immunoprécipitation et les expériences de knockout ont démontré que ce BH3-mimétique induit l'apoptose dans les cellules de manière dépendante de Bax ou Bak. Cependant, il est incapable de déplacer Bax et Bak de la poche hydrophobe des autres membres anti-apoptotiques. En comparaison avec l'inhibiteur d'Abbvie (A-1210477), le S63845 est beaucoup plus actif du fait de sa grande affinité pour Mcl-1, mais également pour son affinité très faible pour les protéines du sérum, permettant une biodisponibilité suffisante pour effectuer pleinement sa fonction (Leverson et al., 2015 ; Kotschy et al., 2016).

Le BH3-mimétique S63845 a été évalué pour son efficacité *in vivo* sur des xénogreffes de myélome multiple. L'administration par voie intraveineuse (IV) exerce une activité anti-tumorale dose-dépendante avec une régression complète des tumeurs de la plupart des souris traitées. Des résultats similaires ont été obtenus sur d'autres modèles de xénogreffes

établies à partir de lignées hématologiques telles que les lymphomes et la leucémie myéloïde chronique. La dose optimale qui ne provoque aucune intolérance ou effet indésirable sur les tissus normaux a été estimée à 25mg/kg (Kotschy et al., 2016).

Le composé S63845 a également été évalué sur plusieurs lignées cellulaires dérivées de tumeurs solides. Un tiers des cellules issues de mélanome et du cancer du sein sont sensibles au S63845 et cette sensibilité est inversement corrélée avec l'expression de Bcl-x_L. La combinaison du BH3-mimétique S63845 avec d'autres médicaments qui ciblent les kinases oncogéniques telles que le Tramétinib (inhibiteur de MEK) ou le Vemurafenib (inhibiteur de Raf) permet d'induire l'apoptose dans des lignées tumorales de plusieurs cancers solides (Kotschy et al., 2016). Dans la même optique, l'équipe de Lindeman a récemment évalué l'intérêt de combiner l'inhibiteur de Mcl-1 avec la chimiothérapie ou la thérapie ciblée dans le traitement des cancers du sein (Merino et al., 2017). Le BH3-mimétique S63845 sensibilise ainsi *in vitro* des lignées tumorales et des cellules dérivées de PDX (Patient Derived Xenograft) de cancer du sein au docétaxel, au Lapatinib et au Trastuzumab. L'évaluation de l'effet de ces combinaisons sur les mêmes PDX implantées chez la souris montre une absence d'effet en agent seul, une bonne tolérance à la combinaison et un ralentissement dans la croissance tumorale. Les tumeurs reprennent leur prolifération après l'arrêt du traitement par la combinaison, suggérant une plus faible efficacité de cet inhibiteur dans les cancers solides (Merino et al., 2017). Ces résultats démontrent toutefois que Mcl-1 est capable d'être inhibé de façon directe par des BH3-mimétiques dont l'administration *in vivo* est tolérable et capable d'entraîner une réponse dans plusieurs types de tumeurs.

III.4.4.1. Pyridoclax : exemple d'un inhibiteur de la famille des oligopyridines

En 2015, en collaboration avec le Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN, EA4258, Caen) (Pr Anne Sophie Voisin-Chiret et Pr Jana Sopkova-de Oliveira Santos) notre laboratoire a développé un nouvel inhibiteur de Mcl-1 appartenant à la famille des oligopyridines. Cette famille de molécule est constituée de foldamères abiotiques basée sur un squelette pyridyl. La coopération entre les études de modélisation bio-informatique, de chimie et de biologie a permis de concevoir, synthétiser et tester ces molécules pour leur efficacité à mimer le domaine BH3 de Noxa et à inhiber l'activité anti-apoptotique de Mcl-1. Les tests d'interaction protéine-protéine associant la résonance plasmonique de surface (SPR) (Dr Frédéric Lopez et Dr Laetitia Ligat, Inserm U103,

Toulouse) et le BRET (Dr Philippe Juin et Dr Fabien Gautier, Inserm U982) ont permis de mettre en évidence le Pyridoclax comme le chef de file de cette série de molécules. L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'un dépôt de brevet international en mars 2014.

Le Pyridoclax est une petite molécule composée d'un squelette pyridyl sur lequel sont projetées des substitutions latérales mimant les chaînes latérales de l'hélice α du domaine BH3 de Noxa. Il est constitué de 4 pyridines successives dont les deux centrales portent respectivement un méthyle et un styryl en position $i+4$ et $i+7$. Le groupement styryle en position $i+7$ mime le résidu phénylalanine spécifique de Noxa en cette même position et augmente ainsi la sélectivité du Pyridoclax envers Mcl-1. L'azote terminal du Pyridoclax interagit avec l'Arg²⁶³ conservée de Mcl-1, mimant ainsi l'acide aspartique du domaine BH3 (Gloaguen et al., 2015). Le Pyridoclax interagit avec une affinité de l'ordre du nanomolaire ($K_d = 25\text{nM}$) avec Mcl-1 et permet de déplacer Bim de sa poche hydrophobe (Gloaguen et al., 2015).

L'efficacité cytotoxique du Pyridoclax a été évaluée dans nos modèles cellulaires de cancer ovarien. A la dose de $25\mu\text{M}$, le Pyridoclax sensibilise les cellules cancéreuses ovariennes (et plusieurs autres) aux stratégies dirigées contre Bcl-x_L (siRNA contre Bcl-x_L ou inhibition pharmacologique par l'ABT-737) et induit l'apoptose. Les analyses d'immunoprécipitation ont démontré que le Pyridoclax déplace Bak et Bim de Mcl-1. Comme les BH3-mimétiques, le Pyridoclax induit l'expression de Noxa en réponse au stress du RE sans que cette dernière ne soit impliquée dans le processus apoptotique provoqué par la molécule (Gloaguen et al., 2015). Le Pyridoclax a également montré une activité *in vitro* comparable au S63845, de l'ordre du micromolaire, sur des modèles de lymphomes (résultats non publiés, Collaboration Dr. Gaël Roué, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer [IDIBAPS], Barcelone, Espagne). Une nouvelle série de molécules de la famille des oligopyridines mimes de Noxa a été synthétisée et évaluée sur les modèles cellulaires des cancers de l'ovaire lors de mon travail de thèse, et font l'objet d'une publication en cours de finalisation.

L'efficacité préclinique *in vivo* du Pyridoclax est en cours d'évaluation dans notre laboratoire et a fait l'objet principal de mon travail de thèse. Les résultats obtenus seront donc illustrés dans le chapitre résultats *in vivo* de ce manuscrit.

Contexte et objectifs de la thèse

La première partie de ce manuscrit a mis en évidence la gravité des cancers de l'ovaire et a souligné la nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant d'améliorer leur prise en charge. L'identification préalable, par les travaux antérieurs du laboratoire et de la communauté scientifique internationale, des protéines Bcl-x_L et Mcl-1 comme des acteurs majeurs de la survie des cancers ovariens a ouvert de nouvelles perspectives en terme d'opportunités thérapeutiques pour la prise en charge de ces cancers. Cependant, les modalités d'inhibition optimale de l'expression ou de l'activité de ces protéines restent à définir avant qu'une application clinique puisse être mise en œuvre.

Les différentes possibilités de modulation indirecte de l'activité ou de l'expression de ces protéines anti-apoptotiques ont été présentées dans l'introduction générale de ce manuscrit. L'intérêt d'un certain nombre de ces possibilités est en cours d'investigation dans notre équipe mais ces stratégies ne constituent pas l'objet de mon projet de thèse. En effet, j'ai focalisé mon attention sur la recherche d'inhibiteurs pharmacologiques directs de ces protéines, et plus particulièrement de Mcl-1.

Concernant l'inhibition de Bcl-x_L, la découverte par les laboratoires Abbvie de l'ABT-263 (ou Navitoclax) a en effet constitué une avancée majeure dans le domaine de l'inhibition de Bcl-2 et Bcl-x_L, ainsi que dans la mise au point de l'inhibiteur spécifique de Bcl-2, l'ABT-199 (ou Venclaxta®). Ces deux inhibiteurs sont engagés dans une démarche de validation clinique, qui a déjà abouti pour le Venclaxta à une autorisation accélérée par la FDA de mise sur le marché aux USA pour le traitement de certaines leucémies particulièrement agressives. Concernant le Navitoclax, notre équipe s'est engagée aux côtés du CLCC F. Baclesse et du groupe coopérateur Arcagy-Gineco pour la mise en œuvre d'un essai clinique actuellement en cours d'analyse, visant à évaluer l'intérêt de cette molécule en monothérapie chez des patientes atteintes de cancers de l'ovaire chimiorésistants. Notre équipe a en effet montré dans une étude menée *ex vivo* sur des tranches de tumeurs ovariennes humaines exposées à l'ABT-737, qu'une réponse pouvait être observée dans les tumeurs présentant un fort niveau d'expression de Bim et un faible niveau d'expression de Mcl-1 et de P-ERK (Lheureux et al., 2015).

En revanche, l'inhibition de Mcl-1 reste un challenge majeur pour la communauté internationale, pour les raisons principalement structurales qui ont été évoquées précédemment. Divers inhibiteurs directs de Mcl-1, plus ou moins spécifiques et efficaces, ont été décrits dans la littérature, tel que présenté précédemment. Cependant, jusqu'à récemment,

aucune molécule efficace *in vivo* n'avait été décrite et aucun d'entre elles n'est encore utilisée en essai clinique à notre connaissance.

De tels inhibiteurs de Mcl-1 présenteraient un intérêt en tant que tels pour l'induction de l'apoptose dans les tumeurs solides dont la survie dépend strictement de Mcl-1. La définition de tels outils est d'autant plus importante que la littérature récente montre le rôle majeur de Mcl-1 dans la carcinogénèse d'une grande variété de localisations tumorales et a progressivement conduit à la désignation de Mcl-1 comme une cible thérapeutique prioritaire (Beroukhim et al., 2010). Par ailleurs, la surexpression de Mcl-1 est identifiée comme l'un des facteurs majeurs de résistance aux inhibiteurs de Bcl-x_L (Navitoclax®) ou de Bcl-2 (Venclaxta®) tel que présenté plus haut. Son inhibition représente donc un double intérêt.

L'inhibiteur de Mcl-1 développé par le Laboratoire Servier présente un certain intérêt *in vitro* et *in vivo* sur des tumeurs hématologiques lymphoïdes, myéloïdes et certaine leucémie (Kotschy et al, 2016). Son activité *in vitro* est de l'ordre du nanomolaire et son efficacité est étroitement liée à l'expression de Mcl-1. En revanche, il semble que son activité soit moindre sur les tumeurs solides *in vivo* (Merino et al, 2017). Il ouvre cependant un réel espoir de voir l'inhibition pharmacologique de Mcl-1 utilisable prochainement en clinique, sans toxicité associée.

C'est dans cette perspective que notre Unité s'est engagée dans un programme d'identification de molécules innovantes potentiellement inhibitrices de Mcl-1.

L'association des expertises du CERMN (Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie, EA4258) et de notre Unité a permis d'identifier des molécules originales, appartenant à la famille des oligopyridines dont la synthèse a été développée par le CERMN, comme inhibitrices de Mcl-1.

Les travaux antérieurs de l'Unité ont démontré l'intérêt de ces molécules et permis d'identifier le lead de la série, le Pyridoclax (MR 29072). Cette molécule est capable d'interagir physiquement avec Mcl-1 et de la séparer des protéines pro-apoptotiques qu'elle séquestre. Le Pyridoclax sensibilise les lignées tumorales ovariennes aux inhibiteurs de Bcl-x_L *in vitro* et est actif en agent seul sur les lignées dont la survie dépend uniquement de Mcl-1.

L'objectif principal de ma thèse était : (i) de travailler sur des molécules dérivées du Pyridoclax, proposées et synthétisées à l'issue d'un travail de modélisation moléculaire basé sur l'interaction de Noxa avec Mcl-1, pour identifier de meilleurs mimes du domaine BH3 de

Noxa susceptibles de présenter une activité plus importante que celle du Pyridoclax ; (ii) d'identifier de nouvelles molécules inhibitrices de Mcl-1 en collaboration avec d'autres équipes de chimie ; (iii) d'évaluer le potentiel anti-tumoral du Pyridoclax (ou de ses dérivés) *in vivo*, sur des modèles de xénogreffes sous-cutanées de cancers ovariens humains.

Au cours des quatre chapitres suivants, je vous présenterai tout d'abord les résultats liés à l'évaluation biologique *in vitro* des trois familles de molécules étudiées (dérivés du Pyridoclax et analogues de MIM1) pour finir par la présentation des travaux réalisés *in vivo* avec le Pyridoclax.

Résultats *in vitro*

Partie I : Identification de nouveaux inhibiteurs de la famille des Oligopyridines

Intérêt de la molécule MR31367, dérivée du Pyridoclaxet mime de Noxa

Préambule

A la suite des travaux réalisés par notre Unité sur le Pyridoclast et ses dérivés (Gloaguen et al., 2015), nous nous sommes engagés dans la recherche d'analogues du Pyridoclast plus actifs et/ou plus solubles. Les études de relations structure/activité réalisées sur la première série de dérivés du Pyridoclast ont permis d'identifier des fonctions chimiques indispensables à l'activité du Pyridoclast sur Mcl-1, telles que présentées sur la Figure 63. Ainsi, les motifs hydrophobes méthyle et styryle et au moins l'un des azotes présents sur les pyridines terminales sont des éléments essentiels à l'ancrage du Pyridoclast dans la poche hydrophobe de Mcl-1 et à son activité pro-apoptotique.

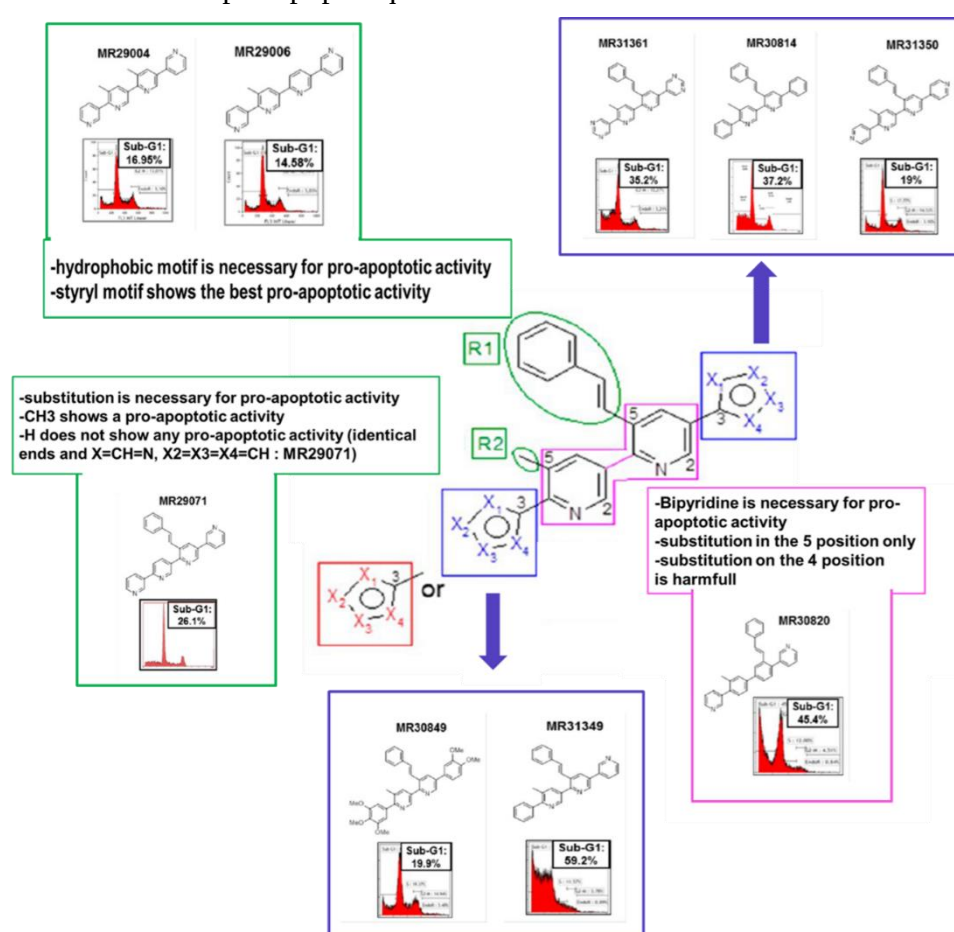


Figure 63. Relation structure-activité.

Les dérivés du Pyridoclast obtenus par la substitution de différents motifs chimiques constituant le squelette du Pyridoclast (motifs encadrés) ont été évalués pour leur activité biologique et ont permis de mettre en évidence les fonctions chimiques indispensables à l'activité du Pyridoclast (D'après Gloaguen et al., 2015).

La possibilité d'éliminer un des deux atomes d'azote sur l'une des pyridines terminales sans perdre l'activité inhibitrice de Mcl-1 ouvre des perspectives de substitution intéressantes.

La recherche d'analogues du Pyridoclax plus actifs apparaît d'autant plus pertinente que le Pyridoclax est actif sur les cellules tumorales ovariennes à des concentrations de l'ordre de 25µM. En comparaison, l'ABT-737 est actif à partir de concentrations comprises entre 1 à 5µM alors que d'autres inhibiteurs de Mcl-1 ont montré une forte efficacité anti-tumorale sur différents types de cellules cancéreuses à des concentrations allant de 1 à 10µM. Par ailleurs, la solubilité du Pyridoclax reste médiocre et a nécessité la synthèse du chlorhydrate de Pyridoclax, plus soluble en milieu aqueux, pour une utilisation *in vivo*. La recherche de dérivés plus solubles présente donc un intérêt évident pour l'utilisation de ces molécules *in vivo*.

L'objectif de ce travail était donc : (i) d'explorer le site de liaison spécifique de Mcl-1 avec son partenaire sélectif Noxa pour déterminer les résidus clés de la poche hydrophobe impliqués dans cette interaction ; (ii) d'explorer un espace chimique nouveau conservant les éléments essentiels du Pyridoclax mais apportant une diversité structurale permettant d'augmenter la puissance de l'interaction avec Mcl-1.

Compte tenu des éléments présentés plus haut, nous avons donc choisi de réaliser des modifications portant sur l'une des deux pyridines terminales, avec une série désignée comme série « up » lorsque la pyridine située du côté du styryle est modifiée, et une série « down » lorsque la pyridine située à proximité du méthyl est remplacée. Les motifs chimiques introduits ont été choisis sur la base de l'identification des résidus clés de la reconnaissance Mcl-1/Noxa par modélisation moléculaire, détaillée plus loin. Le CERMN a ainsi procédé à la sélection et à la synthèse de ces molécules, que nous avons ensuite criblées *in vitro* afin de sélectionner les plus actives.

Cette étude de validation a comporté : (i) une évaluation de l'activité de ces dérivés dans la lignée cancéreuse de l'ovaire IGROV1-R10 dont la survie est dépendante de Bcl-x_L et Mcl-1 (ces molécules ont été testées en agent seul ou en combinaison avec les stratégies d'inhibition de Bcl-x_L (siXL ou ABT-737)) ; (ii) une évaluation des interactions du Pyridoclax avec Mcl-1 « *in cellulo* » par une étude de BRET (collaboration avec Dr. Fabien Gautier et Dr. Philippe Juin, INSERM U1232, Nantes) ; (iii) une étude de résonance plasmonique de surface (SPR, collaboration avec Dr. Frédéric Lopez et Laetitia Ligat, INSERM U1037, Toulouse). La molécule la plus intéressante de cette série a ensuite été sélectionnée pour une évaluation

biologique sur d'autres lignées cancéreuses et normales et son mécanisme d'action a été caractérisé de façon plus approfondie.

I.1. Conception des dérivés du Pyridoclastax mimes de Noxa

Tel que détaillé précédemment, l'activité des protéines anti-apoptotiques est contrecarrée par les protéines pro-apoptotiques BH3-only. Ces dernières sont classées en BH3-only activateurs tels que Bim, Bid et Puma, et en sensibilisateurs tels que Bad et Noxa. Le rôle principal des BH3-only sensibilisateurs est d'interagir avec les protéines anti-apoptotiques pour libérer les effecteurs pro-apoptotique Bax et Bak et leurs activateurs pour aboutir à l'induction de la mort par apoptose des cellules cancéreuses. Contrairement à Bad qui interagit avec la plupart des protéines Bcl-2-like, Noxa est très sélectif pour Mcl-1 et Bfl-1 (Chen et al, Molecular Cell 2005). Il apparaît donc pertinent de concevoir de nouveaux inhibiteurs spécifiques de Mcl-1 sur la base de la structure de Noxa.

Les études de structure 3D du complexe Mcl-1/Noxa effectuées par le groupe de modélisation du CERMN ont démontré que cette interaction impliquerait 4 résidus hydrophobes Cys25, Leu29, Phe32, et Leu36 projetés sur la même face de l'hélice α en position i , $i+4$, $i+7$ et $i+11$ respectivement, et occupant les poches hydrophobes p1-p4 de Mcl-1 (Figure 64A).

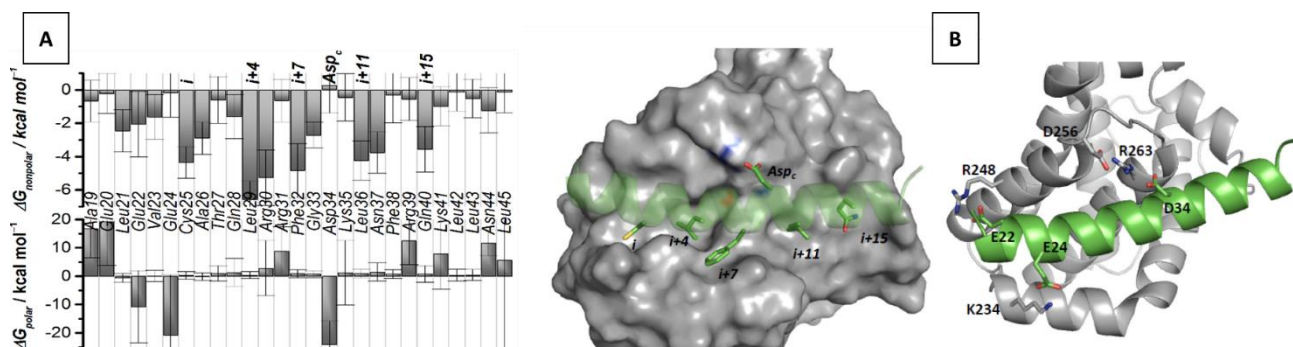


Figure 64. Dynamique moléculaire du complexe Mcl-1/Noxa.

(A) Histogramme d'énergie libre moyenne des résidus clés non-polaires (histogramme du haut) et polaires (histogramme du bas) contribuant à l'interaction du domaine BH3 de Noxa avec la poche hydrophobe de Mcl-1. Le docking du complexe Mcl-1 (en gris) et Noxa (hélice en vert) montre les résidus clés projetés en i , $i+4$, $i+7$, $i+11$ et $i+15$ dans lequel Mcl-1 est représentée en gris, le domaine BH3 de Noxa en vert, les résidus chargés positivement en bleu, et les résidus chargés négativement en rouge. (B) Dynamique moléculaire du complexe Mcl-1/Noxa présentant les résidus électrostatiques Glu22, Glu24 et Asp34 de Noxa interagissant respectivement avec Arg248, Lys234 et l'Arg263 de Mcl-1.

En plus de ces résidus hydrophobes, une forte énergie d'interaction a été également détectée entre la poche hydrophobe de Mcl-1 et les résidus Arg30 et Gln40 situés en position $i+5$ et $i+15$ respectivement (Figure 64A). L'interaction entre Mcl-1 et le résidu en position $i+15$ du domaine BH3 est commune chez toutes les protéines BH3-only telles que Puma, Bim et Bad (Fogha et al, *Journal of Chemical Information and Modeling*, sous presse). Le complexe Mcl-1/Noxa implique également des interactions électrostatiques essentielles : Glu22 (en position $i-3$), Glu24 (en position $i-1$) et Asp34 (en position $i+9$) qui interagissent respectivement avec Arg248, Lys234 et l'Arg263 de Mcl-1 (Figure 64B).

La Lysine 234 est très spécifique de Mcl-1 ; elle est remplacée par une Gln dans Bcl-x_L et Bcl-2. Cette Lysine interagirait avec d'autres résidus des BH3-only tels que le Glu136 de Puma. Les analyses de Simulation de Dynamique Moléculaire (MDS) (permettant de déterminer les scores d'interaction entre les différents résidus) ont démontré que le temps d'interaction de la Lys234 de Mcl-1 avec le Glu136 de Puma représentait 24% du temps de la simulation, alors que celui de l'interaction avec le Glu24 de Noxa est estimé à environ 50% du temps (Fogha et al, *Journal of Chemical Information and Modeling*, sous presse). Par ailleurs, une étude de mutagenèse effectuée sur Bim a révélé que la substitution du Tryptophane en position $i-1$ dans le domaine BH3 de Bim par un Glutamate augmente l'affinité de Bim envers Mcl-1 (Boersma et al, 2008), suggérant que l'apport d'un Glu en position $i-1$ entraîne une l'interaction avec la Lysine et augmente l'affinité et la spécificité de l'interaction avec Mcl-1.

Nous nous sommes donc attachés à mimer le Glu en position $i-1$ pour cibler la Lysine 234 afin d'augmenter l'affinité des nouveaux dérivés envers Mcl-1 et d'améliorer ainsi leur activité biologique.

De ce fait, une nouvelle série de molécules a été conçue et synthétisée par le CERMN sur la base de la structure du Pyridoclax (lead de la première génération de molécules de la famille des oligopyridines). Ces dérivés conservent les deux pyridines centrales à partir desquelles sont projetés le méthyle et le styryle, et l'une des pyridines terminales. L'azote de l'autre pyridine terminale est substitué par différents groupements chargés qui miment le Glu en position $i-1$ de Noxa, et qui sont susceptibles d'établir des interactions avec la Lysine 234 de Mcl-1 (Figure 65).

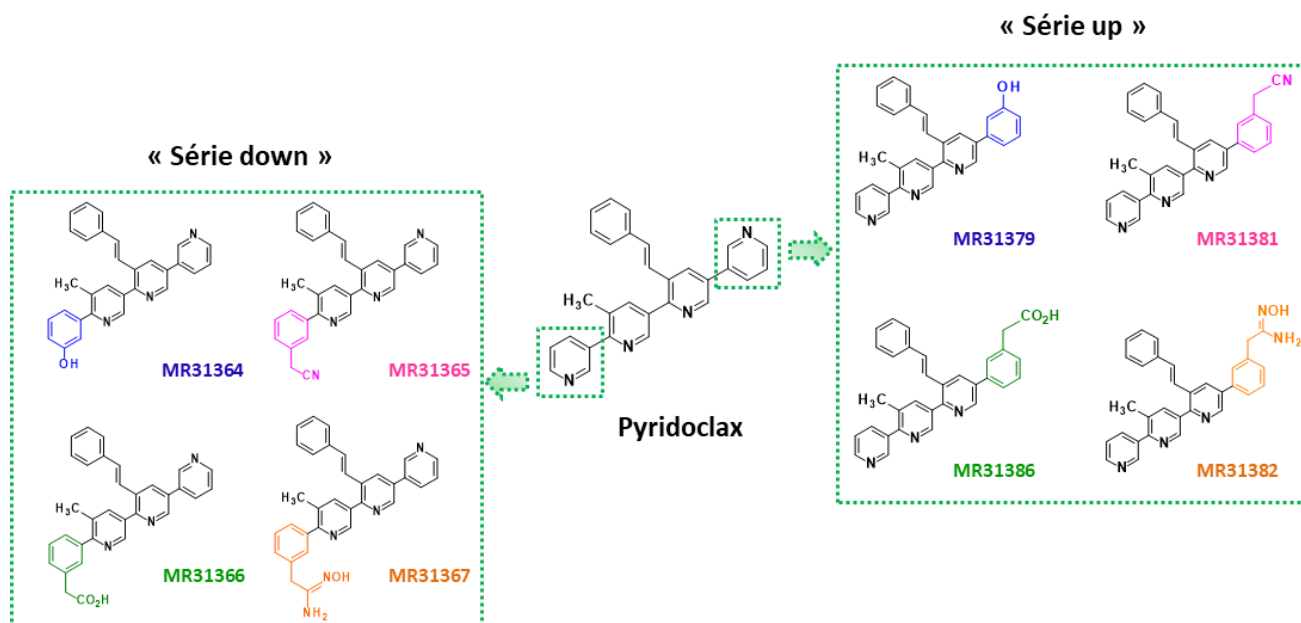


Figure 65. Les dérivés du Pyridoclax, mimes de Noxa. Ces molécules ont été générées en substituant l'azote d'une des deux pyridines terminales du Pyridoclax par 4 motifs différents classés en série « up » et « down ».

L'utilisation des méthodes de docking moléculaire pour modéliser l'insertion du Pyridoclax dans la poche hydrophobe de Mcl-1 ont suggéré que le Pyridoclax peut prendre deux orientations différentes (Gloaguen et al, 2015). En se référant à ces résultats, chaque groupement chargé a été placé sur l'une ou l'autre des extrémités du squelette de base du Pyridoclax à la place d'un des atomes d'azote porté sur l'une des pyridines terminales, générant ainsi huit nouveaux dérivés classés en séries complémentaires « up » et « down » tel que présenté dans la Figure 65. Les substituants utilisés sont les suivants :

- Un hydroxyle pour la MR31364 (down) et la MR31379 (up)
- Un acétonitrile pour la MR31365 (down) et la MR31381 (up)
- Un acide acétique pour la MR31366 (down) et la MR31386 (up)
- Un acétamidoxime pour la MR31367 (down) et la MR31382 (up)

Tableau 4. Tableau récapitulatif des différentes molécules et leur substitution respective

Molécules	MR31364	MR31379	MR31365	MR31381	MR31366	MR31386	MR31367	MR31382
Structures								
Nomenclature de la substitution	Hydroxyle	Hydroxyle	Acétonitrile	Acétonitrile	Acide acétique	Acide acétique	Acétamidoxime	Acétamidoxime

Les études de docking moléculaire ont démontré que de manière similaire au Pyridoclax, chacun des dérivés s'insère dans le sillon hydrophobe et occupe les poches P2 et P4 de Mcl-1. Ces molécules, comme le Pyridoclax, présentent deux positions différentes dans la cavité hydrophobe de Mcl-1 et engagent le cycle aromatique du styryl dans une position similaire à celle retrouvé avec le Pyridoclax, c'est-à-dire proche du Phe270 (Figure 66). Dans la première position, l'azote de la pyridine terminale des nouvelles molécules est en contact avec l'Arginine 263 de Mcl-1 et le substituant polaire créé, contrairement à l'azote de la Pyridine terminale du Pyridoclax, va chercher la Lys234 comme illustré par la MR31367 et le Pyridoclax sur la Figure 66A. Dans la seconde position, le substituant polaire se retrouve proche de l'Arg263 (Figure 66B).

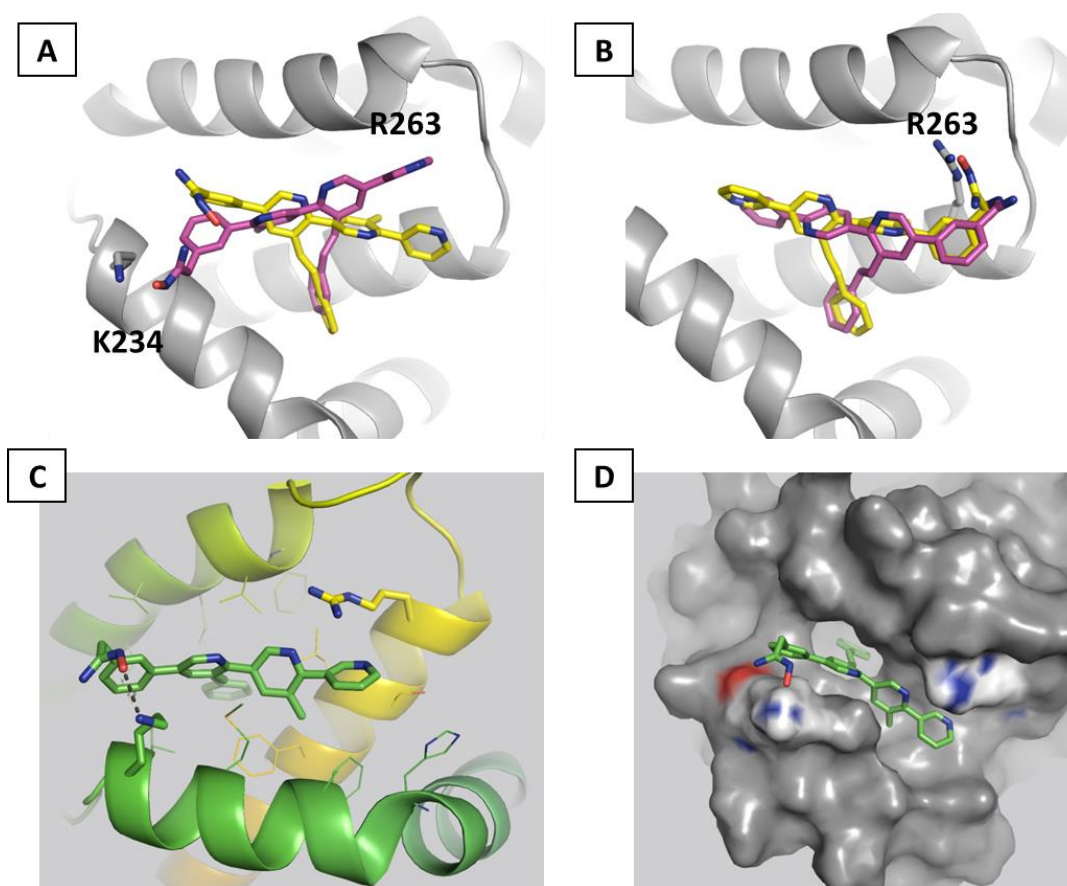


Figure 66. Docking moléculaire de l'interaction entre Pyridoclax et MR31367 avec Mcl-1.

Superposition du Pyridoclax (jaune) et de la MR31367 (violet) dans la poche hydrophobe de la protéine humaine Mcl-1 (h-Mcl-1) (hélices grises) dans la première (A) et la deuxième position (B). Le Pyridoclax est représenté en jaune, la MR31367 en violet et la poche hydrophobe de Mcl-1 en gris. Exemple de l'interaction de la MR31367 avec la poche hydrophobe de h-Mcl-1 établie par les études de dynamique moléculaire : la protéine Mcl-1 est représentée sous forme d'hélice α (C) ou de surface grise (D). Les résidus chargés positivement sont en bleu et les résidus chargés négativement sont en rouge.

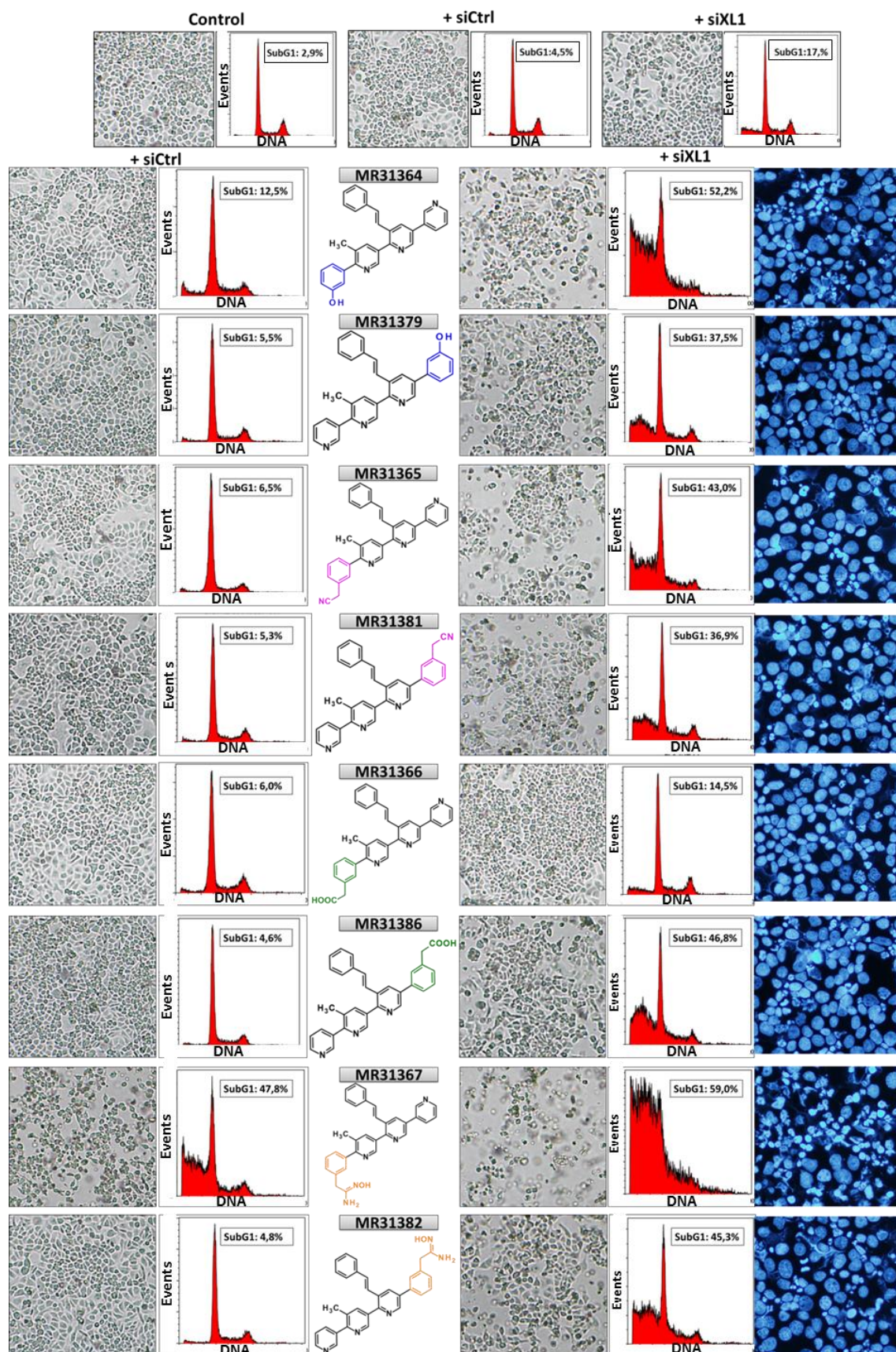


Figure 67. Evaluation de l'effet des dérivés du Pyridoclox sur l'apoptose.

Les cellules IGROV1-R10 ont été traitées avec les 8 molécules à la concentration de 25µM après 48h de traitement avec un ARN interférent dirigé contre Bcl-x_L (siXL1, panel de droite) ou un ARN interférent contrôle (siCtrl, panel de gauche). Après 24h de traitement, l'effet de ces différents traitements sur la morphologie cellulaire et nucléaire et la répartition des cellules dans le cycle a été analysé.

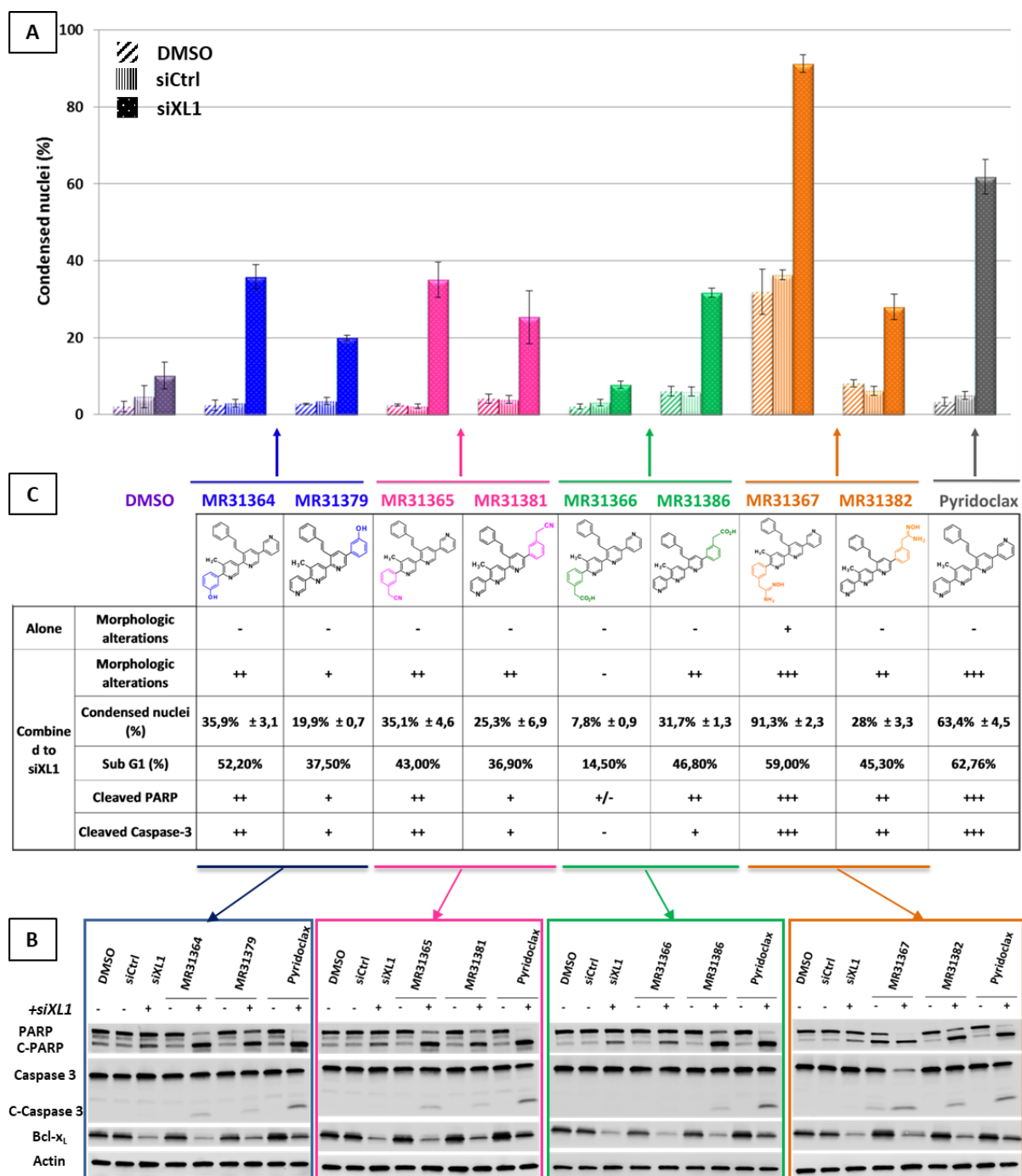


Figure 68. Evaluation de l'effet des dérivés du Pyridoclastax sur l'apoptose.

Les cellules IGROV1R-10 ont été traitées par les différentes molécules à la dose de 25µM en agent seul ou en combinaison avec siXL1. Après 24h de traitement, l'apoptose induite par ces différents traitements et présentée Figure 67 a été évaluée **(A)** par comptage des noyaux condensés et **(B)** l'étude de l'expression de la caspase 3 et de la PARP clivées. **(C)** Tableau récapitulatif des altérations morphologiques de l'apoptose induites par les différentes molécules.

I.2. Evaluation biologique des dérivés du Pyridoclax

L'évaluation biologique de ces nouvelles molécules synthétisées a été effectuée sur la lignée cancéreuse IGROV1-R10, dépendante de Bcl-x_L et Mcl-1. Cette lignée cellulaire est un modèle très adapté pour le criblage de molécules inhibitrices des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Gloaguen et al, 2015). En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de Bcl-x_L (siXL1 ou une molécule pharmacologique ABT-737) en agent seul n'a aucun effet sur ces cellules alors que sa combinaison avec un inhibiteur de Mcl-1 induit une apoptose massive. L'utilisation d'un tel modèle cellulaire permet de sélectionner les molécules ayant un effet en combinaison avec les inhibiteurs de Bcl-x_L et d'éliminer rapidement les molécules ne présentant pas d'activité biologique avérée. Néanmoins, ces molécules sélectionnées ne pourront pas être considérées comme inhibitrices directes de Mcl-1 sans des études d'interactions protéine-protéine complémentaires. En effet, certaines molécules sont capables de déréguler indirectement Mcl-1, à l'instar du cisplatine qui diminue l'expression de Mcl-1 (Varin et al, 2010), induisant ainsi une apoptose massive dans les cellules IGROV1-R10 lorsqu'il est associé avec un inhibiteur de Bcl-x_L. Les molécules hits devront donc par la suite être validées par des études de BRET et de SPR.

I.2.1. Evaluation de l'activité pro-apoptotique

Les huit molécules dérivées du Pyridoclax et mimes de Noxa (MR31364, MR31379, MR31365, MR31381, MR31366, MR31386, MR313667, MR31382) ont d'abord été évaluées pour leur activité pro-apoptotique en agent seul à 25µM ou en combinaison avec un ARN interférent dirigé contre Bcl-x_L (siXL1) sur la lignée IGROV1-R10. Le choix de cette dose a été établi sur la base des résultats précédemment obtenus avec le Pyridoclax. Ce dernier présente une activité pro-apoptotique à la concentration de 25µM. La toxicité de ces analogues du Pyridoclax a été évaluée par l'étude de la morphologie cellulaire, de la fragmentation nucléaire par coloration DAPI des noyaux et par la détection du pic pré-G1 par cytométrie en flux (Figure 67, 68A et 68C).

L'exposition de ces cellules tumorales ovariennes à ces molécules pendant 24h montre que ces molécules ne présentent pas d'activité cytotoxique en agent seul, à l'exception de la MR31367. Cette molécule a une activité modérée révélée par un détachement cellulaire et un pic pré-G1 visible sur les histogrammes de contenu en ADN obtenus par cytométrie en flux.

La combinaison avec le siXL1 a démontré que toutes ces molécules ont une activité cytotoxique, excepté la MR31366 qui n'a aucun effet sur cette lignée cellulaire (Figure 67, 68A et 68C). L'intensité de l'apoptose, évaluée à partir du pourcentage de cellules en pré-G1 et de noyaux condensés, est plus fortement prononcée lorsque les cellules sont traitées avec la MR31367 par rapport aux autres molécules (MR31364, MR31379, MR31365, MR31381, MR31386, MR31382) (Figure 67, 68A et 68B).

De manière intéressante, les molécules porteuses de la substitution en « down » à proximité du méthyle (MR31364, MR31365, MR31367) présentent une activité pro-apoptotique supérieure à celles des molécules porteuses de la même substitution en « up », du côté du styryl (MR31379, MR31381, MR31382 et MR31386), suggérant que la position de la substitution polaire joue un rôle important dans l'activité pro-apoptotique de ces dérivés. Cette observation a été confirmée par la quantification des noyaux condensés ou fragmentés (Figure 68A) et par évaluation du clivage de la caspase 3 et de la PARP par western-blot (Figure 68B). Les caractéristiques apoptotiques induites en réponse aux différents traitements seuls ou combinés au siXL-1 ont été résumées dans la Figure 68C.

Les mêmes résultats ont été obtenus en combinant ces molécules avec l'inhibiteur pharmacologique de Bcl-x_L, ABT-737 (résultats non montrés). En effet, l'exposition des IGROV1-R10 à ces molécules à la dose de 25µM pendant 24h a démontré que la MR31366 reste incapable de sensibiliser cette lignée cancéreuse à l'ABT-737. De plus, la MR31367 conserve sa forte activité pro-apoptotique, et sensibilise ainsi les cellules à l'ABT-737. Les autres molécules, quant à elles, sensibilisent modérément à l'ABT-737, à l'instar de ce qui a été observé avec l'association avec siXL1.

A partir de ces premiers résultats, nous avons conclu que la substitution de l'azote d'une des pyridines terminales par différents motifs chimiques dans le but de mimer l'acide glutamique de Noxa, permet de conserver un effet sensibilisateur à l'inhibition de Bcl-x_L dans la lignée cancéreuse ovarienne IGROV-R10, exception faite de la MR31366. L'activité pro-apoptotique varie selon les molécules. Ainsi, la MR31367 semble être la plus active et représente le hit de cette série. Ce dérivé a donc été sélectionné pour une étude comparative approfondie vis-à-vis de l'activité du Pyridoclast.

1.2.1.1. Effet de la MR31367 versus Pyridoclast à la concentration de 25µM

Dans l'objectif de trouver un nouveau lead de la famille des Oligopyridines, nous avons décidé de comparer l'effet sur l'apoptose de la MR31367 avec celui du Pyridoclast à la dose de 25µM (Figure 69).

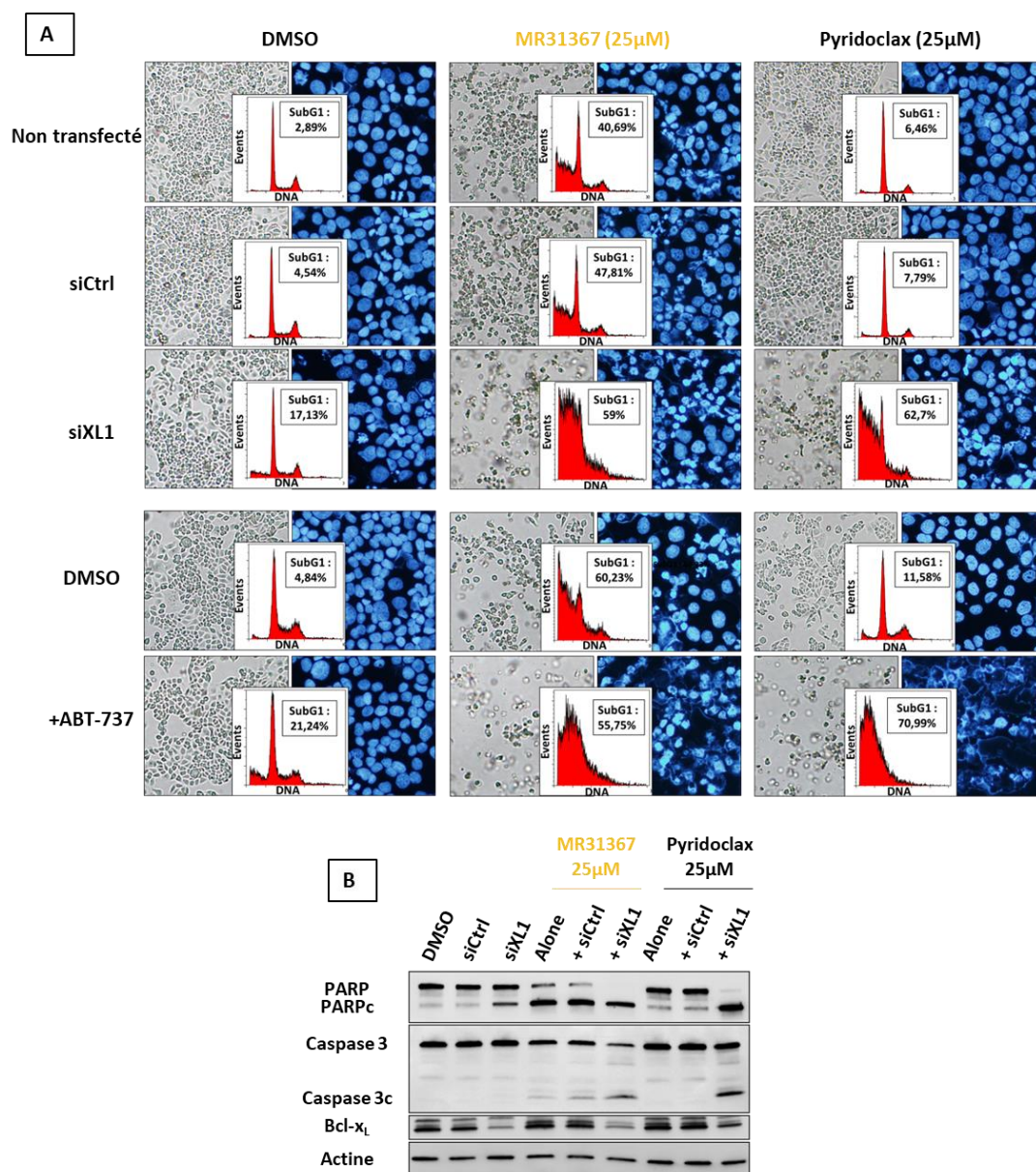


Figure 69. Comparaison de l'effet pro-apoptotique entre la MR31367 et le Pyridoclast.

Les cellules IGROV1-R10 sont traitées avec la MR31367 ou le Pyridoclast à la concentration de 25µM en agent seul ou en combinaison avec les stratégies dirigées contre Bcl-xL (siXL1, ABT-737). **(A)** Après 24h de traitement, l'effet de ces différents traitements sur la morphologie cellulaire et nucléaire et la répartition des cellules dans le cycle a été analysé. **(B)** Les expressions de Bcl-x_L, de la caspase 3 et de PARP ont été étudiées par western blot.

Le traitement des IGROV1-R10 avec la MR31367 ou le Pyridoclastax en combinaison avec les stratégies d'inhibition de Bcl-x_L (siXL1/ABT-737) a révélé une activité pro-apoptotique équivalente entre ces deux molécules (Figure 69) représentée par un arrondissement des cellules et leur décollement, une abondante fragmentation nucléaire et un important pic pré-G1. Cette observation a été confirmée en western blot par le clivage de la caspase 3 et de la PARP. Cependant, contrairement au Pyridoclastax, une activité pro-apoptotique a été observée avec la MR31367 en agent seul. Cette observation suggère que la MR31367 exerce un effet hors cible ou qu'elle agit comme un « dual inhibiteur » capable d'inhiber à la fois Bcl-x_L et Mcl-1.

I.2.1.2. Effet de la MR31367 versus Pyridoclastax utilisés à de faibles concentrations

Nous avons par la suite procédé à l'évaluation de l'effet de la MR31367 à des concentrations plus faibles (10 et 15µM) en agent seul ou en combinaison avec l'ABT-737 sur la même lignée cancéreuse. Cette expérience a permis de montrer une activité dose-dépendante de la MR31367. En absence de Bcl-x_L, la MR31367 présente une activité pro-apoptotique à partir d'une concentration de 15µM et perd son activité cytotoxique en agent seul (Figure 70A). L'étude de l'induction de l'apoptose *via* l'évaluation du clivage de la caspase 3 et de la PARP par western blot a démontré que la MR31367 à 15µM, comme le Pyridoclastax à 25µM, est capable de sensibiliser les IGROV1-R10 à l'ABT-737 et d'induire une apoptose massive (Figure 70B). Le Pyridoclastax, quant à lui, perd la majorité de son activité pro-apoptotique à la concentration de 15µM en combinaison avec l'ABT-737, comme démontré par la morphologie cellulaire et nucléaire après traitement (Figure 70A). Par ailleurs, la combinaison de la MR31367 à 15µM avec un inhibiteur de Mcl-1 (siMcl-1) ne manifeste aucune activité cytotoxique. Cette observation suggère que la MR31367 ne constitue pas un dual inhibiteur de Bcl-x_L et Mcl-1 à cette concentration et que cette molécule présente une affinité accrue pour Mcl-1 (Figure 70F et G). Enfin, à la dose de 10µM les deux molécules MR31367 et Pyridoclastax perdent complètement leur activité cytotoxique sur cette lignée cancéreuse en absence de Bcl-x_L (Figure 70A).

I.2.1.3. Evaluation de l'activité cellulaire et apoptotique en temps réel en réponse à la MR31367

Les effets de la MR31367 à 15µM et du Pyridoclax à 25µM ont également été évalués en utilisant la technologie d'impédancemétrie en temps réel. Une telle approche permet d'appréhender la prolifération et la mort cellulaire grâce à un système de mesure d'impédance, les cellules poussant sur un support de microélectrodes d'or en modifiant le flux électronique. Les changements morphologiques des cellules affectent différemment la résistance exercée par les cellules au passage du courant électrique. Ainsi, lorsque les cellules adhèrent, s'étalent et prolifèrent, la résistance au courant électrique augmente, à l'instar de l'index cellulaire. Inversement, lorsque les cellules se rétractent, se décolle et/ou meurent, l'index cellulaire diminue. Ce système, commercialisé par la société Roche sous le nom de système « xCELLigence » permet de suivre en temps réel et sans aucun marquage l'activité cellulaire pendant un temps pouvant aller jusqu'à plus d'une semaine. Il permet donc d'étudier le comportement de cellules adhérentes en réponse à un traitement donné. Une mesure d'impédance peut être réalisée toutes les 15 minutes, assurant l'établissement d'une courbe de croissance d'une très grande précision, et permettant ainsi de caractériser aussi bien les événements précoces que tardifs de la réponse cellulaire.

Le traitement des cellules par la MR31367 à 15µM ou le Pyridoclax à 25µM en agent seul n'affecte pas l'activité cellulaire et les cellules présentent un profil semblable au contrôle jusqu'à 72h post traitement. Leur combinaison avec l'ABT-737 induit la chute de l'index cellulaire, signifiant ainsi une diminution dans la résistance au courant électrique occasionnée par la mort et le décollement des cellules (Figure 70C).

La mesure de l'activité des caspases 3/7 en temps réel suite au traitement associant la MR31367 (15µM) à l'ABT-737 a également été évaluée grâce à l'Incucyte, un système d'imagerie cellulaire en temps réel. Cette association induit une augmentation de l'activité des caspases 3/7 de manière similaire au traitement par la combinaison Pyridoclax (25µM)/ABT-737 (Figure 70D). L'induction de l'apoptose est observée très rapidement après exposition au traitement (8h après traitement résultats non démontré). En revanche, le Pyridoclax à une concentration de 15µM en association avec l'ABT-737 n'induit que modérément l'activité des caspases 3/7 par rapport à son dérivé MR31367 à la même concentration (Figure 70E).

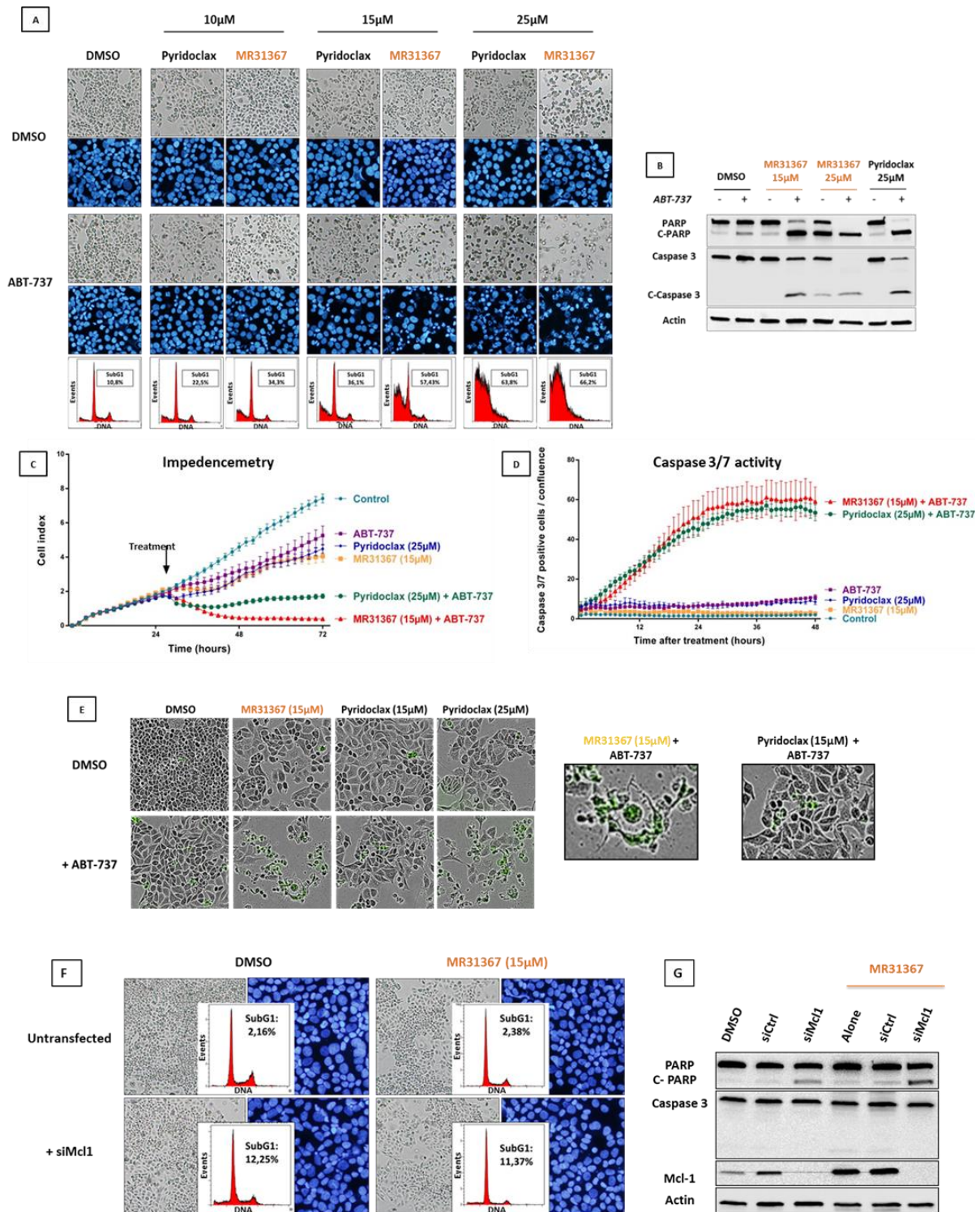


Figure 70. Effet de la MR31367 versus Pyridoclast à faibles concentrations.

Les cellules IGROV1-R10 sont traitées avec des concentrations croissantes (10, 15 et 25 μ M) de MR31367 ou de Pyridoclast en agent seul ou en combinaison avec l'ABT-737 (5 μ M). Après 24h de traitement, l'effet pro-apoptotique de la MR31367 et du Pyridoclast a été évalué par étude de la morphologie cellulaire et nucléaire, du contenu en ADN (A), mais également par étude du clivage de la caspase 3 et de PARP par western blot (B). L'activité cellulaire a été évaluée par impédancemétrie en temps réel (C) et par suivi de l'activation des caspases 3/7 clivées par imagerie cellulaire en temps réel (D) en réponse au traitement par la MR31367 (15 μ M) ou le Pyridoclast (25 μ M) en agent seul ou en association avec l'ABT-737. (E) Marquage des cellules par la sonde caspase 3/7 après 48h d'exposition aux différents traitements. (F) les cellules sont traitées par 15 μ M de MR31367 après inhibition de Mcl-1 (siMcl-1). La morphologie cellulaire, nucléaire et la contenance d'ADN ainsi que clivage de la caspase 3 et PARP ont été analysés (G).

L'ensemble de ces résultats suggère que le dérivé MR31367 présente une activité en tant qu'inhibiteur de Mcl-1 à des concentrations inférieures à celles qui sont nécessaires avec le Pyridoclast ou ses autres dérivés.

I.2.1.4. Evaluation de l'effet pro-apoptotique de la MR31367 sur d'autres modèles cellulaires cancéreux et sur les cellules normales

L'effet de la MR31367 à 15 μ M a également été étudié sur d'autres lignées cancéreuses ovariennes en addition à Bcl-x_L et Mcl-1 (SKOV-3) ou uniquement à Mcl-1 (A2780). Cette dernière n'exprime qu'une faible quantité de Bcl-x_L et une très grande quantité de Mcl-1. L'action d'un inhibiteur de Mcl-1 (ou l'inhibition de son expression) est suffisante pour induire une apoptose massive dans cette lignée. La mesure de l'activité de la caspase 3/7 en temps réel dans les cellules SKOV-3 exposées à l'association de la MR31367 ou du Pyridoclast avec l'ABT-737 a confirmé que, de manière similaire aux résultats obtenus sur les IGROV1-R10, la concentration de 15 μ M de la MR31367 est aussi efficace que la dose de 25 μ M de Pyridoclast sur cette lignée (Figure 71A).

Dans les précédents travaux sur le Pyridoclast, notre unité a démontré que la sensibilisation de la lignée cancéreuse A2780 nécessite une concentration de Pyridoclast deux fois plus importante (50 μ M au lieu de 25 μ M) que celle utilisée pour les IGROV1-R10 en raison de la forte expression de Mcl-1 dans ces cellules (Gloaguen et al, 2015). La mesure de l'activité de la caspase 3/7 en temps réel a démontré que contrairement au Pyridoclast qui induit une apoptose massive dans les A2780 à 50 μ M, la concentration de 25 μ M en MR31367 est suffisante pour provoquer un effet équivalent au Pyridoclast à 50 μ M (Figure 71B).

Enfin, l'effet de la MR31367 associée ou non à l'ABT-737 a également été évaluée sur la lignée cancéreuse de poumon A549 et sur une lignée de fibroblastes immortalisés (AG1521). Comme le montre les résultats présentés sur la Figure 72, l'association induit l'apoptose dans la lignée cancéreuse A549 (Figure 72A) mais n'a aucun effet sur les fibroblastes AG1521 (Figure 72B).

En conclusion, la MR31367 à la concentration de 15 μ M est capable de sensibiliser plusieurs lignées cancéreuses aux stratégies dirigées contre Bcl-x_L tout en n'ayant aucun effet sur les cellules normales. A cette concentration, l'activité pro-apoptotique de la MR31367 est similaire à celle du Pyridoclast à 25 μ M.

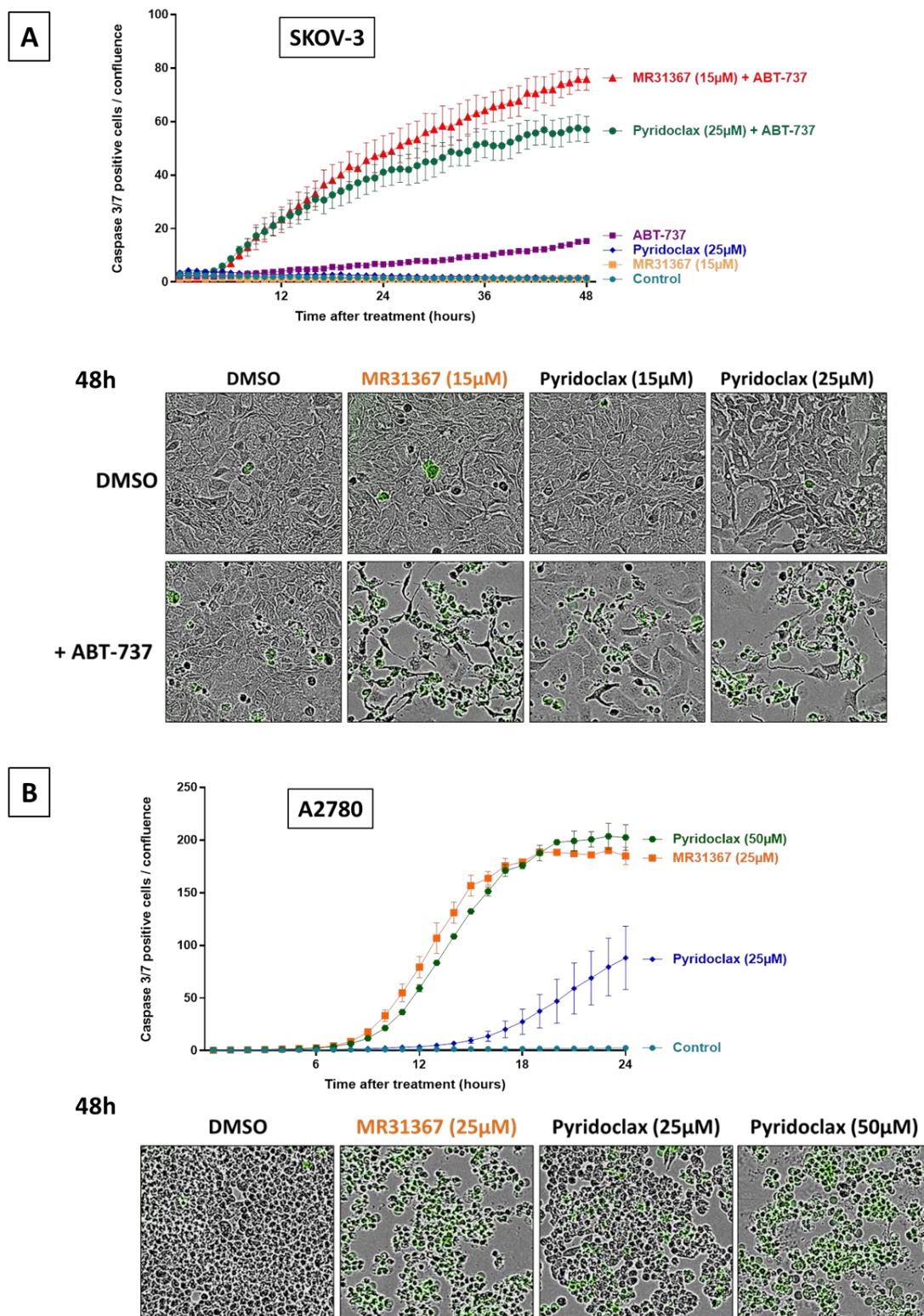


Figure 71. Effet de la MR31367 et du Pyridoclast sur les lignées cancéreuses ovariennes SKOV-3 et A2780. Les cellules ont été ensemencées dans des plaques 96 puits. Après 24h d'ensemencement, **(A)** les cellules SKOV3 ont été traitées ou non avec la MR31367 (15µM) ou le Pyridoclast (25µM) en agent seul ou en combinaison avec l'ABT-737 (5µM). **(B)** Les cellules A2780 ont été traitées avec la MR31367 (25µM) ou le Pyridoclast (25 et 50µM) en agent seul. L'induction de l'apoptose a été suivie en temps réel par la mesure de l'activité de la caspase 3/7.

Cette concentration sera ainsi retenue pour la suite des expériences. La substitution de l'azote de la pyridine terminale proche du méthyle par un acétamide oxime semble donc améliorer l'activité pro-apoptotique du Pyridoclast, vraisemblablement en augmentant son affinité à Mcl-1 par la liaison de ce motif avec la Lys234.

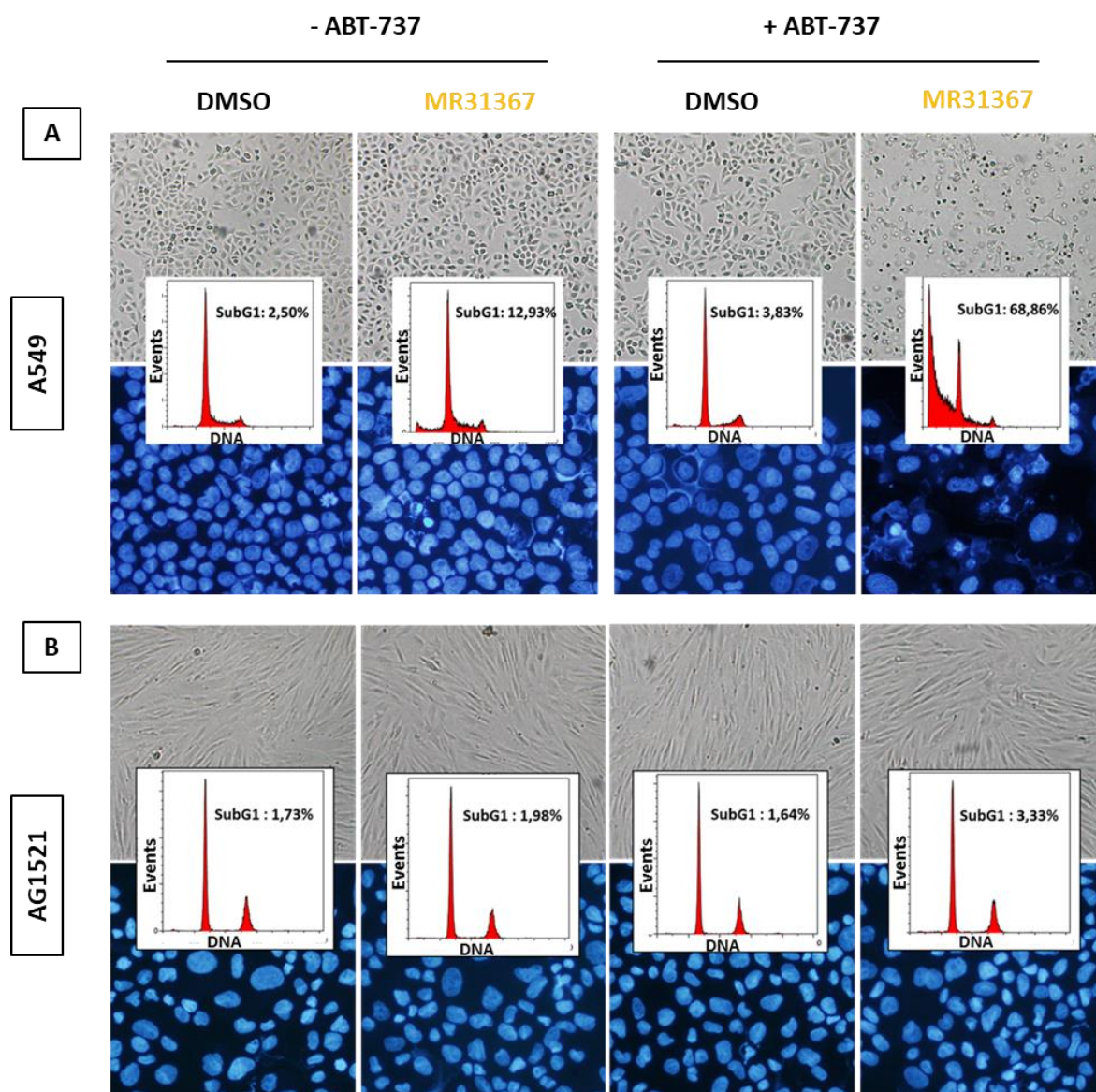


Figure 72. Effet de la MR31367 en agent seul ou en combinaison avec l'ABT-737 sur les cellules cancéreuses de poumon et les fibroblastes humains immortalisés. (A) La lignée cancéreuse pulmonaire A549 et **(B)** la lignée de fibroblastes humains AG1521 ont été traitées avec la MR31367 (15µM) en agent seul ou en combinaison avec l'ABT-737 (5µM). Après 24h de traitement, les morphologies cellulaires et nucléaires et le contenu en ADN ont été analysés.

I.2.1.5. La MR31367 induit une apoptose dépendante de Bak

L'interaction de la MR31367 avec la protéine pro-apoptotique Mcl-1 a été mise en évidence par l'immunoprécipitation de Mcl-1 après 8h d'exposition à la MR31367 seule ou en association avec l'ABT-737. Cette technique nous a permis d'étudier les modifications induites par la MR31367 au niveau des interactions de Mcl-1 avec ses partenaires (Figure 73).

A l'état basal, Mcl-1 est liée à Bak, Bim et Noxa mais pas à Bax (Figure 73), comme attendu. L'ABT-737 étant incapable d'interagir avec Mcl-1, l'exposition de ces cellules à cet agent ne modifie pas l'équilibre d'interaction de Mcl-1 avec ses partenaires. Cependant, une augmentation de Bim sur Mcl-1 a été observée suite à ce traitement suggérant que le Bim libéré de la protéine Bcl-x_L par l'ABT-737 est capturé par Mcl-1 (Figure 73A). Le traitement par la MR31367 seule permet de déplacer Bak et Bim de Mcl-1. L'association de la MR31367 avec l'ABT-737 a également permis de déplacer Bak et partiellement Bim de Mcl-1 (Figure 73A). Ce déplacement partiel de Bim est probablement dû à son relargage par Bcl-x_L du fait de l'action de l'ABT-737. Il est à noter que la MR31367 est incapable de déplacer Noxa de Mcl-1, vraisemblablement en raison de la forte interaction existant entre ces deux protéines. Au contraire, nous observons davantage de Noxa lié à Mcl-1 après traitement avec la MR31367 (Figure 73A, panel de gauche). Ceci s'explique par le fait que, à l'instar du Pyridoclast (Gloaguen et al, 2015), la MR31367 induit le stress du RE et l'expression subséquente de Noxa, comme en témoigne l'augmentation de Noxa dans les lysats totaux des cellules traitées avec la molécule (Figure 73A, panel de droite).

Pour démontrer l'importance de Bak dans l'induction de l'apoptose induite par la MR31367, nous avons évalué l'effet de la combinaison MR31367/ABT-737 en présence et en absence de Bak et/ou Bax (Figure 73B). Les résultats ont mis en évidence que l'inhibition de l'expression de Bax par un ARN interférent n'a aucun effet sur l'apoptose induite par cette combinaison, comme le montre l'analyse des morphologies cellulaires et nucléaires et le pourcentage de cellules en pré-G1. En revanche, l'inhibition de l'expression de Bak diminue fortement les effets pro-apoptotiques de cette combinaison. Enfin, l'inhibition concomitante de Bax et Bak ne permet pas de potentialiser l'effet anti-apoptotique induit par l'inhibition de Bak seule (Figure 73B).

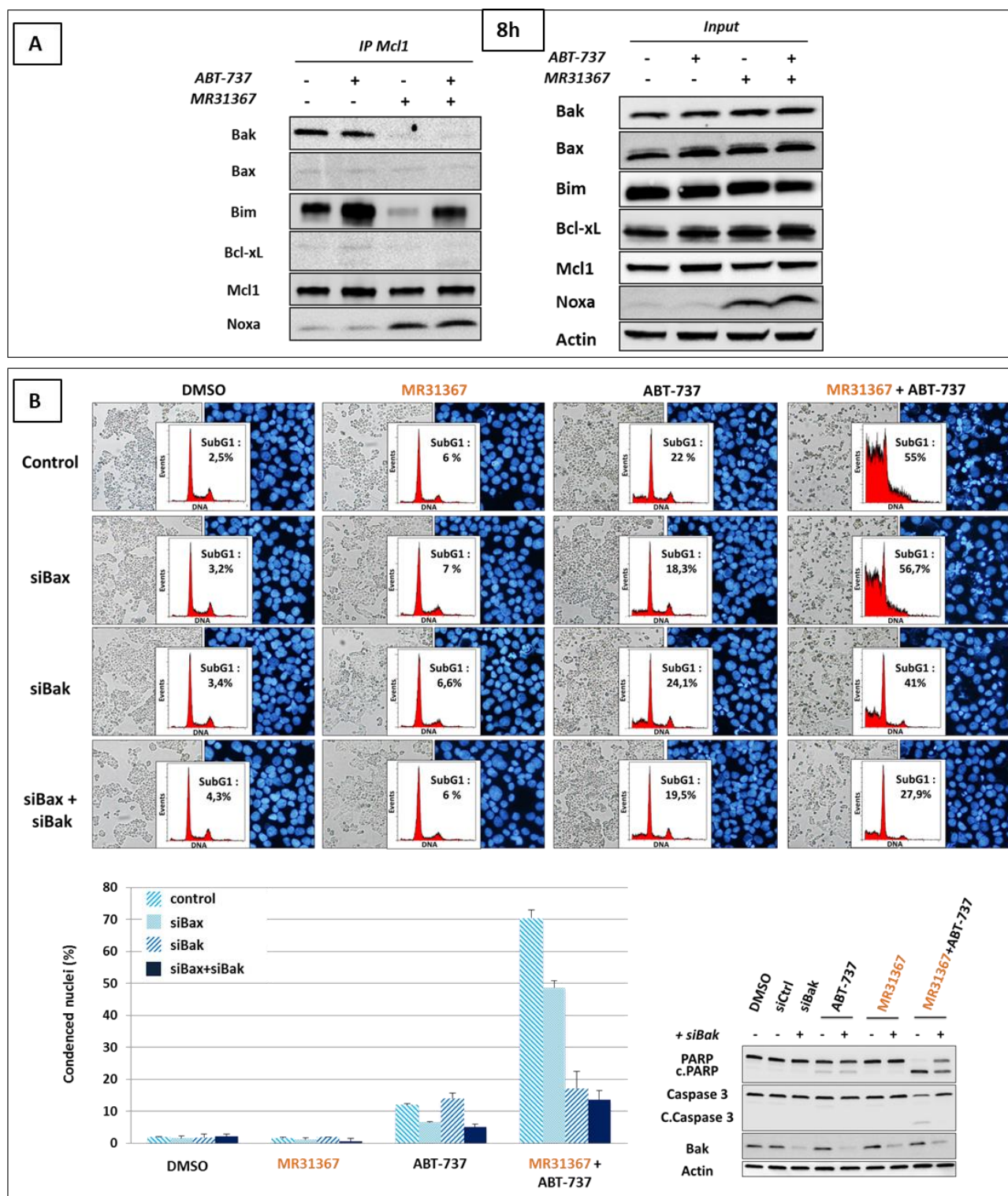


Figure 73. Effet de la MR31367 sur l'interaction de Mcl-1 avec ses partenaires. (A) Les cellules IGROV1-R10 ont été traitées avec la MR31367 (15µM) seule ou en association avec l'ABT-737 (5µM). Après 8h d'exposition, les interactions de Mcl-1 avec Bax, Bak, Bim et Noxa ont été évaluées après immunoprécipitation et western blot (panel de gauche). L'expression de ces protéines dans le lysat total a été analysée par western blot (panel de droite). (B) L'expression de Bax et/ou de Bak dans la lignée cellulaire IGROV1-R10 a été inhibée par des siARN spécifiques (siBax et siBak) avant que les cellules soient traitées avec la MR31367 (15µM) en association ou non avec l'ABT-737 (5 µM) pendant 24h. L'induction de l'apoptose a été évaluée en analysant les morphologies cellulaires et nucléaires, le contenu en ADN, le comptage des noyaux condensés et l'étude du clivage de la caspase 3 et de PARP.

I.2.1.6. Implication de Noxa, Bim et Puma dans la réponse au traitement par la MR31367

Les résultats de l'immunoprécipitation de Mcl-1 ont donc montré que la MR31367 était incapable de déplacer Noxa de Mcl-1. Cette protéine est induite en réponse au traitement par la MR31367, probablement engendré par le stress du RE généralement induit en réponse au traitement par les molécules à comportement BH3-mimétique (Figure 74A). Cette induction pourrait donc être à l'origine du déplacement de Bak et Bim de Mcl-1 et de l'induction de l'apoptose. Pour écarter cette hypothèse, nous avons évalué l'effet de l'inhibition de Noxa par un siARN (siNoxa) sur l'apoptose induite par la combinaison MR31367/ABT-737 sur la lignée IGROV1-R10. Les résultats de cette expérience ont démontré que l'absence de Noxa n'empêche pas la survenue de l'apoptose et la sensibilisation de ces cellules à l'ABT-737 par la MR31367 (Figure 74B).

Pour valider ces résultats, nous avons cherché à savoir si la MR31367 était capable de déplacer Bak en absence de Noxa. Mcl-1 a donc été immunoprécipité et le déplacement de Bak par la MR31367, seule ou en combinaison avec l'ABT-737, a pu être observé en dépit de l'inhibition de l'expression de Noxa (Figure 74C). Ces résultats démontrent donc que la MR31367 permet de libérer Bak de Mcl-1 de façon totalement indépendante de la présence de Noxa.

Nous avons également constaté qu'en réponse au traitement par la MR31367, les protéines BH3-only Bim et Puma sont également induites en fonction du temps (Figure 74A). Pour déterminer le rôle de ces deux protéines dans la réponse au traitement par la MR31367 en association avec l'ABT-737, nous avons procédé à l'inhibition de ces deux protéines en utilisant des siARN spécifiques (siBim et siPuma) (Figure 74D). Les analyses de morphologie cellulaire et nucléaire et du contenu des cellules en ADN ont démontré que l'effet pro-apoptotique provoqué par l'association MR31367/ABT-737 n'est pas réprimé de façon majeure en absence de Bim et/ou Puma, suggérant que ces deux protéines ne sont pas impliquées dans l'apoptose induite par la combinaison.

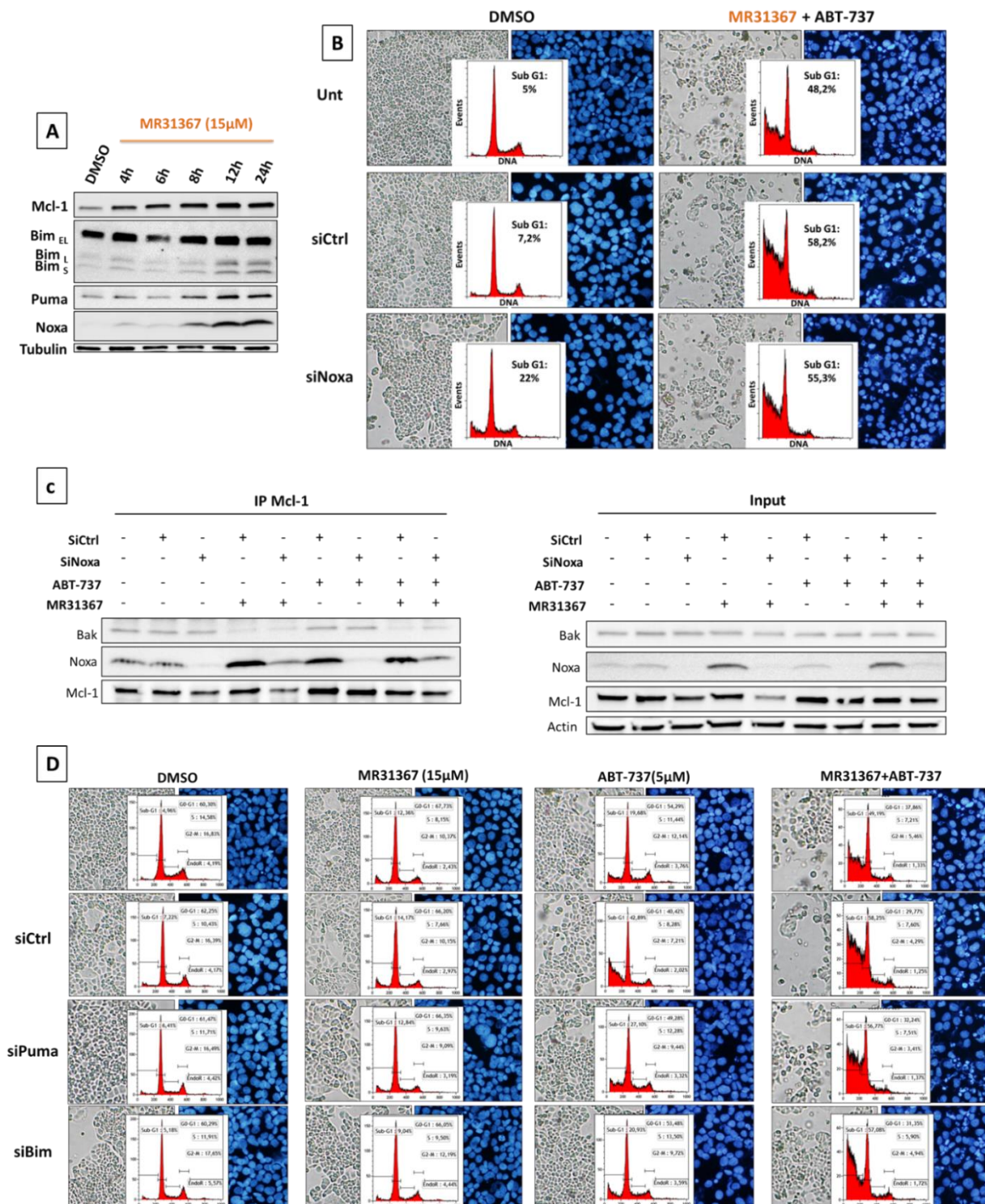


Figure 74. Implication des BH3-only dans l'apoptose induite par l'association MR31367/ABT-737. (A) Les cellules IGROV1-R10 ont été traitées ou non avec la MR31367 et l'expression des BH3-only Noxa, Bim et Puma a été analysée à différents temps post-traitement par western blot. (B) Les cellules IGROV1-R10 ont été traitées par la MR31367 en agent seul ou en combinaison avec l'ABT-737 en absence ou en présence de Noxa. L'effet de ce traitement sur la morphologie cellulaire et nucléaire ainsi que le contenu en ADN a été analysé. (C) Après 8h d'exposition, les interactions de Mcl-1 avec Bak et Noxa ont été évaluées après immunoprécipitation et western blot (panel de gauche). L'expression de ces protéines dans le lysat total a été analysée par western blot (panel de droite). (D) Les cellules IGROV1-R10 ont été traitées par la MR31367 seule ou en combinaison avec l'ABT-737 en absence ou en présence de Bim et Puma et l'effet de ce traitement sur la morphologie cellulaire et nucléaire ainsi que le contenu en ADN a été analysé.

I.2.1.7. La MR31367 perturbe l'interaction de Mcl-1/Bim

La capacité de la MR31367 à perturber l'interaction entre Bim et Mcl-1 a été évaluée à Nantes (Dr. Fabien Gautier et Dr. Philippe Juin, INSERM U1232, Nantes) par la technique du BRET. Cette technique permet de détecter et de quantifier l'intensité des interactions protéine-protéine dans des cellules vivantes en évaluant l'énergie de transfert entre un donneur (BimL, fusionnée à la luciférase) et un accepteur (Mcl-1, fusionnée à une protéine fluorescente en jaune (YFP)). La luciférase va catalyser l'oxydation du substrat coelenterazine, faisant ainsi apparaître la coelenteramide au niveau du site actif de l'enzyme à l'état excité. Le retour à l'état fondamental donne lieu à l'émission de photons (chimiluminescence). Un transfert d'énergie de résonance (RET) est possible depuis le complexe enzymatique à coelenteramide excitée vers une molécule acceptrice, l'YFP ici, si la distance entre les deux protéines est inférieure à 10 nm. L'YFP ainsi excitée, cette dernière va émettre de la fluorescence à une longueur d'onde de 527 nm. Le traitement des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 avec des concentrations croissantes de MR31367 ou de Pyridoclastax a démontré que la MR31367 est capable de perturber efficacement le complexe Bim/Mcl-1 dans ces cellules dans une fourchette de concentration comprise entre 10 et 50 μ M et que cette perturbation est légèrement plus importante que celle du Pyridoclastax (Figure 75A). Pour confirmer ces résultats, l'effet de la MR31367 sur le complexe Bim/Mcl-1 a été comparé avec la MR31366 dont l'activité était nulle (contrôle négatif). Dans cette expérience, la MR31367 garde son efficacité à perturber le complexe Bim/Mcl-1, tandis que la MR31366 ne manifeste aucun effet déstabilisateur en dépit des fortes concentrations utilisées (Figure 75B).

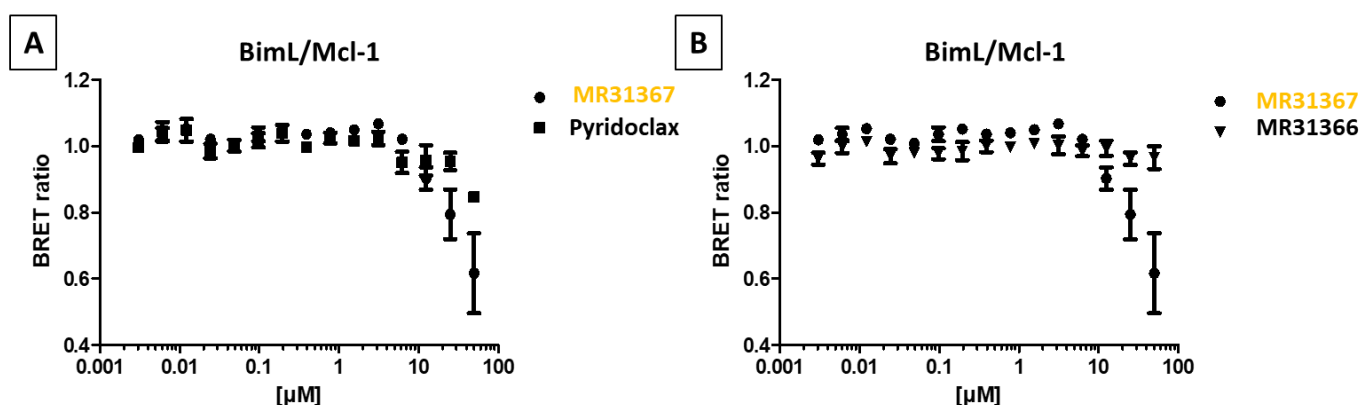


Figure 75. Effet de la MR31367 sur le complexe BimL/Mcl-1. La déstabilisation du complexe BimL/Mcl-1 en réponse au traitement par différentes concentrations de MR31367 par rapport (A) au Pyridoclastax ou (B) la MR31366 a été évaluée en utilisant la technique du BRET dans la lignée cellulaire MCF-7. Les résultats sont représentés par des courbes dose réponse.

Afin d'évaluer l'affinité de la MR31367 pour Mcl-1, une étude de SPR a été conduite à Toulouse (Dr. Frédéric Lopez et Laetitia Ligat, INSERM U1037). Cette technique utilise le phénomène de la résonance plasmonique de surface (RPS ou, en anglais, SPR pour "surface plasmon resonance") afin de déterminer les valeurs des constantes d'association (k_a) et de dissociation (k_d), et d'en déduire la constante d'affinité (K_D). Dans ce but, la protéine de fusion purifiée His-Mcl-1 (Produite par le Dr. Ludovic Carlier, Université Pierre et Marie Curie, Paris) a été immobilisée sur la surface d'une "chip sensor" recouverte d'acide nitrilotriacétique. Une solution contenant les molécules à tester a été injectée à un débit constant à l'aide d'un circuit microfluidique dans le système afin de mettre en contact la molécule avec Mcl-1. Lorsque la molécule se lie à ou se sépare de Mcl-1, un changement de l'index de réfraction à la surface de la chip se produit. Ce dernier est détecté par le système et enregistré par le logiciel de contrôle sous forme « d'unités de résonance » (RU). Lorsque la molécule se lie, il y a une augmentation du signal SPR. A l'inverse, lorsqu'elle se sépare de Mcl-1 le signal SPR diminue.

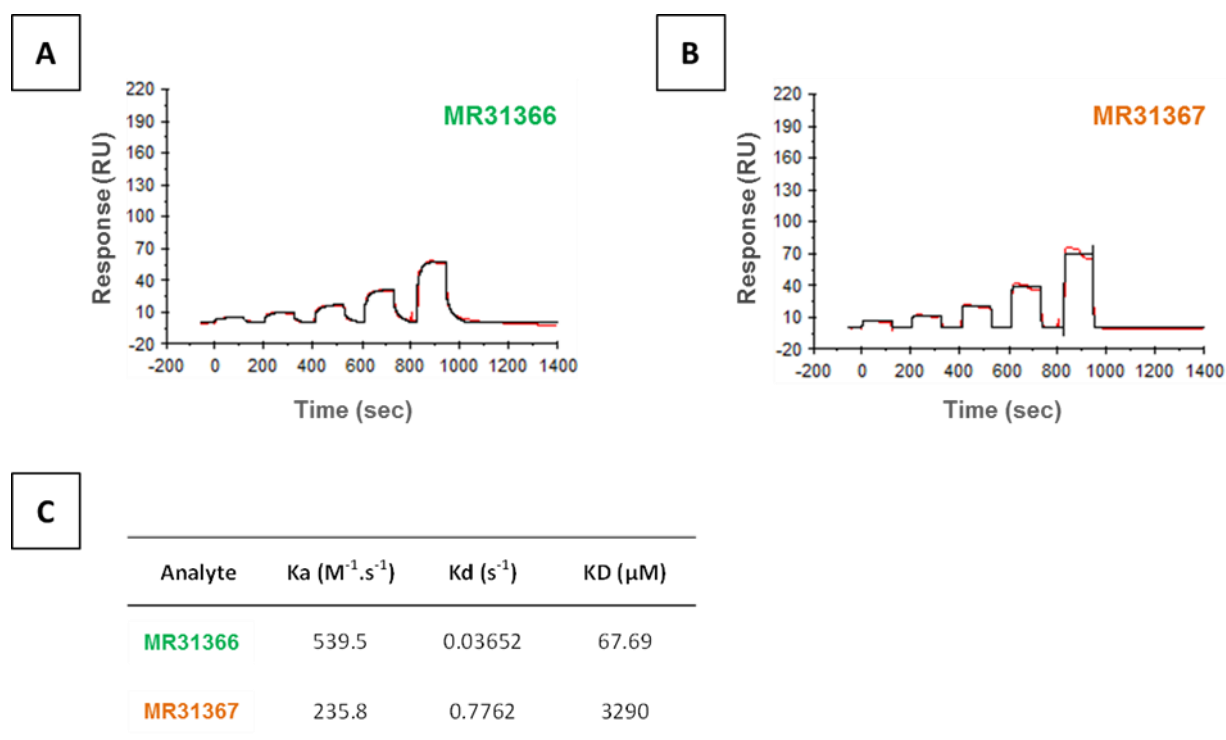


Figure 76. Liaison en temps réel de la MR31366 et de la MR31367 sur la protéine de fusion His-Mcl-1. Cinq injections successives des molécules **(A)** MR31366 et **(B)** MR31367 ont été réalisées à des concentrations croissantes (de 6,25 μM à 100 μM) sur une chip senseur recouverte de Mcl-1 immobilisé *via* le motif His. Les injections des molécules ont duré 120s et ont été séparées par des phases de dissociation de 10s. Une phase de dissociation de 10min a suivi la dernière injection. **(C)** Tableau récapitulatif des constantes d'association (K_a), de dissociation (K_d), et d'équilibre (K_D) de la MR31366 et la MR31367 sur Mcl-1 déterminés à partir des études de SPR.

La capacité des molécules MR31367 et MR31366 (respectivement active et inactive au niveau biologique) à se lier à Mcl-1 a donc été évaluée par SPR. Ces deux molécules sont capables d'interagir avec Mcl-1 (Figure 76A et 76B), mais de manière surprenante, la constante d'affinité KD de la MR31367 est de l'ordre du mM (Figure 76C), alors que la MR31366, qui n'a aucun effet pro-apoptotique, possède une KD proche de 70µM. A titre de comparaison, le Pyridoclax a une constante d'affinité pour Mcl-1 de l'ordre du nanomolaire (Gloaguen et al, 2015). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la conformation de Mcl-1 lors des études par SPR, différente de celle *in cellulo* lorsque Mcl-1 est ancré dans la membrane mitochondriale, ne permette pas l'ancrage de la MR31367 dans la poche hydrophobe de Mcl-1.

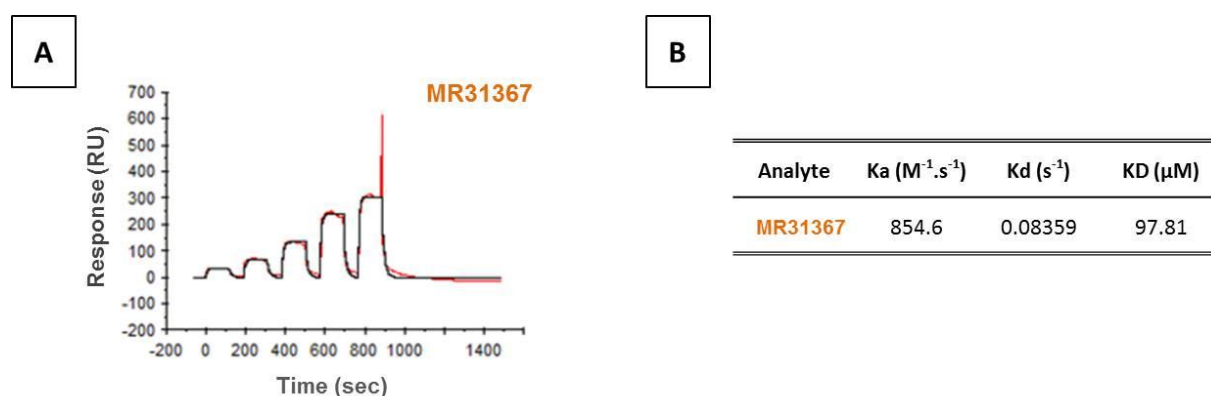


Figure 77. Liaison en temps réel de la MR31367 sur la protéine Mcl-1. Cinq injections successives de (A) MR31367 ont été réalisées à des concentrations croissantes (de 6,25µM à 100µM) sur une chip senseur recouverte de Mcl-1 immobilisé *via* une amine. Les injections des molécules ont duré 120s et ont été séparées par des phases de dissociation de 10s. Une phase de dissociation de 10min a suivi la dernière injection. (B) Tableau récapitulatif de la constante d'association (Ka), de dissociation (Kd), et d'équilibre (KD) de la MR31367 sur Mcl-1 déterminés à partir des études de SPR.

Par conséquent, un nouveau protocole d'immobilisation de Mcl-1 sur la « chip sensor » a été récemment réalisé. Dans un premier temps, un fragment de Mcl-1 de 17,9 kDa (172-327aa) a été immobilisé sur la chip senseur *via* une amine de la protéine, et non plus par le motif His et l'injection de la MR31367 à 5 concentrations successives (de 6,25µM à 100µM) n'a mis en évidence qu'une très faible interaction (résultats non présentés). La même expérience a été réitérée avec la protéine entière (1-350aa), également immobilisée *via* une fonction amine (Figure 77A). Une nouvelle constante d'affinité a pu ainsi être calculée et s'est révélée de l'ordre du µM (Figure 77B). L'interaction entre le Pyridoclax et Mcl-1 a également été testée avec ce protocole d'immobilisation et la constante d'affinité calculée est toujours de l'ordre

du nM (résultats non présentés). Il semblerait donc que le protocole d'immobilisation de Mcl-1 soit crucial pour la survenue de son interaction avec la MR31367.

En conclusion, la MR31367 présente une affinité pour Mcl-1 et est capable de déplacer Bak et Bim de sa poche hydrophobe. Cependant, elle est incapable de déplacer Noxa de Mcl-1, mais son activité est indépendante de la présence de Noxa. Par ailleurs, l'apoptose induite par la MR31367 dépend en grande partie de la libération de Bak de Mcl-1.

I.3. Discussion et conclusions

La recherche de potentiels inhibiteurs de Mcl-1 sur la base de la structure du Pyridoclax, un inhibiteur de Mcl-1 de la famille des oligopyridines, a donc permis la conception et la synthèse de 8 analogues du Pyridoclax. L'objectif était d'identifier des molécules plus actives et/ou plus solubles que le Pyridoclax.

Les différentes modifications apportées à la structure chimique du Pyridoclax ont été choisies sur la base d'un travail de modélisation qui s'est appuyé sur la forte affinité et spécificité de Noxa avec Mcl-1. Le but était de mimer la forte interaction entre le Glu 24 de Noxa et la Lysine 234 de Mcl-1, ce résidu n'étant pas impliqué à l'origine dans l'interaction avec le Pyridoclax.

Tout en conservant les motifs structuraux du Pyridoclax indispensables à son activité biologique, 4 motifs chimiques différents ont été greffés à la place d'un des atomes d'azote de l'une des 2 pyridines terminales, générant ainsi 2 séries complémentaires, « up » et « down », de 4 composés. L'effet de ces 8 composés sur l'apoptose en association avec des stratégies dirigées contre Bcl-x_L a été évalué sur une lignée cancéreuse ovarienne dont la survie dépend de Mcl-1 et Bcl-x_L. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que 6 des 8 molécules présentaient une activité pro-apoptotique modérée et que l'une d'entre elle n'avait aucune activité. En revanche, la dernière molécule, sur laquelle a été greffé un acétamide oxime en « down », la MR31367, était capable d'induire fortement l'apoptose lorsque Bcl-x_L était inhibé, et présentait même une activité en agent seul à la concentration de 25µM.

L'étude comparative avec le Pyridoclax a permis de montrer que la MR31367 perdait son activité en tant qu'agent seul à 15µM mais était toujours active à cette concentration en association avec les stratégies anti-Bcl-x_L. Cette activité était comparable à celle du Pyridoclax à la concentration de 25µM. Nous avons confirmé par la suite que la MR31367 était plus active que le Pyridoclax puisque son effet pro-apoptotique sur d'autres modèles de

lignées tumorales persistait à des concentrations où le Pyridoclax n'était plus actif. Ces résultats montrent que la substitution de l'azote de la pyridine terminale proche du méthyle par un acétamide oxime améliore l'activité pro-apoptotique du Pyridoclax, vraisemblablement en augmentant son affinité pour Mcl-1 par la liaison de ce motif avec la Lys234.

L'immunoprécipitation de Mcl-1 a mis en exergue que la MR31367, à l'instar du Pyridoclax (Gloaguen et al., 2015), était capable de déplacer Bim et Bak de Mcl-1. L'utilisation d'ARN interférents a permis de montrer que l'inhibition de Bak protégeait contre l'apoptose induite par l'association MR31367/ABT-737. Ces résultats suggèrent qu'à l'instar de la molécule de Servier, la S63845 (Merino et al., 2017), la libération de Bak de Mcl-1 par la MR31367 constitue un élément majeur de l'induction de la mort. En revanche, Bim et Puma ne semblent pas impliqués puisque leur inhibition par des ARN interférents n'a pas empêché la mort induite par la combinaison.

En dépit du fait que la MR31367 ait été conçue comme un mime de Noxa, elle est incapable de déplacer Noxa de Mcl-1. Ceci laisse à penser que cette molécule a moins d'affinité pour Mcl-1 que Noxa.

Cet élément est essentiel puisque, suite au traitement par la MR31367, nous avons observé l'augmentation de l'expression de Noxa et de son interaction avec Mcl-1. L'induction de Noxa a également été observée après traitement avec le Pyridoclax (Gloaguen et al., 2015) et est la conséquence du déclenchement du stress du RE. En effet, ce dernier est induit par la plupart des molécules BH3 mimétiques (Albershardt et al., 2011), et il en est de même pour la MR31367 (résultats non présentés). L'induction de l'expression de Noxa et sa liaison subséquente avec Mcl-1 pouvant être à l'origine du déplacement de Bak et Bim de Mcl-1, nous avons évalué l'interaction de Mcl-1 en absence de Noxa. Nous avons ainsi pu montrer que Bak était toujours déplacé par la MR31367, à l'instar de Bim (résultats non présentés). Ceci suggère donc que la MR31367 est capable de libérer Bak de Mcl-1 de façon directe, et de sensibiliser les cellules IGROV1-R10 aux stratégies anti-Bcl-x_L de façon complètement indépendante de Noxa.

Afin de valider la MR31367 en tant qu'inhibiteur direct de Mcl-1, des études permettant l'évaluation des interactions protéine-protéine ont été réalisées. Des études de BRET ont mis en évidence la capacité de la MR31367, à l'instar du Pyridoclax, à perturber l'interaction Bim/Mcl-1 dans la lignée d'adénocarcinome mammaire MCF-7. Comme attendu, la MR31366 n'a eu aucun effet sur la stabilité du complexe Bim/Mcl-1. Néanmoins, de manière

surprenante, nous n'avons pas pu valider ces résultats par les premières études par SPR puisque la MR31367 présente une constante d'affinité de l'ordre du mM alors que celle du Pyridoclax est de l'ordre du nM. Néanmoins, une modification du protocole d'immobilisation a permis d'améliorer considérablement l'interaction entre la MR3167 et Mcl-1, suggérant que la conformation de la protéine est cruciale pour son interaction avec la MR31367. Il reste maintenant à optimiser ce protocole et à tester la MR31366 et le Pyridoclax en parallèle.

En dépit de ces derniers résultats, la MR31367 semble être un inhibiteur de Mcl-1 plus actif que le Pyridoclax, et pourrait présenter un intérêt certain dans le cadre d'une stratégie thérapeutique visant à induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses. Son intérêt *in vivo* doit désormais être évalué pour définir si son activité est réellement plus intéressante que celle du Pyridoclax.

Partie II : Evaluation de l'activité biologique des analogues de MIM1

II.1. Présentation de Mim1

MIM1 (Mcl-1 Inhibitor Molecule 1), comme illustré dans la troisième partie de mon introduction, est l'une des premières molécules BH3-mimétiques ciblant Mcl-1. Elle a été identifiée suite au criblage à haut débit d'une chimiothèque de plus de 70 000 composés. Cette molécule a été sélectionnée pour sa capacité à déplacer le peptide stabilisé du domaine BH3 de Mcl-1 (SAHBA) de la poche hydrophobe de la protéine Mcl-1, et pour son incapacité à déplacer Bad-BH3 de la poche de Bcl-x_L (Cohen et al., 2012). La molécule MIM1 présente une très grande sélectivité pour Mcl-1 mais son affinité pour ce dernier est modérée ; elle est estimée à 4,78µM.

L'évaluation biologique de MIM1 a fait l'objet de plusieurs publications. Il a été démontré que cette molécule favorise l'oligomérisation de Bax et la perméabilisation des liposomes en présence de t-Bid. Son activité pro-apoptotique a été validée sur plusieurs lignées leucémiques dépendantes de Mcl-1 et agit en synergie avec l'ABT-737 dans un modèle dont la survie dépend de Bcl-x_L et Mcl-1 (Cohen et al., 2012). Cet effet est entièrement aboli dans les cellules dépourvues de Bax et Bak. Une étude plus récente comparant l'activité pro-apoptotique de différents inhibiteurs de Mcl-1 sur des lymphocytes T-Jurkat déficients ou reconstitués en Bak, a démontré que MIM1, en présence de Bak, a une activité modérée à partir de 10µM. Par ailleurs, la combinaison de l'ABT-737 avec MIM1 à 10 µM ne manifeste aucune cytotoxicité sur la lignée de carcinome du poumon à grandes cellules H1299 (Varadarajan et al., 2013). Cette étude a mis en évidence que MIM1 exerce un effet anti-tumoral très modéré sur les cancers solides caractérisés par l'expression de Bcl-x_L et Mcl-1. Par ailleurs, aucune étude *in vivo* impliquant l'utilisation de cette molécule n'a été publiée à ce jour.

II.2. Etudes antérieures : évaluation de l'effet de MIM1 sur les lignées cancéreuses ovariennes

Notre unité s'est également intéressée à l'effet de MIM1 sur nos modèles de lignées tumorales ovariennes. Son effet a été d'abord évalué sur la lignée chimiorésistante IGROV1-R10, dont la survie dépend de Bcl-x_L et Mcl-1. La molécule MIM1 a donc été combinée avec l'inhibition de Bcl-x_L par un ARN interférent (siXL1). Cette molécule a également été combinée avec l'inhibition de Mcl-1 (siMcl-1) pour analyser ses effets sur la survie cellulaire en absence de cette protéine. Ainsi, l'exposition des cellules IGROV1-R10 à différentes

concentrations de MIM1 (10 et 25 μ M) en absence de Bcl-x_L (siXL1) a démontré qu'à la concentration de 25 μ M, MIM1 induit une mort par apoptose dans ces cellules. Cependant, l'utilisation d'une concentration plus faible, comme décrit dans la littérature, diminue fortement l'activité pro-apoptotique de MIM1 (Figure 78B). Par ailleurs, en absence de Mcl-1, MIM1 ne potentialise pas l'apoptose, et ce quelle que soit la concentration utilisée, confirmant que MIM1 présente une activité sélective pour Mcl-1 (Figure 78B). En comparaison avec le Pyridoclastax, l'activité pro-apoptotique de MIM1 est plus faible sur notre modèle cellulaire de cancer de l'ovaire.

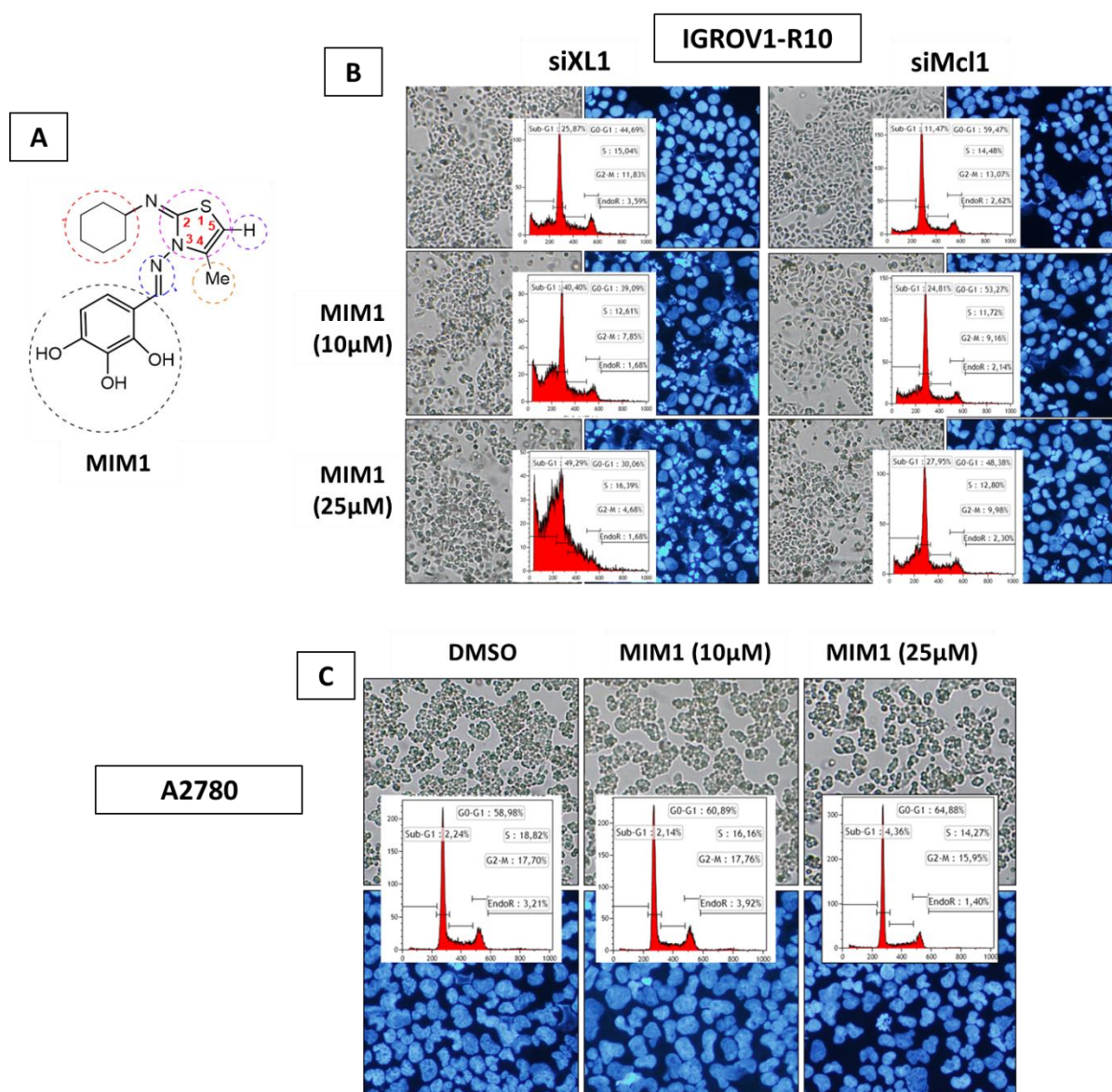


Figure 78. Evaluation de l'effet de MIM1 sur les lignées cancéreuses ovarienne IGROV1-R10 et A2780. (A) Structure de MIM1. **(B)** Les cellules IGROV1-R10 ont été transfectées par des ARN interférants siXL1 et siMcl-1 dirigés contre Bcl-x_L et Mcl-1 respectivement. 48h après transfection, les cellules ont été traitées par différentes concentrations de MIM1 (10 et 25 μ M). Après 24h de traitement, les morphologies cellulaires et nucléaires ainsi que le contenu en ADN ont été analysés. **(C)** Les cellules A2780 ont été traitées par différentes

concentrations de MIM1 (10 et 25 μ M). Après 24h de traitement, les morphologies cellulaires et nucléaires ainsi que le contenu en ADN ont été analysés.

L'effet de MIM1 a également été testé sur la lignée A2780 (Figure 78C). Cette dernière présente une forte addiction à Mcl-1, l'inhibition de cette protéine induisant une apoptose massive dans ces cellules. L'utilisation de MIM1 en agent seul devrait donc suffire pour induire la mort de ces cellules. Ainsi l'exposition des cellules A2780 aux précédentes concentrations de MIM1 pendant 24h n'a montré aucun effet cytotoxique sur ces cellules. Toutefois, nous n'avons pas testé de concentrations plus élevées de MIM1 pour pouvoir le comparer au Pyridoclax qui lui agit à la concentration de 50 μ M sur cette lignée (Gloaguen et al., 2015).

Dans le but d'améliorer l'activité de cette molécule, de nouveaux dérivés de MIM1 ont été élaborés. Ils ont été conçus en modulant différentes parties du squelette de MIM1. Ce projet a été mené en collaboration avec le Dr René Grée (Institut des Sciences Chimiques de Rennes – CNRS UMR 6226, Rennes) qui a entrepris la partie synthèse de ces nouveaux analogues et le Dr Nicolas Levoin qui a réalisé la modélisation de l'interaction de ces dérivés avec Bcl-x_L et Mcl-1.

Ce travail a commencé pendant la thèse d'Abdelghani Jébahi au cours de laquelle notre équipe, en collaboration avec l'UMR CNRS 6226 de Rennes, a mis en évidence l'intérêt des différentes parties constituant le squelette de MIM1. En effet, la première modulation a porté sur la substitution de 3 parties de cette molécule ; la partie polyphénolique, le motif cyclohexane et le groupe méthyle, tout en conservant le cœur hétérocyclique thiazolyl. L'évaluation biologique d'une trentaine de molécules issues de ces modulations sur notre modèle cellulaire IGROV1-R10 a permis de mettre en évidence une intéressante relation structure-activité. Cette dernière a démontré que la partie polyphénolique de MIM1 est indispensable pour conserver son activité pro-apoptotique. Cela a été soutenu par les études de docking moléculaire qui ont montré que MIM1 interagit avec Mcl-1 via cette partie (Figure 79A). En revanche, la substitution du motif cyclohexane et du groupe méthyle par des noyaux aromatiques dans certains dérivés a montré une nette amélioration dans l'activité cytotoxique de MIM1 (Figure 79B).

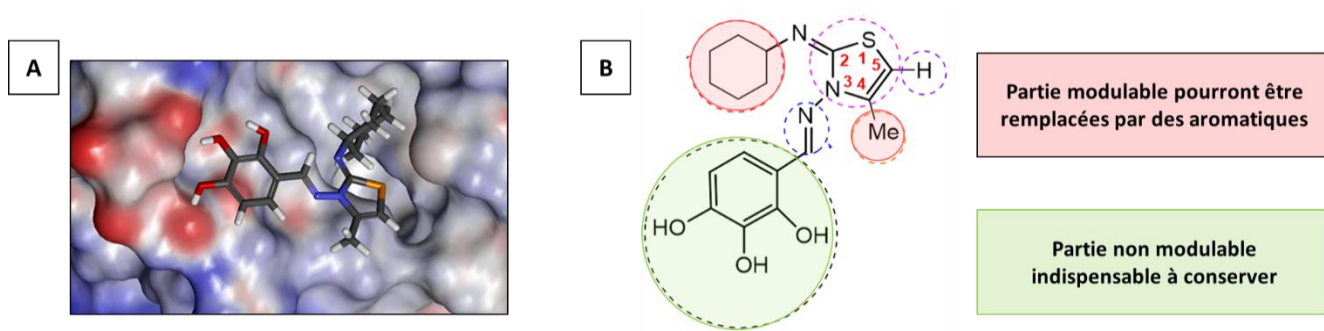


Figure 79. Structure-activité des analogues de MIM1 première génération. (A)

Image de docking moléculaire de MIM1 dans la poche hydrophobe de Mcl-1. **(B)** Résultats d'analyse structure / activité sur la première série des analogues de MIM1, montrant les parties modulables (en rose clair) et la partie non modulable entourant le polyphénol indispensable pour l'activité pro-apoptotique (en vert clair).

Sur la base de ces résultats, et au cours de mon projet de thèse, nous avons évalué l'effet de la substitution des deux parties cyclohexyle (position II) et méthyle (position III) par des cycles aromatiques (benzyle, phényle ou pyridine) sur l'amélioration de l'activité pro-apoptotique de ces dérivés (Figure 80).

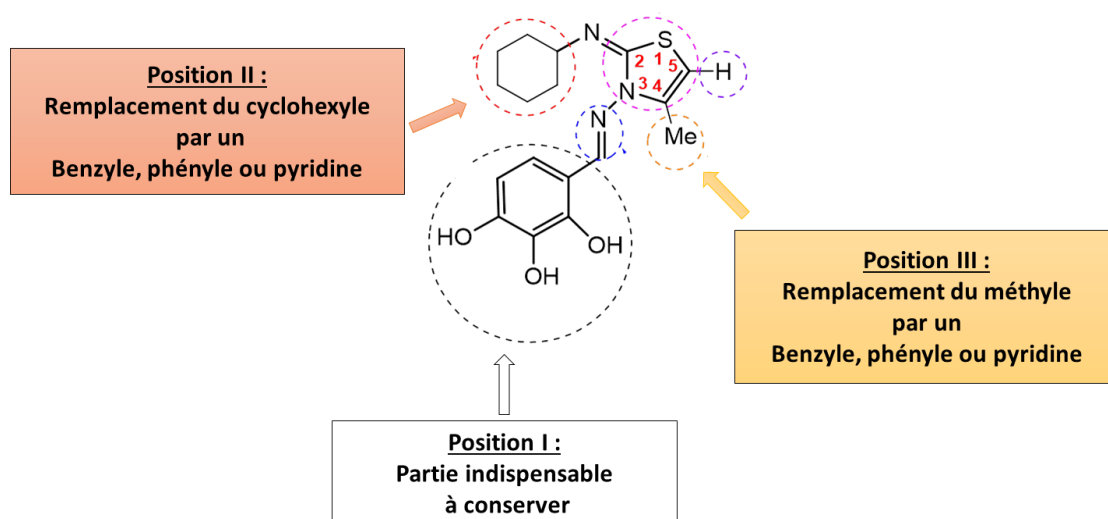


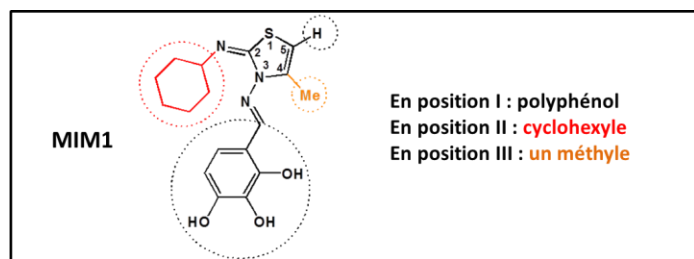
Figure 80. Schéma représentatif des différentes parties du squelette de MIM1 qui seront modulées.

II.3. Les analogues de MIM1 seconde génération

La seconde génération des analogues de MIM1 a été générée par la substitution des motifs en position II et III par un cycle aromatique de nature benzyle, phényle, ou pyridine. Cette

modulation a permis de générer 14 nouvelles molécules récapitulées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 5. Récapitulatif des différents analogues de MIM1 de seconde génération



Nom de molécule	Structure	Type de modulation	Nom de molécule	Structure	Type de modulation
AHAN1-14		En position II : un groupe 3-pyridine à la place du cyclohexyle. En position III : un groupe phényle à la place du méthyle	AHAN8-14		En position II: un groupe para- éthylbenzyle à la place du cyclohexyle En position III: un groupe phényle à la place du méthyle
AHAN2-14		En position II : un groupe para- éthylbenzene à la place du cyclohexyle. En position III : un groupe phényle à la place du méthyle	AHAN9-14		En position II: un groupe benzyle à la place du cyclohexyle En position III: un groupe benzyle à la place du méthyle
AHAN3-14		En position II : un groupe phényle à la place du cyclohexyle En position III : un noyau 2-pyridine à la place du méthyle	AHAN11-14		En position II : un groupe 3,5 bistrifluorobenzyle à la place du cyclohexyle En position III: un groupe phényle à la place du méthyle
AHAN4-14		En position II : un groupe phényle à la place du cyclohexyle En position III : un noyau 3-pyridine à la place du méthyle	AHAN12-14		En position II: un groupe benzyle à la place du cyclohexyle En position III: un groupe phényle à la place du méthyle
AHAN5-14		En position II : un groupe phényle à la place du cyclohexyle En position III par un noyau 4-pyridine à la place du méthyle	AHAN13-14		En position II: un groupe phényle à la place du cyclohexyle En position III: un groupe benzyle à la place du méthyle
AHAN6-14		En position II: un groupe parachlorobenzyle à la place du cyclohexyle En position III: un groupe phényle à la place du méthyle	AHAN1-15		En position II: un groupe benzyle à la place du cyclohexyle En position III: un groupe para-chlorobenzyle à la place du méthyle
AHAN7-14		En position II : un groupe benzyl 3-pyridine à la place du cyclohexyle ; e En position III par un groupe phényle à la place du méthyle	AHAN4-15		En position II : un groupe benzyl 3-pyridine à la place du cyclohexyle En position III : un groupe 4-pyridine à la place du méthyle

II.4. Evaluation biologique des analogues de MIM1 de seconde génération.

II.4.1. Evaluation de l'effet pro-apoptotique à 25µM

Les différentes molécules de cette génération ont été d'abord testées à la concentration de 25µM sur la base des précédents résultats obtenus avec MIM1. Les cellules IGROV1-R10 ont été exposées à ces différentes molécules, seules ou en combinaison avec des ARN interférents dirigés contre Bcl-x_L (siXL1) ou Mcl-1 (siMcl-1). Les résultats de ce premier criblage ont démontré qu'aucune de ces molécules ne présente une activité cytotoxique en agent seul. Leur combinaison avec un inhibiteur de Bcl-x_L et Mcl-1 a révélé que la plupart de ces molécules étaient actives en absence de Bcl-x_L et de Mcl-1 et qu'elles présentaient une activité pro-apoptotique intense (résultats non présentés). Néanmoins, l'effet observé pourrait être un effet « off target » en raison de la forte concentration utilisée.

Sur la base de ces observations, ces analogues ont donc été testés une seconde fois à des concentrations plus faibles sur le même modèle cellulaire.

II.4.2. Evaluation de l'effet pro-apoptotique à 10µM

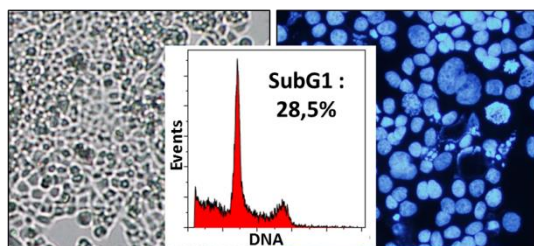
Ces molécules ont ensuite été testées à de plus faibles concentrations (1 et 10µM) sur le même modèle cellulaire en combinaison avec les ARN interférents dirigés contre Bcl-x_L et Mcl-1. A la concentration de 10µM, toutes les molécules restent actives en absence de Bcl-x_L. En revanche, leur combinaison avec l'ARN interférent siMcl-1 a permis de classer ces molécules en deux catégories différentes :

- Des potentiels « dual-inhibitors » présentant une activité pro-apoptotique contre Bcl-x_L et Mcl-1 parmi lesquelles on distingue AHAN2-14, AHAN6-14, AHAN8-14, AHAN9-14, AHAN11-14, AHAN12-14, AHAN1-15 et AHAN4-15 (Figure 81). L'intensité de l'activité pro-apoptotique de ces différentes molécules est très variable d'une molécule à une autre. Les plus efficaces sont : AHAN2-14, AHAN6-14, AHAN8-14, AHAN12-14 et AHAN4-15 (Figure 81).
- Des potentiels inhibiteurs spécifiques de Mcl-1 à cette concentration (AHAN1-14, AHAN3-14, AHAN4-14 et AHAN5-14 et AHAN7-14), dont les plus efficaces sur le modèle cellulaire IGROV1-R10 sont AHAN4-14 et AHAN5-14 et AHAN7-14 (Figure 82). Ces molécules exhibent une activité pro-apoptotique nettement supérieure à celle de MIM1.

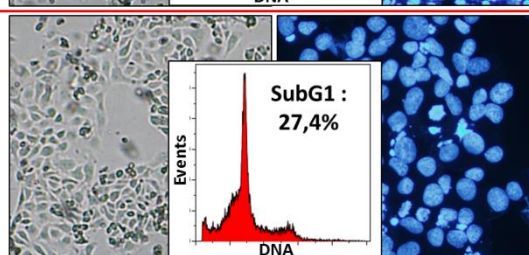
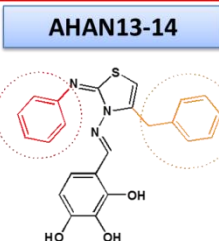
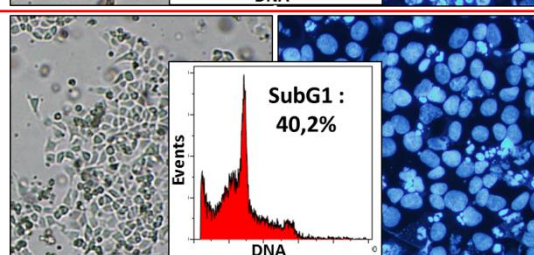
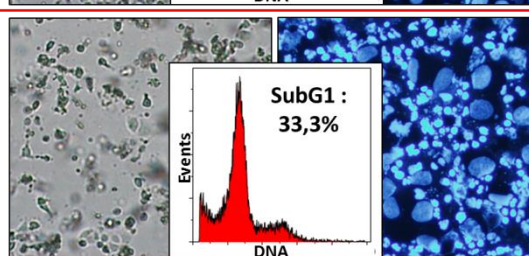
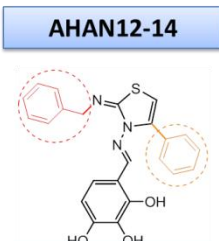
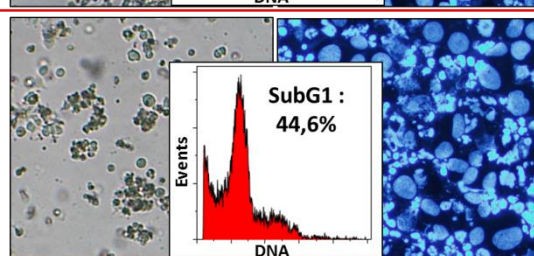
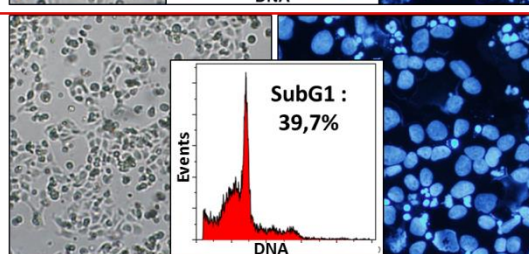
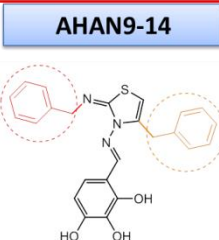
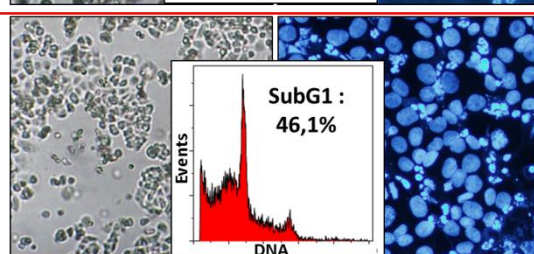
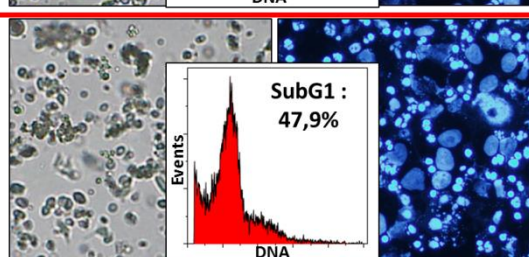
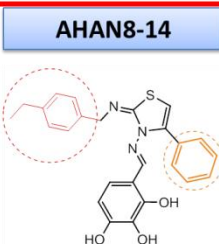
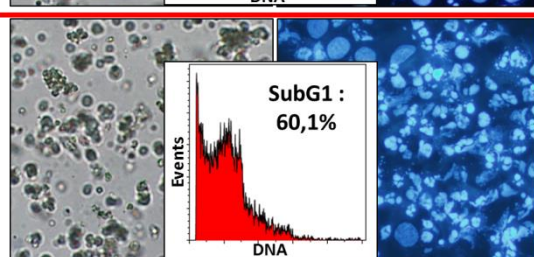
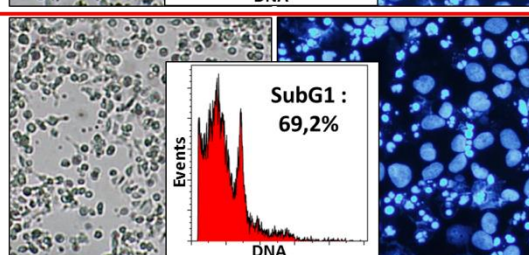
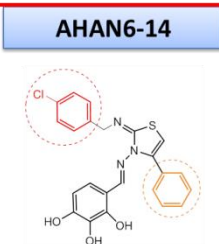
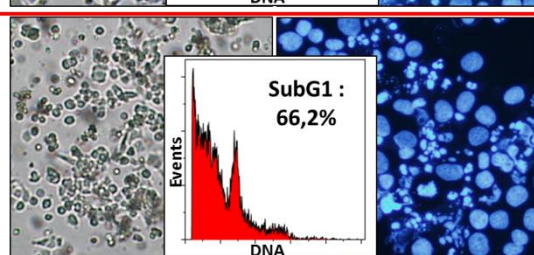
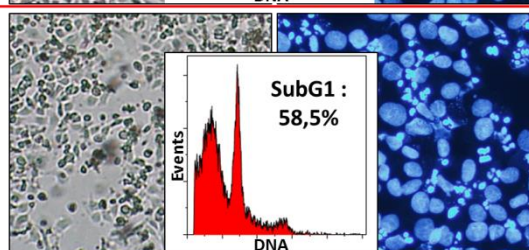
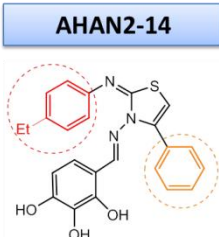
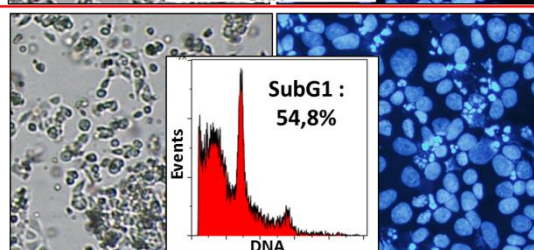
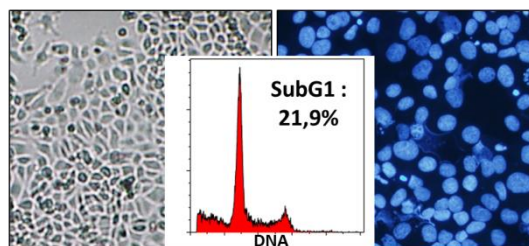
Par ailleurs, aucune molécule issue de ces modifications ne montre d'activité uniquement sur Bcl-x_L, suggérant que la substitution du cyclohexyle et du méthyl par ces noyaux aromatiques ne semble pas augmenter la spécificité de ces analogues pour Bcl-x_L, ni diminuer leur affinité pour Mcl-1. Enfin, à la concentration de 1µM, aucune de ces molécules, qu'elle soit dual inhibiteur ou inhibiteur spécifique de Mcl-1, ne montre une activité pro-apoptotique sur ce modèle cellulaire (résultats non présentés).

En conclusion, les analogues de MIM1 issus de la substitution du cyclohexyle et du méthyle par des motifs aromatiques (benzyle, phényle ou pyridine) sont actifs à la concentration de 10µM sur le modèle des IGROV1R-10. Cette concentration a donc été conservée pour la suite de nos évaluations.

siXL1



siMcl-1



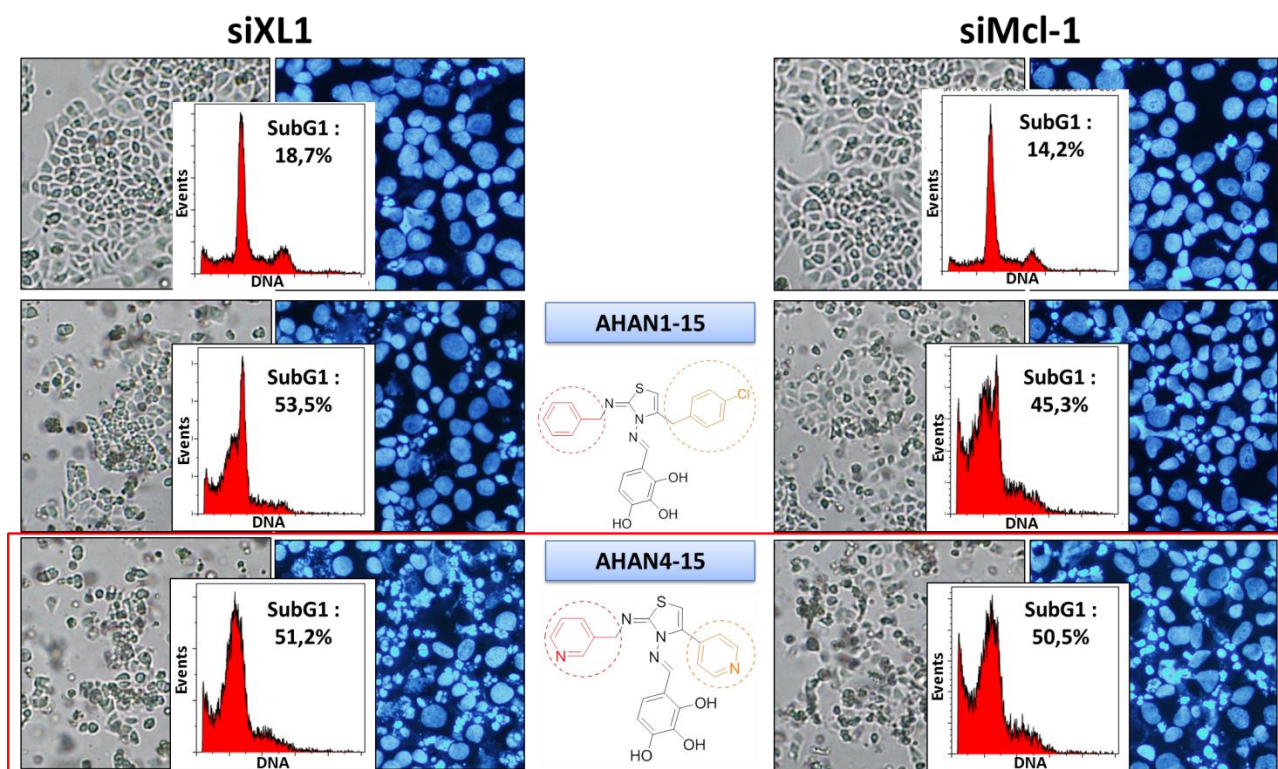


Figure 81. Effet des analogues de MIM1 potentiels dual-inhibiteurs à 10 μ M sur les cellules IGROV1-R10. Les cellules IGROV1-R10 ont été transfectées par un siARN dirigé contre Bcl-x_L (siXL1, panel de gauche) et Mcl-1 (siMcl-1, panel de droite) pendant 48h avant d'être traitées avec les différentes molécules à la concentration de 10 μ M. Après 24h de traitement, les morphologies cellulaires et nucléaires ainsi que le contenu en ADN ont été analysés. Les molécules les plus actives sont encadrées en rouge.

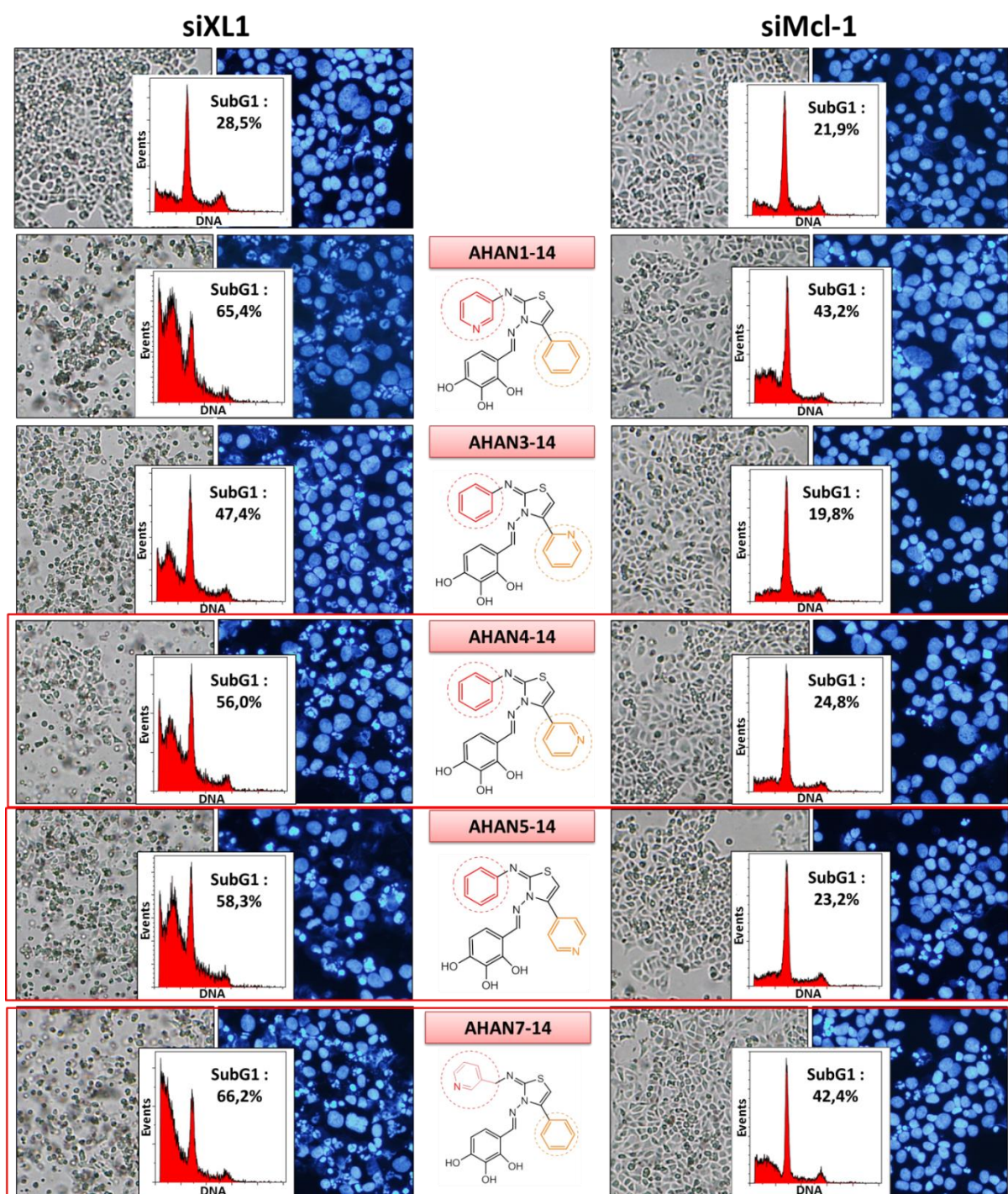


Figure 82. Effet des analogues de MIM1 potentiels inhibiteurs spécifiques de Mcl-1 à 10µM sur les cellules IGROV1-R10.

Les cellules IGROV1-R10 ont été transfectées par un siARN dirigé contre Bcl-x_L (siXL1, panel de gauche) et Mcl-1 (siMcl-1, panel de droite) pendant 48h avant d'être traitées avec les différentes molécules à la concentration de 10µM. Après 24h de traitement, les morphologies cellulaires et nucléaires ainsi que le contenu en ADN ont été analysés. Les molécules les plus actives sont encadrées en rouge.

II.4.3. Evaluation de l'effet des analogues de MIM1 seconde génération sur les cellules A2780

A l'instar des résultats obtenus sur le modèle des IGROV1-R10 (en addition à Bcl-x_L et Mcl-1), les molécules les plus actives dans les deux catégories d'inhibiteurs ont été testées sur la lignée cellulaire A2780. Cette dernière présente une forte expression de Mcl-1 dont l'inhibition induit une apoptose massive dans ces cellules. Elles ont aussi un faible taux d'expression de Bcl-x_L, et la combinaison d'un inhibiteur de Bcl-x_L tel que l'ABT-737 avec l'inhibition de Mcl-1 ne fait qu'augmenter le taux d'apoptose dans cette lignée.

L'exposition des cellules A2780 à ces différentes molécules à la concentration de 10µM en agent seul pendant 24h a démontré que les «dual inhibitors» (AHAN2-14, AHAN6-14, AHAN8-14, AHAN12-14 et AHAN4-15) induisent une apoptose massive dans cette lignée. Cette activité apoptotique est également conservée à la concentration de 5µM (Figure 83). Cependant, les molécules perdent leur activité pro-apoptotique à la concentration de 1µM (résultats non présentés).

A l'inverse, les molécules potentiellement inhibitrices spécifiques de Mcl-1 (AHAN4-14, AHAN5-14 et AHAN7-14) n'ont pas d'activité sur cette lignée à la concentration de 10µM. L'augmentation de la concentration de ces molécules à 25µM entraîne cependant l'induction d'une apoptose modérée (Figure 84). Cette lignée exprime un taux très élevé de Mcl-1 par rapport aux IGROV1-R10, expliquant probablement la nécessité d'une concentration plus élevée de ces molécules pour inhiber toutes les protéines Mcl-1 contenues dans ces cellules.

En comparant l'effet cytotoxique de ces deux catégories de molécules sur les A2780, nous avons constaté que les molécules potentiellement « dual-inhibitors » ont une grande efficacité sur ces cellules par rapport aux potentiels inhibiteurs de Mcl-1. Cette efficacité est probablement due à l'inhibition concomitante de Mcl-1 et Bcl-x_L par les « duals-inhibitors », contrairement aux molécules présentant une activité plus spécifique de Mcl-1. L'activité de ces dernières pourrait être augmentée en les combinant avec l'inhibiteur de Bcl-x_L. Cette investigation n'a pour l'instant pas été réalisée.

En conclusion, les « duals inhibitors » présentent donc une forte activité pro-apoptotique sur les A2780 à la concentration de 5µM. Par ailleurs, les molécules potentiellement inhibitrices de Mcl-1 sont plus actives que MIM1 et présentent une activité anti-apoptotique sur les A2780 à la concentration de 25µM. La substitution du cyclohexane et du méthyle avec des

cycles aromatiques semble donc augmenter l'efficacité de ces analogues sur les A2780 par rapport à la molécule mère MIM1 qui ne manifeste aucune activité pro-apoptotique à la concentration de 25 μ M.

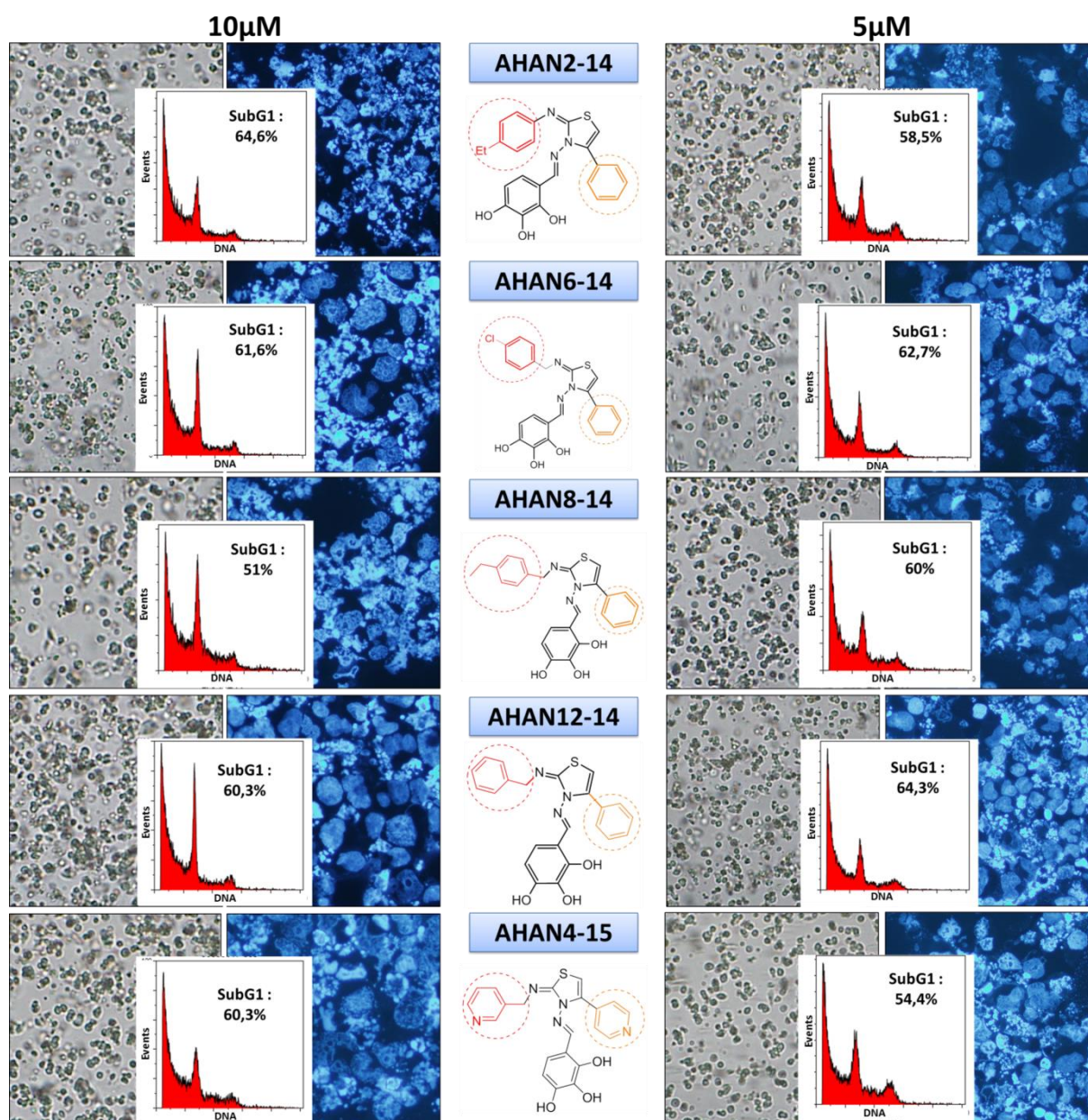


Figure 83. Effet des analogues de MIM1 potentiels « dual-inhibitor » à 5 et 10 μ M sur les cellules A2780. Les cellules A2780 ont été traitées avec les différentes molécules aux concentrations de 5 et 10 μ M. Après 24h de traitement, les morphologies cellulaires et nucléaires ainsi que le contenu en ADN ont été analysés.

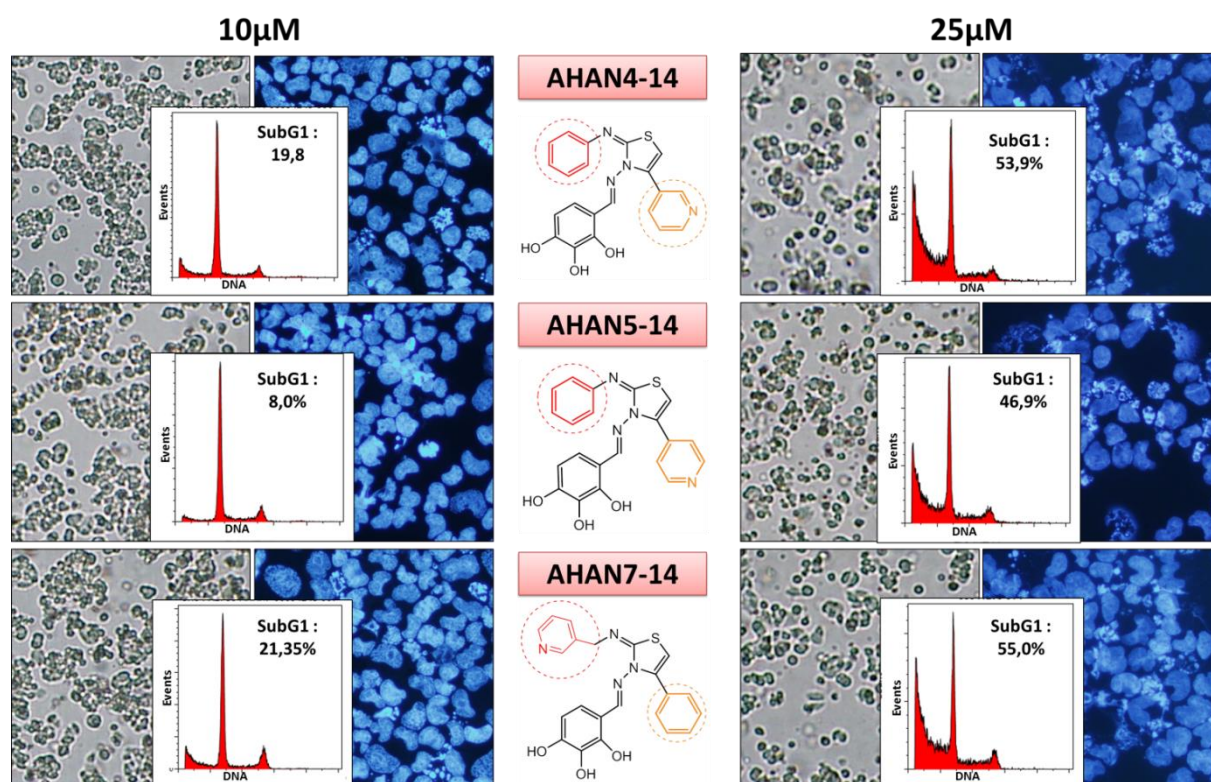


Figure 84. Effet des analogues de MIM1 potentiels inhibiteurs spécifique de Mcl-1 à 10 et 25μM sur les cellules A2780. Les cellules A2780 ont été traitées avec les différentes molécules aux concentrations de 10 et 25μM. Après 24h de traitement, les morphologies cellulaires et nucléaires ainsi que le contenu en ADN ont été analysés.

II.4.4. Etablissement d'une relation structure-activité

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que la substitution du cyclohexyle et du méthyle par des groupes benzyle, phényle ou pyridine permet d'obtenir deux catégories de molécules : **(i)** des molécules ayant une activité dual-inhibiteur sur Bcl-x_L et Mcl-1 et **(ii)** des molécules potentiellement inhibitrices de Mcl-1. Pour comprendre le rôle des différentes substitutions dans l'augmentation de la spécificité pour Mcl-1, nous avons établi une relation structure-activité et classé leur efficacité en se basant sur les résultats présentés plus haut (Figure 85).

La double modulation en position II et III de MIM1 remplaçant le cyclohexyle et le méthyle par un groupe benzyle génère la molécule AHAN9-14 qui présente une action dual inhibiteur sur Bcl-x_L et Mcl-1. Son activité pro-apoptotique sur les cellules IGROV1-R10 est modérée. Le remplacement du benzyle en position II de cette molécule par un phényle génère également un dual inhibiteur, AHAN13-14, dont l'activité pro-apoptotique est également modérée. Cependant, le remplacement du benzyle sur la position III de la AHAN9-14 avec un

phényle génère la AHAN12-14, un des plus puissants dual-inhibiteurs dont l'activité pro-apoptotique est très importante contre les cellules IGROV1-R10 (10µM) et A2780 (5µM). Cependant, la substitution du benzyle ou du phényle sur les positions II et III de la AHAN12-14 par un parachlorobenzyl génère des molécules, AHAN6-14 et AHAN1-15, également dual-inhibiteurs dont l'activité anti-apoptotique est similaire à celle de la AHAN12-14. Par ailleurs, la substitution du benzyle en position II avec un paraéthylbenzen ou paraéthylbenzyl permet d'obtenir des molécules, AHAN2-14 et AHAN8-14, présentant aussi une action dual-inhibiteurs et l'intensité de l'activité pro-apoptotique sur les cellules IGROV1-R10 et A2780 est identique à celle de la AHAN12-14.

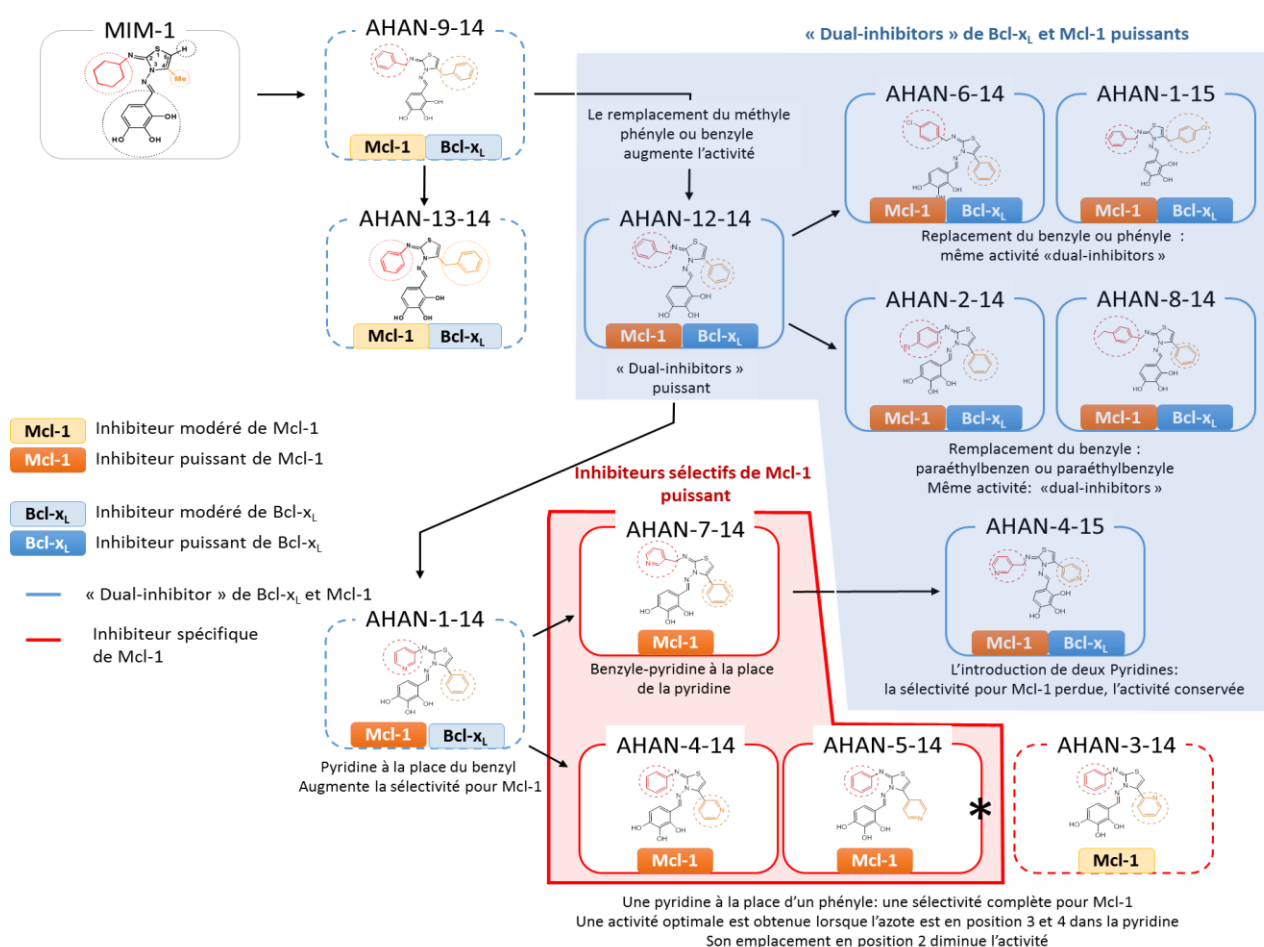


Figure 85. Schéma récapitulatif de la relation structure-activité des analogues de MIM1 seconde génération.

A l'inverse, la substitution du benzyle en position II sur l'AHAN12-14 par une pyridine (AHAN1-14) aboutit à une molécule plus spécifique de Mcl-1 que de Bcl-x_L, alors que sa substitution avec un benzyle-pyridine génère une molécule (AHAN7-14) entièrement

spécifique de Mcl-1. De la même manière, le remplacement du phényle en position III par une pyridine génère aussi des molécules (AHAN4-14 et AHAN5-14) totalement spécifiques de Mcl-1. Il est à noter que la position de l'azote dans la pyridine joue un rôle important sur l'activité pro-apoptotique de ces molécules. En effet, en dépit de leur spécificité pour Mcl-1, l'atome de l'azote en position 3 ou 4 au niveau de la pyridine (molécules AHAN4-14, AHAN5-14 et AHAN7-14) semble avoir une activité pro-apoptotique plus importante que celle ayant l'atome d'azote en position 2 (AHAN3-14). Enfin, l'introduction de pyridines sur les positions II et III de MIM1 génère un dual inhibiteur très puissant (AHAN4-15).

En conclusion, l'introduction d'un groupement benzyle (chlorobenzyle, ethylbenzène ou ethylbenzyle) ou d'un groupement phényle en position II et III à la place du cyclohexyle et du méthyle dans le squelette de MIM1 génère des molécules dotées d'une activité pro-apoptotique plus puissante que celle de MIM1, mais une spécificité qui concerne à la fois Bcl-x_L et Mcl-1 (AHAN2-14, AHAN6-14, AHAN8-14, AHAN12-14 et AHAN1-15). En revanche, l'introduction d'une pyridine dans l'une de ces positions garde la spécificité de ces analogues de MIM1 pour Mcl-1 tout en augmentant fortement leur activité pro-apoptotique (AHAN4-14, AHAN5-14, AHAN7-14 et AHAN3-14). Enfin, l'introduction de deux pyridines au niveau des deux positions génère au contraire un dual-inhibiteur (AHAN4-15).

II.5. Conclusion générale

L'évaluation de MIM1 dans les cellules cancéreuses ovariennes a démontré une activité pro-apoptotique sur les IGROV1-R10 à la concentration de 25µM (en présence d'un inhibiteur de Bcl-x_L). En comparaison avec le Pyridoclax, l'activité cytotoxique de MIM1 semble cependant relativement faible. Par ailleurs, son évaluation sur les cellules A2780 en addition à Mcl-1 a démontré qu'à la concentration de 25µM, MIM1 est complètement inactif. Cette observation est à l'encontre de ce qui a été reporté dans la littérature par Cohen et ses collègues qui montrent que l'exposition de cellules de leucémie lymphoïde complètement dépendante de Mcl-1 à la molécule MIM1 induit un effet apoptotique à partir de 10µM (Cohen et al., 2012).

La relation structure-activité établie sur la première génération des analogues de MIM1 conçue par modulation de trois différents sites de MIM1 (polyphénol (position I), cyclohexyle (position II) et méthyle (position III)) a démontré que l'activité pro-apoptotique de cette molécule nécessite la conservation des trois hydroxyles du noyau polyphénol (Cohen et al., 2012) et les travaux antérieurs du laboratoire). De plus, contrairement à ce qui a été rapporté

dans les études initiales sur la préférence pour le couple méthyle et groupement aromatique de MIM1, la substitution de ces deux éléments par des noyaux aromatiques augmente l'efficacité de cette molécule (Cohen et al., 2012 ; thèse Abdelghani Jébahi).

En se basant sur ces résultats, une seconde génération d'analogues de MIM1 a été modélisée et synthétisée en substituant le cyclohexyl et le méthyle en position II et III respectivement par des groupe benzyle, phényle ou pyridine. Cette modélisation a permis la création de 14 molécules différentes. L'évaluation biologique de ces molécules sur la lignée IGROV1-R10 en agent seul ou en combinaison avec les stratégies d'inhibition de l'expression de Bcl-x_L et Mcl-1 a permis de mettre en évidence deux catégories d'inhibiteurs : des molécules à action dual-inhibiteur de Bcl-x_L et Mcl-1 et des molécules potentiellement inhibitrice de Mcl-1. Toutes ces molécules analogues de MIM1 agissent à des concentrations plus faibles que celle de la molécule mère (10µM vs 25µM) avec une bonne efficacité. Leur efficacité a également été démontrée sur la lignée A2780 en addiction à Mcl-1. La comparaison entre les molécules dual-inhibiteurs et les potentiels inhibiteurs spécifiques de Mcl-1 ont démontré une efficacité équivalente, sur les IGROV1-R10 (action à 10µM), lorsque Bcl-x_L est inhibé. Cependant, dans les A2780, les duals-inhibiteurs semblent plus efficaces que les molécules spécifiques de Mcl-1 (entre 5 et 10µM vs 25µM). Cette différence est probablement due au faible taux de Bcl-x_L qui est inhibé dans le cas des molécules duals inhibiteurs par rapport à celles spécifiques de Mcl-1. La combinaison de ces dernières avec un inhibiteur de Bcl-x_L tel que l'ABT-737 pourrait améliorer leur efficacité (expérience planifiées).

Les études de relation structure-activité réalisées sur cette nouvelle génération a démontré que l'introduction d'un groupement benzyle substitué d'un chlore, d'un éthyle ou d'un groupement phényle au niveau de la position II ou III de la molécule MIM1 génèrerait des molécules à action « dual-inhibiteurs » de Bcl-x_L et Mcl-1 (AHAN2-14, AHAN6-14, AHAN8-14, AHAN12-14 et AHAN1-15) très efficaces contre les cellules cancéreuses ovariennes.

L'introduction d'une pyridine en position II ou III de la structure de MIM1 augmente la spécificité des molécules pour la protéine Mcl-1. Le rôle des pyridines pour cibler spécifiquement Mcl-1 a également été démontré avec le Pyridoclax (Gloaguen et al., 2015). En effet, les études de relation structure activité établies sur la première génération des molécules de la famille des oligopyridines a mis en évidence que l'élimination de l'une des deux pyridines terminales constitutives du Pyridoclax abolit complètement son activité pro-

apoptotique. Par ailleurs, les études de modélisation moléculaire ont démontré que l'azote de ces pyridines interagit avec l'Arg263 de Mcl-1. Sur la base de ces observations, l'azote des pyridines greffées en positions II et III des molécules AHAN3-14, AHAN-4-14, AHAN5-14 et AHAN7-14 pourrait également interagir avec l'Arg263 de Mcl-1, augmentant ainsi leur affinité pour cette protéine. Les études de modélisation moléculaire de ces molécules sur Mcl-1 a effectivement démontré cette interaction (résultats non présentés)

Les travaux de chimie réalisés pour la production d'analogues de MIM1 ont conduit à la synthèse de molécules nettement plus actives que la molécule d'origine, parfois avec une perte de spécificité pour Mcl-1. Si les études que nous avons menées montrent l'intérêt de ces analogues pour entraîner la mort des cellules tumorales ovariennes qui dépendent de Mcl-1 pour leur survie, il reste aujourd'hui nécessaire de démontrer de façon formelle la réalité de l'interaction entre ces molécules et les protéines Mcl-1 ou Bcl-x_L par des études complémentaires des interactions protéine-protéine, en utilisant des techniques de BRET, de SPR ou enfin les tests de polarisation de fluorescence (FPA). Ces travaux sont envisagés pour les mois à venir, avant la finalisation de la publication associée à ce travail (à soumettre début 2018 à « Journal of Medicinal Chemistry »).

Résultats *in vivo*

Evaluation préclinique du Pyridoclax, inhibiteur de Mcl-1

*Evaluation de l'effet anti-tumoral du Pyridoclax et de la toxicité associée
sur des modèles de xénogreffes sous-cutanées de cancers ovariens
humains*

III.1. Effet du Pyridoclax *in vitro*

Les travaux réalisés en commun par le Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (modélisation moléculaire et synthèse chimique), notre équipe (évaluation biologique) et d'autres partenaires nationaux (étude des interactions protéine-protéine) ont permis de démontrer l'intérêt d'une nouvelle famille d'inhibiteurs de Mcl-1 appartenant à la famille des oligopyridines dont la molécule lead, la MR29072, a été nommée Pyridoclax (Gloaguen et al., 2015). A la concentration de 25µM, le Pyridoclax est capable de sensibiliser nos modèles cellulaires de cancer ovarien aux stratégies dirigées contre Bcl-x_L (siRNA contre Bcl-x_L ou inhibition pharmacologique par l'ABT-737) et d'induire une apoptose massive (Gloaguen et al, 2015).

Suite aux résultats encourageant obtenus *in vitro*, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'efficacité du Pyridoclax *in vivo*. Ce dernier présente une forte perméabilité membranaire (P_e 16x10⁶ Cm/s) qui permet son adsorption dans les cellules. En revanche, il est très faiblement soluble dans une solution aqueuse (9,4µM à pH 7.4) ce qui limite son efficacité en milieu physiologique (Groo et al, 2017). Afin de palier à cette faible solubilité en milieu physiologique, le CERMN a produit un sel de Pyridoclax, le chlorhydrate de Pyridoclax ou MR33709 (soluble à 33.6µM à pH 7,4) (Groo et al., 2017). L'évaluation biologique *in vitro* du sel de Pyridoclax a démontré une activité pro-apoptotique similaire à celle du Pyridoclax sur les cellules cancéreuses ovariennes IGROV1-R10 lorsque les molécules sont combinées à l'ABT-737. Ces deux traitements induisent en effet un arrondissement des cellules et leur décollement, une abondante fragmentation nucléaire et un important pourcentage de cellules en pré-G1 (Figure 86A). Les clivages de la caspase 3 et de la PARP observés en western blot valident ces observations (Figure 86B).

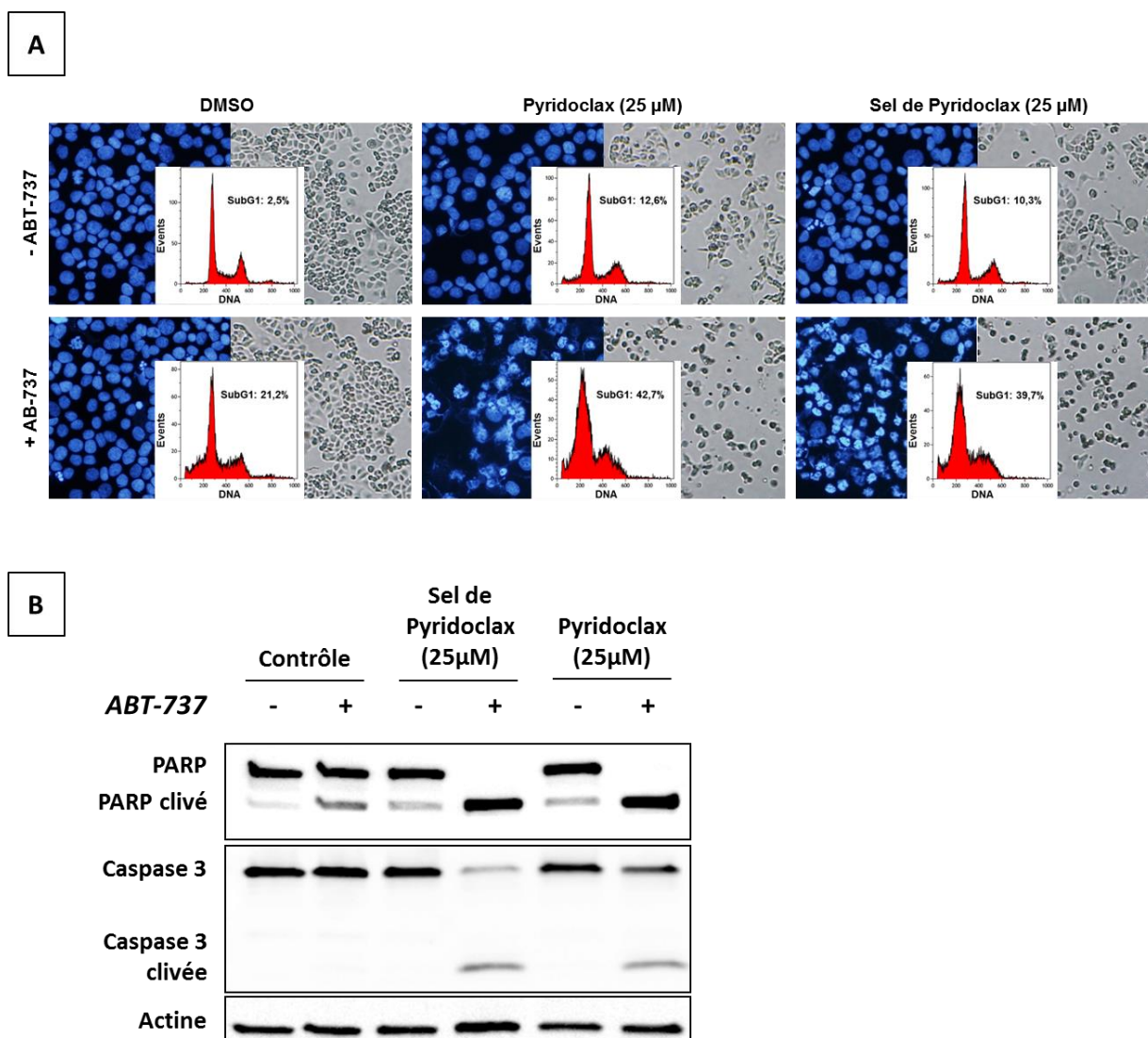


Figure 86. Comparaison de l'effet pro-apoptotique entre le Pyridoclax et le sel de Pyridoclax. Les cellules IGROV1-R10 sont traitées avec le Pyridoclax ou son sel à la concentration de 25µM en agent seul ou en combinaison avec l'ABT-737 (5µM). **(A)** Après 24h de traitement, l'effet de ces différents traitements sur la morphologie cellulaire et nucléaire et la répartition des cellules dans le cycle a été analysé. **(B)** Les expressions de la caspase 3 et de PARP ont été étudiées par western blot.

L'objectif de notre étude est d'évaluer *in vivo* l'efficacité du sel de Pyridoclax dans les différents modèles tumoraux ovariens humains en agent seul ou en association avec l'inhibiteur pharmacologique de Bcl-xL, l'ABT-263 (Navitoclax®) actuellement en développement clinique. Cette étude a pour objectifs principaux la détermination de l'efficacité anti-tumorale du Pyridoclax sur nos modèles de xénogreffes tumorales ovariennes, mais également l'identification de la dose et de la voie d'administration optimales qui permettent d'obtenir une forte activité anti-cancéreuse, en combinaison ou non avec l'ABT-

263 et enfin d'évaluer la toxicité du sel de Pyridoclax sur notre modèle animal de souris femelles *Nudes* immunodéprimées *Foxn-1*.

III.2. Les modèles de xénogreffes

L'efficacité du sel de Pyridoclax *in vivo* a été appréciée sur des modèles de tumeurs établies à partir de trois lignées cancéreuses ovariennes humaines IGROV1-R10, SKOV-3 et A2780 qui présentent différents niveaux d'addiction à Bcl-x_L et/ou à Mcl-1. Ces cellules ont été inoculées en sous-cutané au niveau des flancs de souris *Nudes* immunodéprimées *Foxn-1*. Les tumeurs qui en dérivent sont caractérisées par des histologies diverses, parfois même au sein de la même tumeur (Figure 87).

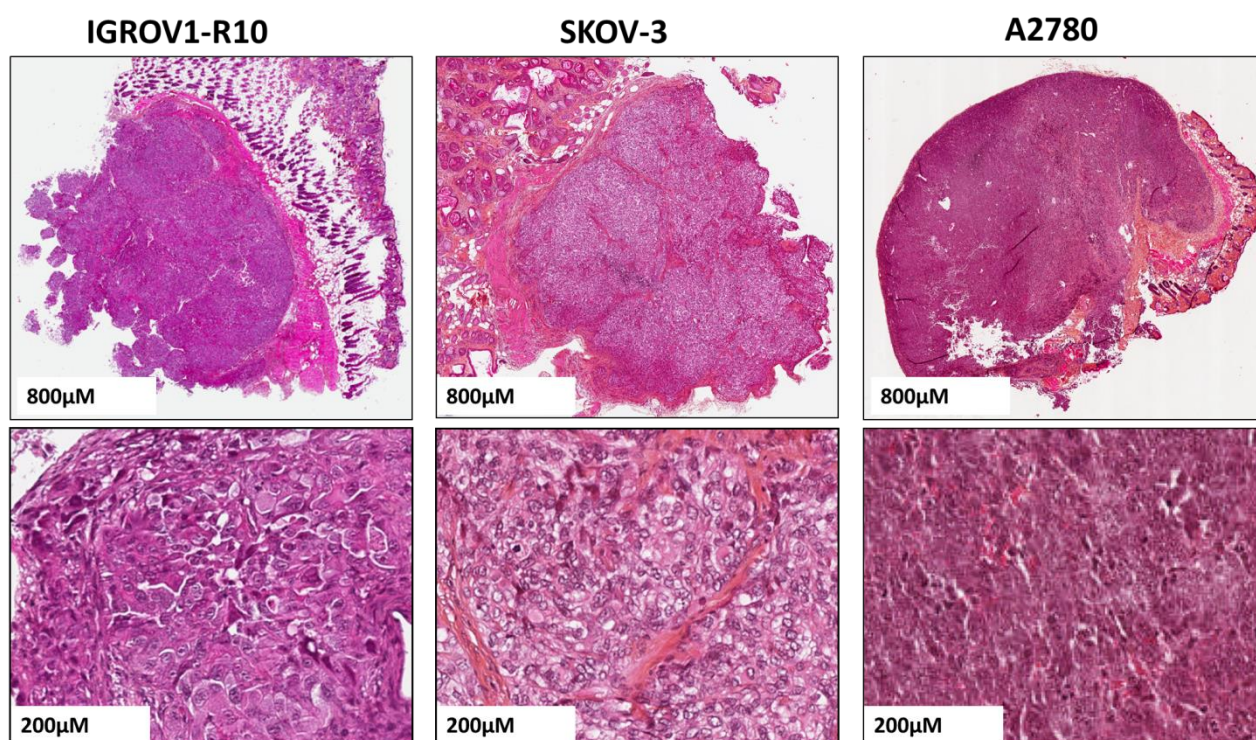


Figure 87. Aspect histologique des différents modèles de xénogreffes utilisés au laboratoire. Coloration HES des xénogreffes développées en sous-cutané et issues de l'injection des lignées tumorales ovariennes IGROV1-R10, SKOV-3 et A2780. Les composantes nucléaires, colorées en bleu par l'hématoxyline, la composante cytoplasmique, les fibres tissulaires et les produits extracellulaires sont révélés en rouge par l'érythrosine et le tissu conjonctif et les fibres de collagènes sont colorés en jaune par le safran.

En effet, les modèles tumoraux établis à partir des lignées IGROV1-R10 et SKOV-3, toutes deux dépendantes de Bcl-x_L et Mcl-1, présentent un aspect d'adénocarcinome ovarien séreux faiblement différencié associé à une composante à cellules claires plus ou moins représentée. Les tumeurs issues de l'injection de la lignée A2780, dont la survie dépend de Mcl-1,

présentent quant à elles une histologie séreuse très indifférenciée et une architecture irrégulière (Figure 87). Ce modèle, très agressif, présente spontanément des foyers de nécrose et d'hémorragie. La nécrose tumorale reflète la souffrance des tissus tumoraux et résulte d'un défaut de vascularisation ou fait suite à une apoptose massive induite par différents stimuli ou agents thérapeutiques. Les tumeurs nécrotiques peuvent contenir une masse de liquide visqueux générée par la dégradation des cellules cancéreuses et par la réponse inflammatoire.

III.3. Etude de toxicité du sel de Pyridoclax

Nous avons commencé par déterminer la dose maximale du sel de Pyridoclax tolérée par notre modèle animal de souris immunodéprimées *Nude Foxn-1* femelles. Une première étude de toxicité avait été réalisée sur des souris mâles *NMRI* par le Groupe Mémoire et Plasticité Comportementale (GMPC, Pr M. Boulouard et Pr T. Fréret EA4259, Caen). Dans cette étude, les *NMRI* ont reçu par voie orale deux doses du sel de Pyridoclax, 10 ou 100mg/kg, et leur comportement a été surveillé à différents intervalles de temps pendant 48h. A ces doses, les souris *NMRI* n'ont présenté aucun symptôme de souffrance suggérant ainsi une tolérance élevée au sel de Pyridoclax.

Sur la base de ces résultats, nous avons évalué la toxicité du sel de Pyridoclax sur notre modèle animal. Cette molécule a été préparée à 50mg/kg et 100mg/kg et administrée par voie orale. L'administration de la dose de 100mg/kg du sel de Pyridoclax a immédiatement provoqué de sévères effets indésirables qui se sont manifestés par un isolement et une mobilité réduite de la souris, une pâleur, une respiration pénible et une tachycardie conduisant au décès de la plupart des souris 1h après le traitement. L'autopsie de ces souris a révélé la présence d'œdèmes au niveau de la trachée et des foyers hémorragiques au niveau de l'estomac. Aucune autre anomalie n'a été détectée dans les autres organes. Ce résultat suggère que la dose de 100mg/kg est une dose létale pour notre souche de souris. En revanche, la dose de 50mg/kg administrée par voie orale pendant 3 jours successifs a été parfaitement tolérée par les souris. Aucune anomalie n'a été constatée sur leur comportement ou sur les organes après autopsie. Cette dose a donc été retenue pour l'administration orale du sel de Pyridoclax.

III.4. Evaluation de l'effet du sel de Pyridoclax sur les xénogreffes de lignées tumorales ovariennes humaines

III.4.1. Effet de l'ABT-263 sur les xénogreffes de lignées tumorales ovariennes

Cette étude a été réalisée afin de déterminer l'effet de l'ABT-263 en agent seul sur les modèles de tumeurs ovariennes humaines IGROV1-R10 et SKOV-3 et d'éliminer ainsi éventuellement les modèles expérimentaux présentant une forte sensibilité à ce traitement. En effet, *in vitro*, les lignées IGROV1-R10 et SKOV-3 sont dépendantes de Bcl-x_L et de Mcl-1 et leur apoptose est étroitement liée à l'inhibition concomitante de ces deux protéines. Cependant, les caractéristiques moléculaires des tumeurs issues de ces lignées et leur sensibilité à l'ABT-263 n'ont pas été établies *in vivo*. Nous avons donc étudié l'effet anti-tumoral de l'ABT-263 sur ces tumeurs avant de procéder à sa combinaison avec le sel de Pyridoclax.

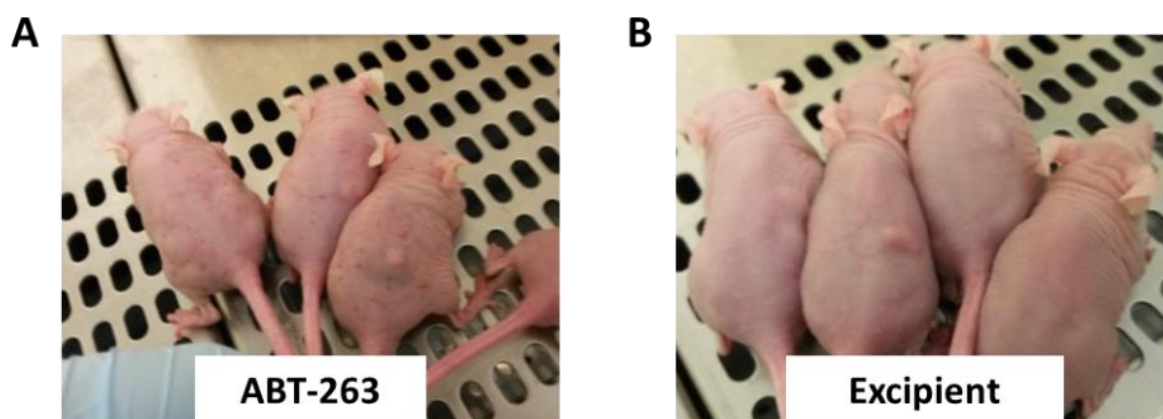


Figure 88. Effet de l'ABT-263 sur la peau des souris *Nude*. Photos comparatives entre les souris traitées par l'ABT-263 (A) ou par son excipient (B).

Les souris porteuses de tumeurs établies à partir des lignées cancéreuses IGROV1-R10 et SKOV-3 ont été traitées à l'ABT-263 à la dose de 100mg/kg (dose utilisée dans la littérature, Tse et al., Cancer Res 2008 ; Shoemaker et al., Clin Cancer Res 2008) pendant 7 jours consécutifs. L'administration de l'ABT-263 par voie orale n'a révélé aucune toxicité chez les souris. Néanmoins, six heures après la première administration, les souris traitées avec l'ABT-263 ont développé une réaction caractérisée par de petites taches rouges réparties sur tout le

corps. En revanche, ce symptôme n'est pas observé dans le groupe de souris ayant reçu son excipient (Figure 88). Cette réaction se manifeste uniquement en réponse à la première administration et disparaît au fil du temps en dépit des différentes répétitions. Nous pensons qu'il s'agit d'un purpura thrombopénique. L'utilisation de l'ABT-263 est en effet connue pour provoquer une importante thrombopénie, qui peut se traduire au niveau cutané par un purpura tel que celui que nous avons observé. Cette observation démontre que l'ABT-263 administré par voie orale est capable de passer les barrières biologiques et de passer dans la circulation systémique. Il est à noter également que cette hypersensibilité est également observée chez les souris traitées par la combinaison sel Pyridoclast /ABT-737.

L'analyse immunohistochimique (IHC) de l'induction de l'apoptose, reflétée par le marquage de la forme clivée de la caspase-3, a montré un niveau d'apoptose suffisant pour affirmer que la molécule a bien atteint la tumeur mais également suffisamment faible pour permettre l'exploitation ultérieure de ces modèles afin d'évaluer l'activité anti-tumorale du Pyridoclast (Figure 89).

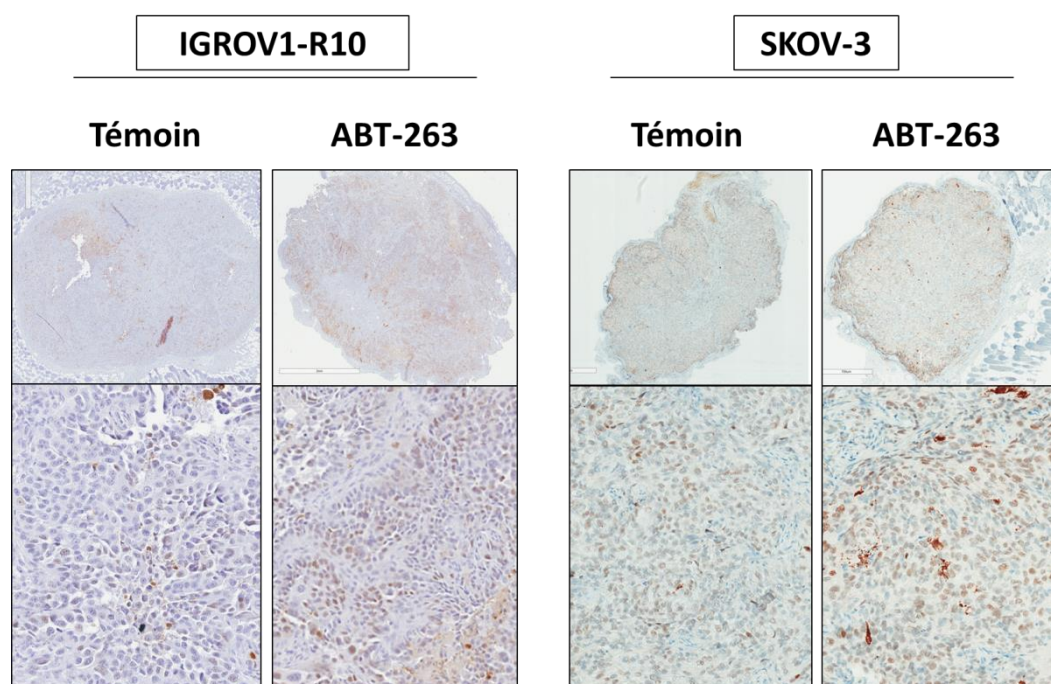


Figure 89. Le niveau d'induction de la caspase 3 clivée en réponse au traitement avec l'ABT-263 en agent seul sur les xénogreffes de tumeurs établies à partir des lignées IGROV1-R10 et SKOV-3. Les cellules tumorales IGROV1-R10 ($5 \cdot 10^6$ cellules) ou SKOV-3 ($10 \cdot 10^6$ cellules) sont injectées en sous-cutané chez les souris *Nude*. Après 15 ou 21 jours de développement tumoral, les souris sont traitées par voie orale pendant 3 jours consécutifs avec l'ABT-263 (100mg/kg). Les tumeurs sont prélevées à la fin du traitement et l'induction de l'apoptose est analysée par un immunomarquage avec un anticorps dirigé contre la caspase 3 clivée.

III.4.2. Effet du sel de Pyridoclax administré par voie orale sur les différents modèles de xénogreffes

III.4.2.1. Dans les modèles de xénogreffes IGROV1-R10 et SKOV-3

L'effet du sel de Pyridoclax administré par voie orale a été d'abord évalué sur les modèles de tumeurs IGROV1-R10 et SKOV-3 en agent seul ou en combinaison avec l'ABT-263. Les souris ont été traitées par voie orale avec le sel de Pyridoclax à 50mg/kg en agent seul ou en association avec l'ABT-263 (100mg/kg) pendant 3 jours consécutifs avec ou sans maintien de l'administration de l'ABT-263 jusqu'à 7 jours (Figure 90A). Afin d'éviter une interaction médicamenteuse, l'ABT-263 a été administré 2h après le traitement avec le sel de Pyridoclax. Le choix de ce protocole de traitement est d'une part basé sur l'incertitude quant à la tolérance des souris vis-à-vis de la combinaison médicamenteuse (sel de Pyridoclax/Navitoclax) et quant à sa toxicité à plus long terme (3 ou 7 jours), mais également sur le temps nécessaire pour observer l'action du sel de Pyridoclax sur la tumeur. A ce titre, nous avons choisi d'effectuer une administration continue d'ABT-263 pendant 7 jours afin d'assurer une inhibition continue de Bcl-X_L et d'administrer en parallèle le sel de Pyridoclax pendant les 3 premiers jours du traitement. L'induction de l'apoptose reflétera ainsi l'arrivée du Pyridoclax au niveau de la tumeur. Des résultats similaires ont été obtenus avec les deux modèles de xénogreffes SKOV-3 et IGROV1-R10. Seule l'étude sur le modèle SKOV-3 est représentée ci-dessous.

Les souris ayant reçu ce protocole de traitement ont bien toléré le sel de Pyridoclax ainsi que son association avec l'ABT-263. Aucune toxicité ou modification comportementale n'a été constatée au cours du traitement. Le suivi de la croissance tumorale en réponse aux différents traitements a montré une augmentation du volume tumoral en fonction du temps tout à fait comparable dans les différents groupes des deux protocoles (Figure 90B).

Les colorations HES réalisées sur les coupes de tumeurs n'ont pas mis en évidence de zones de lésions ou de nécrose liées aux traitements. L'évaluation de l'induction de l'apoptose par la détection de la forme clivée de la caspase 3 a montré une hétérogénéité intragroupe sans différence significative entre le groupe traité par le sel de Pyridoclax et le groupe témoin (Figure 90C). Un niveau similaire d'induction de la caspase 3 clivée a été observé dans le groupe témoin et le groupe traité par le sel de Pyridoclax, et ce pour les deux protocoles et dans les deux modèles de xénogreffes.

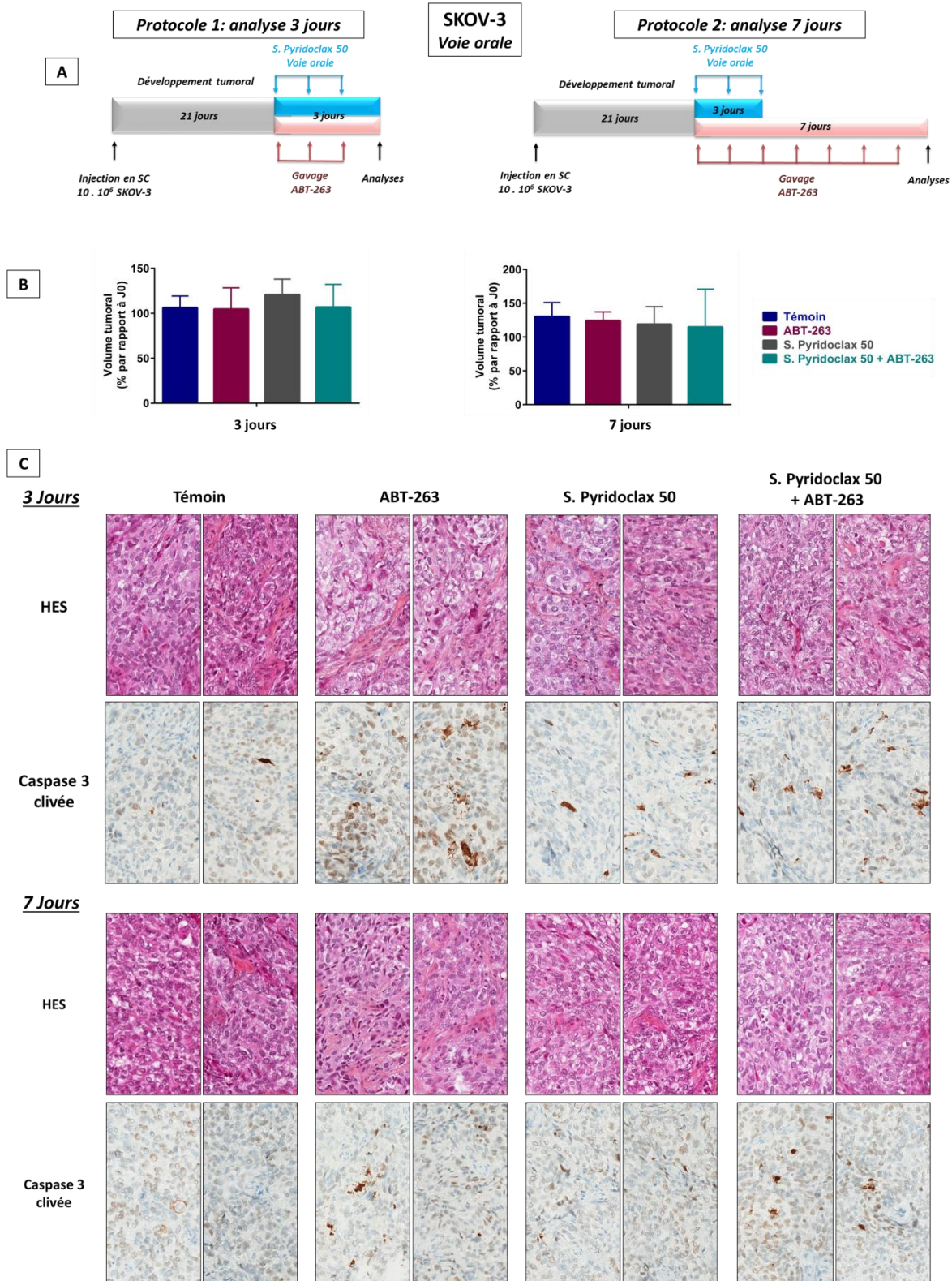


Figure 90. Effet du sel de Pyridoclast administré par voie orale sur le modèle de xénogreffe SKOV-3. (A) Les cellules tumorales SKOV-3 ($10 \cdot 10^6$ cellules) sont injectées en sous-cutané chez les souris *Nude*. Après 15 jours de développement tumoral, les souris sont traitées par voie orale pendant 3 jours consécutifs avec le sel de Pyridoclast (50mg/kg) en agent seul ou en association avec l'ABT-263 (100mg/kg) pendant 3 ou 7 jours consécutifs. **(B)** Le volume tumoral relatif correspondant aux différents groupes ($n=4$) est représenté à 3 et 7 jours de traitement. Les différences statistiques sont calculées par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un post-test de Dunns (*, $P < 0.05$). **(C)** Les tumeurs sont prélevées à la fin des traitements (3 et 7 jours) et l'aspect histologique et l'induction de l'apoptose sont analysés par coloration HES et immuno-marquage de la caspase-3 clivée respectivement.

Ceci nous a donc amené à conclure sur l'inefficacité du traitement à base du sel de Pyridoclax en agent seul lorsqu'il est administré par voie orale à une dose assimilable à la dose limite tolérée dans les deux modèles de tumeurs ovariennes. Cette observation n'était pas inattendue puisque le sel de Pyridoclax en agent seul est incapable d'induire l'apoptose *in vitro* dans ces lignées.

Par ailleurs, une légère augmentation dans le marquage de la caspase 3 clivée a été observée dans le groupe traité par l'ABT-263 en agent seul à 3 jours en comparaison avec les autres groupes témoin et le groupe sel de Pyridoclax seul. Cependant, cette augmentation n'est plus visible dans les tumeurs maintenues sous traitement par l'ABT-263 pendant 4 jours supplémentaires (Figure 90C).

Cette différence dans le marquage de la caspase 3 clivée entre 3 et 7 jours dans les tumeurs traitées au l'ABT-263 pourrait être due à l'élimination rapide des cellules cancéreuses en addiction à Bcl-x_L. Après les 7 jours de traitement, ces cellules auraient disparu, expliquant la diminution de marquage.

Enfin, l'association du sel de Pyridoclax avec l'ABT-263 n'a malheureusement pas favorisé l'induction de l'apoptose dans ces tumeurs, contrairement à ce qui avait été observé *in vitro*. En outre, nous avons constaté que l'effet pro-apoptotique de l'ABT-263 en agent seul observé à 3 jours de traitement a complètement disparu avec son association au sel de Pyridoclax (Figure 90C). Cette observation évoquerait une interaction médicamenteuse responsable de l'annihilation de l'effet de l'ABT-263, mais nous n'avons pas encore résolu cette question.

III.4.1.2. Dans le modèle de xénogreffe A2780

Pour remédier à l'hypothèse d'une potentielle interaction médicamenteuse et augmenter nos chances de mettre en évidence un effet du Pyridoclax, nous nous sommes affranchis de l'utilisation de l'ABT-263 en évaluant l'effet du sel du Pyridoclax en agent seul sur le modèle tumoral A2780 dont la survie est dépendante de Mcl-1 uniquement. Cet effet a été évalué après 3 et 7 jours de traitement par 50mg/kg/j de sel de Pyridoclax.

L'étude histologique après coloration HES a révélé la présence de foyers de nécrose dans toutes les tumeurs des différents groupes. Le traitement par le sel de Pyridoclax n'a cependant pas favorisé l'extension de ces zones qui restent équivalentes à celles du groupe témoin..

L'analyse IHC n'a démontré aucun marquage de la caspase 3 clivée en réponse au traitement avec le sel de Pyridoclax (Figure 91). Les analyses de cette étude confirment donc les résultats obtenus avec les autres modèles tumoraux et remettent en cause la pertinence de cette voie d'administration pour une bonne distribution du sel de Pyridoclax au niveau de la tumeur.

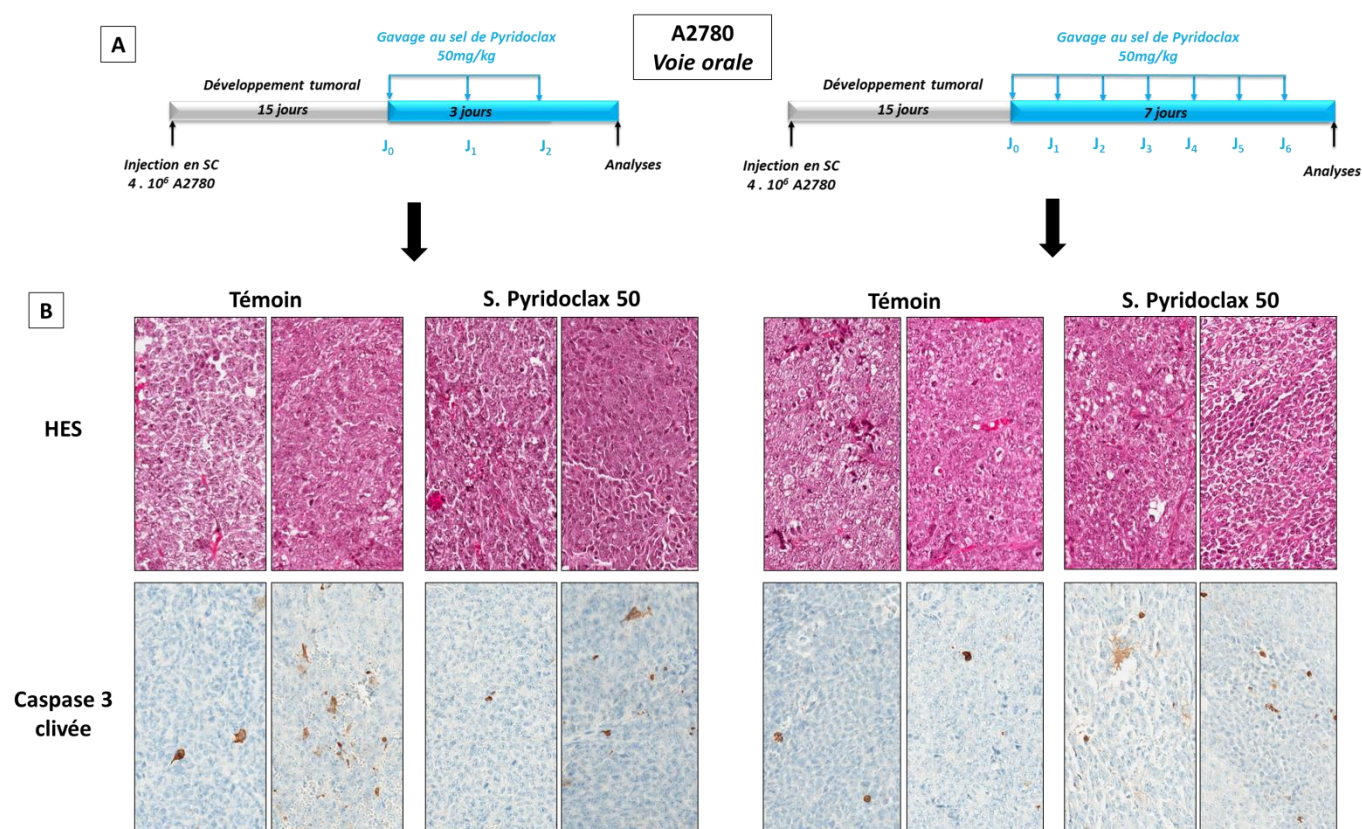


Figure 91. Effet du sel de Pyridoclax administré par voie orale sur le modèle de xénogreffe A2780. (A) Les cellules cancéreuses A2780 (4×10^6 cellules) sont injectées en sous-cutané chez les souris *Nude*. Après 15 jours de développement tumoral, les souris ont été traitées par voie orale pendant 3 ou 7 jours consécutifs avec le sel de Pyridoclax (50mg/kg/j) en agent seul ($n = 5$). **(B)** Les tumeurs sont prélevées à la fin des traitements et l'aspect histologique et l'induction de l'apoptose sont analysés respectivement par coloration HES et immuno-détection de la caspase-3 clivée.

En conclusion, la dose de 50mg/kg du sel de Pyridoclax administrée par voie orale pendant 3 ou 7 jours seul ou en association avec l'ABT-263 ne provoque pas d'effets indésirables sur notre modèle animal. Cependant, nous n'avons observé aucune activité anti-tumorale en réponse au sel du Pyridoclax en agent seul ou en association avec l'ABT-263 dans les 3 modèles de xénogreffes de lignées tumorales ovariennes. Ces résultats remettent en cause la pertinence de la voie d'administration et/ou la dose du sel de Pyridoclax. En effet, l'absence

d'effet anti-tumoral pourrait être due à l'incapacité du sel de Pyridoclax à franchir les barrières biologiques ou à sa dégradation/métabolisation lors du premier passage hépatique. Comme nous ne disposons pas encore d'une technique de dosage du Pyridoclax dans les tissus, nous n'avons pas pu vérifier la présence de notre molécule dans les tumeurs. Ceci nous a donc conduit à évaluer d'autres voies d'administration sur les différents modèles de xénogreffes de lignées tumorales ovariennes.

III.4.1.3. Effet du sel de Pyridoclax administré par voie intra-tumorale sur le modèle de xénogreffe A2780

En premier lieu, nous avons décidé de tester l'effet du sel de Pyridoclax administré directement en intra-tumoral (IT). Ce protocole a été choisi pour nous assurer de la présence du sel de Pyridoclax dans la tumeur et nous affranchir ainsi des problèmes liés aux paramètres pharmacocinétiques d'absorption et de distribution de notre molécule. Une unique injection intra-tumorale de différentes doses (1, 4 et 10mg/kg) de sel de Pyridoclax dans les tumeurs A2780 a été réalisée (Figure 92A). L'effet de la molécule sur la prolifération cellulaire et l'induction de l'apoptose dans ces tumeurs a été évalué par marquage immunohistochimique de Ki-67 et de la forme clivée de caspase 3 clivée respectivement (Figure 92 B).

Vingt-quatre heures après l'administration intra-tumorale du sel de Pyridoclax, les différentes tumeurs sont prélevées et analysées par IHC. L'immunomarquage du Ki-67 a révélé une diminution dépendante de la dose de la prolifération tumorale avec une inhibition fortement prononcée à la dose de 10mg/kg. Cependant, l'analyse de la caspase 3 clivée n'a pas révélé une induction d'apoptose en réponse au traitement (Figure 92B). Il est toutefois possible que le délai avant analyse, la dose administrée ou enfin le nombre d'injections aient été insuffisants. L'apoptose aurait ainsi peut-être pu survenir en augmentant le nombre de réitérations, le temps d'action à 2 ou 3 jours après traitement ou enfin en augmentant la dose de traitement. Il faut préciser que les cellules de la lignée A2780 expriment un très fort niveau de protéine Mcl-1. Nous n'avons pas considéré nécessaire de continuer ces expériences puisque la voie intra-tumorale est une voie jugée comme non pertinente pour le traitement des cancers. De plus, à l'instar du Pyridoclax *in vitro*, nous avons pu montrer que le sel est capable d'inhiber la prolifération tumorale *in vivo*, établissant ainsi que le sel de Pyridoclax est actif *in vivo* dans la tumeur. Par conséquent, l'échec du traitement par voie orale serait probablement dû à une mauvaise absorption et/ou de distribution de notre molécule.

Nous nous sommes donc orientés par la suite vers une administration par voie veineuse, dans le souci de rester proche des pratiques cliniques.

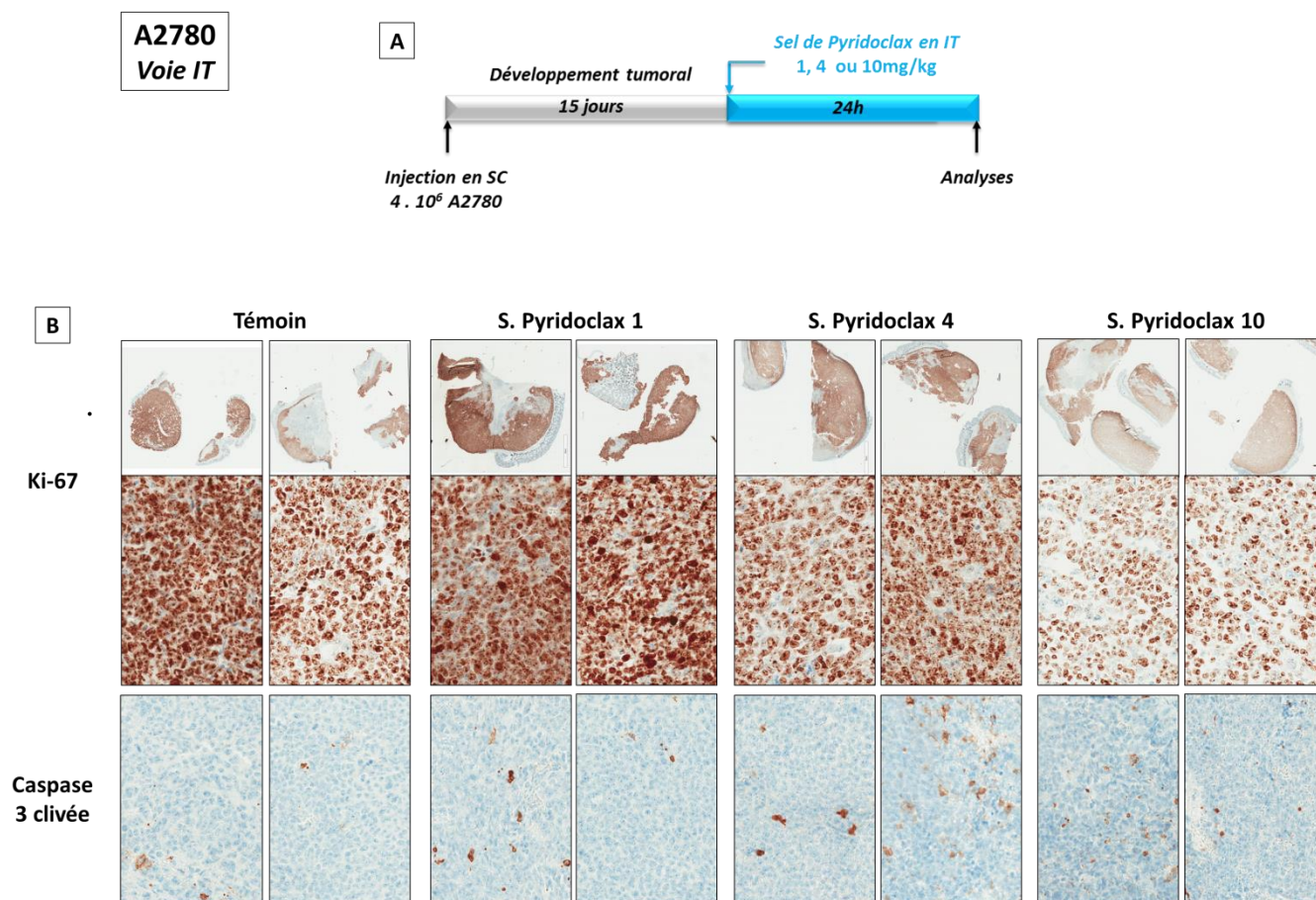


Figure 92. Effet du sel de Pyridoclast administré en intra-tumoral sur le modèle de xénogreffe A2780. (A) Les cellules cancéreuses A2780 ($4 \cdot 10^6$ cellules) sont injectées en sous-cutané chez les souris *Nude*. Après 15 jours de développement tumoral, le sel de Pyridoclast est administré par une injection unique en intra-tumoral à différentes doses (1, 4 ou 10mg/kg) ($n = 6$). **(B)** Les tumeurs sont prélevées à la fin des traitements et la prolifération cellulaire et l'induction de l'apoptose sont respectivement analysées par immuno-détection de Ki-67 et de la caspase-3 clivée.

III.4.1.4. Effet du sel de Pyridoclax administré par voie intraveineuse sur les différents modèles de xénogreffes

III.4.1.4.1. Dans le modèle de xénogreffe A2780

Sur la base des précédents résultats obtenus avec l'administration intra-tumorale, deux doses du sel de Pyridoclax (1 et 10mg/kg) ont été retenues pour tester l'efficacité de la molécule par voie IV. Ainsi l'administration en IV du sel de Pyridoclax préparé à ces doses a d'abord été testée sur le modèle de xénogreffe A2780 avec une injection par jour pendant 3 jours (Figure 93A). L'observation du comportement des animaux après injection des différentes doses de la molécule n'a révélé aucun signe de souffrance et donc une bonne tolérance au traitement.

L'étude de l'histologie des tumeurs par coloration HES a démontré la présence de foyers nécrotiques dans les différents groupes de ce protocole. L'étendue de ces zones semblait équivalente entre les deux groupes suggérant que le traitement avec le sel de Pyridoclax à la dose de 10mg/kg pendant 3 jours n'a pas eu d'impact sur la survie des cellules tumorales. En parallèle, les analyses par IHC de Ki-67 et de la caspase 3 clivée ont révélé une diminution de la prolifération cellulaire accompagnée d'une induction modérée de l'apoptose à la dose de 10mg/kg (Figure 93B). Cet effet n'a cependant pas été observé dans la dose de 1mg/kg (résultats non présentés). Ces résultats suggèrent que la voie IV est potentiellement intéressante pour la distribution du sel de Pyridoclax au niveau de la tumeur et suggèrent que l'augmentation de la dose et la durée du traitement pourraient favoriser un effet anti-tumoral.

Par la suite, nous avons donc reproduit cette expérience sur le même modèle en augmentant les doses (10, 15 et 20mg/kg) et la durée du traitement (7 jours consécutifs) (Figure 94 A). Les souris traitées par les différentes doses du sel de Pyridoclax n'ont manifesté aucun symptôme ni de perte de poids, suggérant une bonne tolérance à ces différentes doses mais aussi à la durée du traitement (Figure 94B). Nous avons également évalué les éventuelles toxicités qui résulteraient de ce traitement.

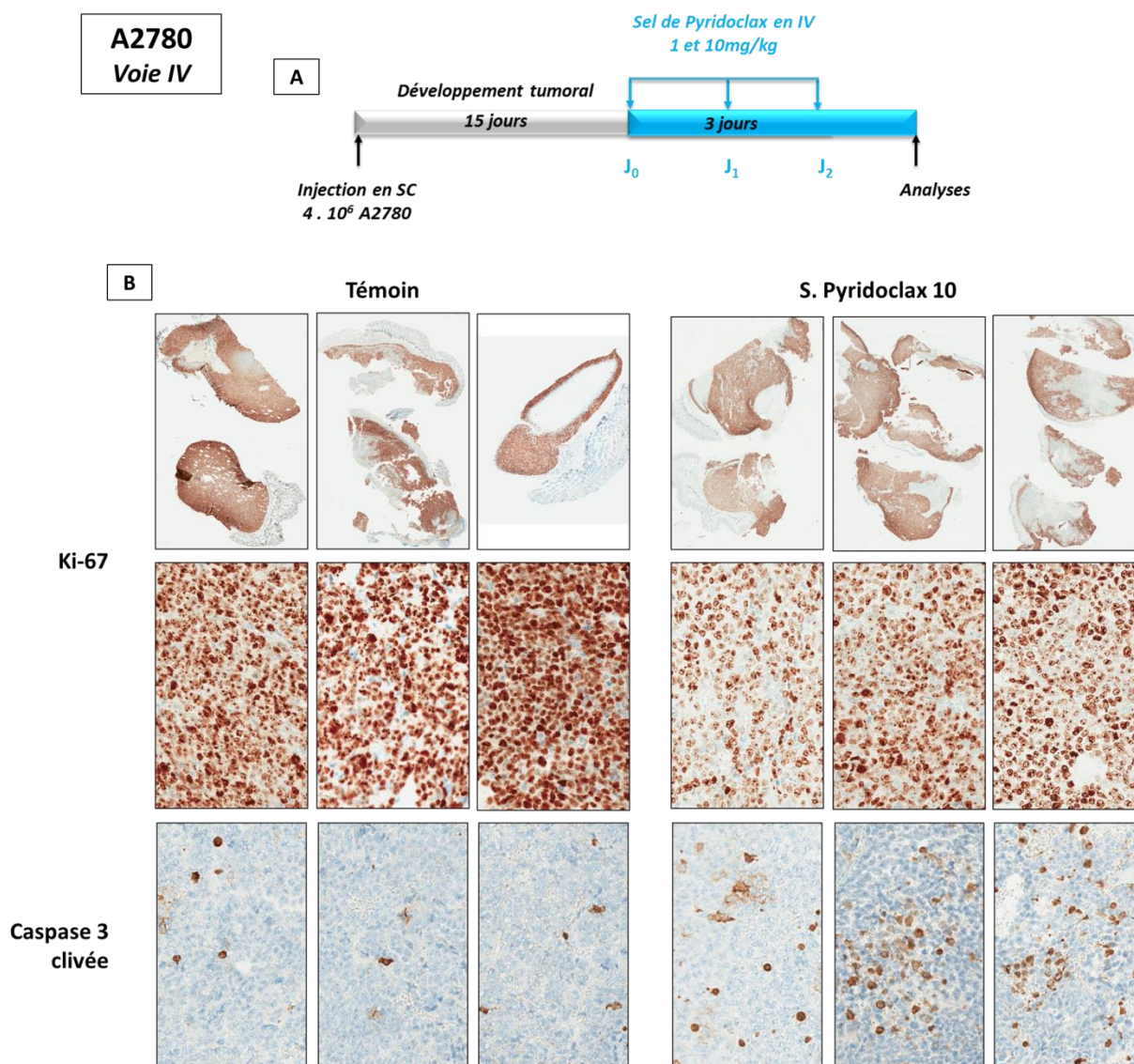


Figure 93. Effet du sel de Pyridoclax administré par voie IV à la dose de 1 et 10mg/kg sur le modèle de xénogreffe A2780. (A) Les cellules tumorales A2780 ($4 \cdot 10^6$ cellules) sont injectées en sous-cutané chez les souris *Nude*. Après 15 jours de développement tumoral, les souris sont traitées avec le sel de Pyridoclax aux doses de 1 ou 10mg/kg par voie IV pendant 3 jours consécutifs (n=3). (B) Les tumeurs sont prélevées à la fin des traitements et la prolifération cellulaire et l'induction de l'apoptose sont analysées par immuno-marquage de Ki-67 et de la caspase-3 clivée respectivement.

En effet, l'inhibition de Mcl-1 par le sel de Pyridoclax pourrait avoir un impact sur la survie des cellules exprimant fortement cette protéine, telles que les cellules cardiaques, musculaires et hépatiques. Ainsi, nous avons mesuré les paramètres biochimiques sériques tels que les transaminases (ALT/GPT pour Alanine Aminotransférase), l'urée et la créatinine afin d'évaluer de potentiels effets toxiques. Les transaminases sont fréquemment augmentées en cas de pathologie hépatique, cardiaque et musculaire. La dérégulation de l'urée est généralement associée à une insuffisance rénale accompagnée d'un dysfonctionnement

hépatique dans le cas où l'urémie est diminuée et à un dysfonctionnement cardiaque dans le cas où l'urémie est augmentée. Enfin, la créatinine est dérégulée dans les pathologies rénales. Les analyses de ces différents paramètres n'ont pas montré d'augmentation des transaminases ou de la créatinine dans les groupes traités par rapport au groupe témoin. Cette observation suggère que le traitement par le sel de Pyridoclax administré dans ces conditions n'est pas toxique et n'affecte pas les fonctions hépatiques, cardiaques ou rénales (Figure 94C).

La mesure du volume tumoral a démontré une régression tumorale significative dans le groupe traité par le sel de Pyridoclax à 10mg/kg. Curieusement, cette régression n'a cependant pas été observée dans les autres groupes de traitement par les plus fortes doses (Figure 94D). L'analyse de l'aspect histologique des tissus tumoraux par la coloration HES a mis en évidence la présence de larges zones de nécrose qui sont significativement plus étendues dans les tumeurs traitées par la plus forte dose du sel de Pyridoclax 20mg/kg (Figure 94F). La quantification de la surface nécrotique par rapport à la surface totale de la tumeur dans les différents groupes a permis de mettre en évidence une moyenne de surface nécrotique de $29\% \pm 13\%$ dans le groupe traité au sel de Pyridoclax à 20mg/kg et de $12\% \pm 14\%$ dans le groupe témoin (Figure 94E). La nécrose observée dans ces tumeurs est probablement la conséquence d'une apoptose massive qui survient de manière précoce au cours du traitement. L'immunodétection de la caspase 3 clivée sur les différentes tumeurs de ce modèle a permis de montrer que cette dernière est encore détectable sur les bords de la zone de nécrose. Compte-tenu de l'étendue des zones de nécrose, la quantification de l'apoptose résiduelle ne nous a pas paru pertinente.

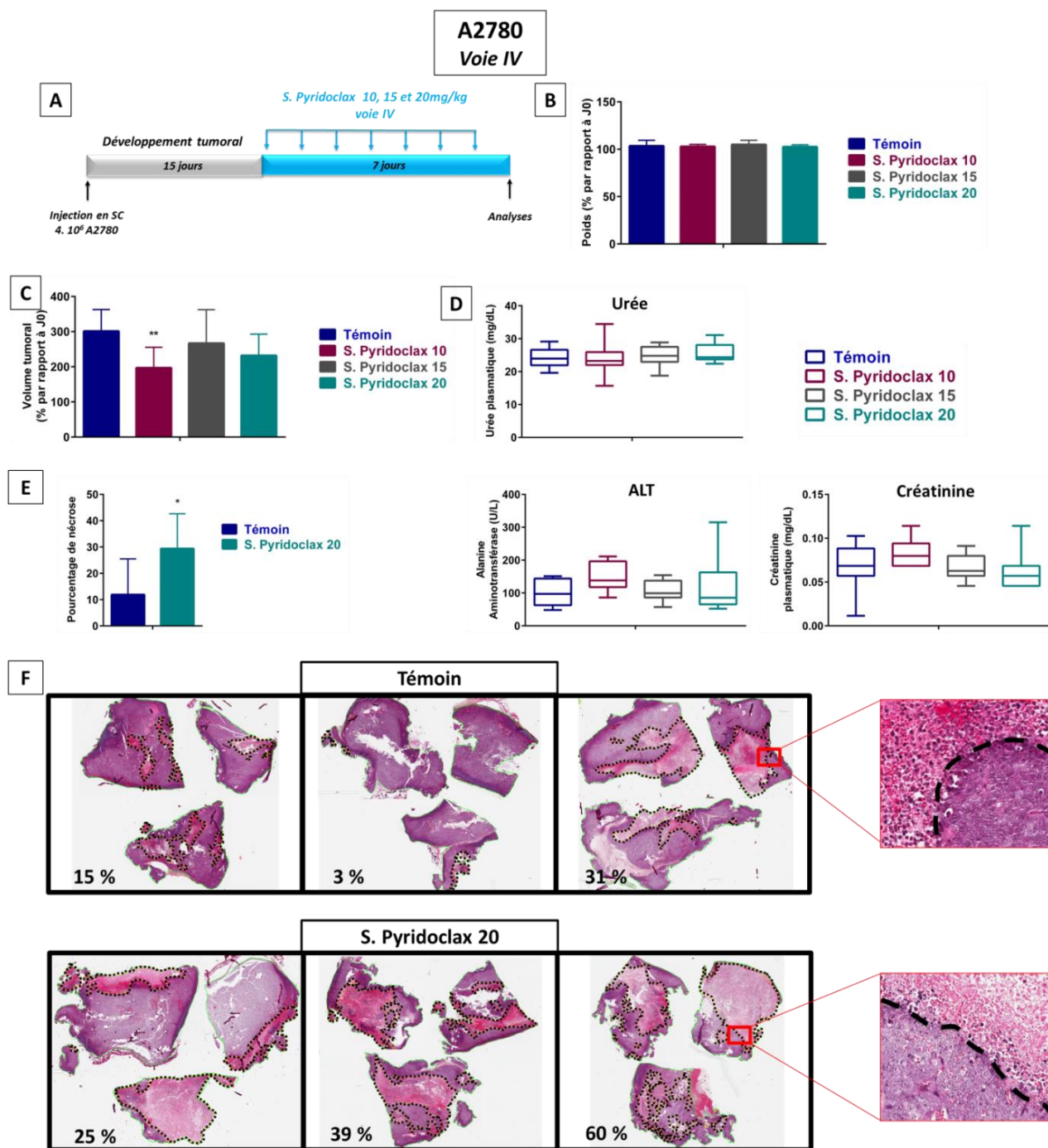


Figure 94. Effet du sel de Pyridoclox administré par voie IV aux doses de 10, 15 et 20mg/kg sur le modèle de xénogreffe A2780. (A) Les cellules tumorales A2780 ($4 \cdot 10^6$ cellules) sont injectées en sous-cutané chez les souris *Nude*. Après 15 jours de développement tumoral, les souris reçoivent les différentes doses (10, 15 et 20mg/kg) de sel de Pyridoclox par voie IV une fois par jour pendant 7 jours consécutifs (n=8). (B) Les souris de chaque groupe sont pesées au début et à la fin du traitement et leur poids relatif est représenté pour chaque groupe. (C) Le volume tumoral est mesuré au début et à la fin du traitement et le volume tumoral relatif pour chaque groupe est représenté. Les différences statistiques sont calculées par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un post-test de Dunns (**, $P < 0.01$). (D) A la fin du traitement, des prélèvements sanguins sont effectués sur les souris des différents groupes et le sérum est isolé pour l'analyse des paramètres biochimiques (urée, ALT et créatinine). (E) L'histologie de la tumeur est étudiée par coloration HES et les zones de nécrose sont délimitées et (F) quantifiées pour le groupe témoin et le groupe de souris traitées avec la dose de 20mg/kg. Les différences statistiques sont calculées par le test non paramétrique de Mann-Whitney (*, $P < 0.05$).

Le modèle de xénogreffe A2780 est un modèle caractérisé par une prolifération très active et présentant fréquemment des foyers de nécrose qui peuvent interférer dans l'évaluation de la réponse au traitement. Afin de confirmer ces résultats, les modèles de xénogreffes SKOV-3 et IGROV1-R10 ont été évalués pour leur réponse au sel de Pyridoclax administré par voie IV.

III.4.1.1.2. Dans le modèle des IGROV1-R10

Sur la base des résultats très prometteurs obtenus par administration IV du sel de Pyridoclax sur le modèle de xénogreffe A2780, nous avons évalué son efficacité dans le modèle tumoral des IGROV1-R10, en agent seul ou en combinaison avec l'ABT-263, étant donné que ce modèle est dépendant de Bcl-x_L et Mcl-1. Dans cette étude, le sel de Pyridoclax est administré par voie IV et le Navitoclax par voie orale à 6h d'intervalle afin de minimiser l'interaction médicamenteuse suspectée précédemment et de favoriser ainsi l'efficacité anti-tumorale de ce traitement.

Le sel de Pyridoclax est administré par voie IV à la dose de 10 ou 20 mg/kg en agent seul pendant 7 jours consécutifs ou combiné avec l'ABT-263 (100mg/kg) pendant les 3 derniers jours de traitement (Figure 95A). Ce protocole a été choisi sur la base des précédents résultats qui montraient que le sel de Pyridoclax mettait du temps pour agir au niveau de la tumeur. A l'inverse, l'ABT-263 agissant assez rapidement, son administration pendant les 3 derniers jours nous paraissait raisonnable pour inhiber Bcl-x_L tout en limitant les risques d'interaction avec le Pyridoclax.

A l'instar de ce qui a été démontré précédemment, le traitement par le sel de Pyridoclax seul ou sa combinaison avec l'ABT-263 a bien été toléré par notre modèle animal et aucun symptôme de souffrance n'a été observé. De plus, aucune perte de poids des animaux des différents groupes n'a été constatée, soulignant ainsi l'innocuité du traitement (Figure 95B). L'étude de la croissance tumorale a mis en évidence une diminution (qui reste cependant non significative) du volume des tumeurs traitées au sel de Pyridoclax en agent seul ou en association avec l'ABT-263 par rapport aux tumeurs des groupes témoins ou traités à l'ABT-263 seul (Figure 95C), qui pourrait être due à un ralentissement dans la prolifération des cellules cancéreuses sous l'effet du sel de Pyridoclax, à l'instar de ce qui a déjà été constaté *in vivo* et *in vitro*.

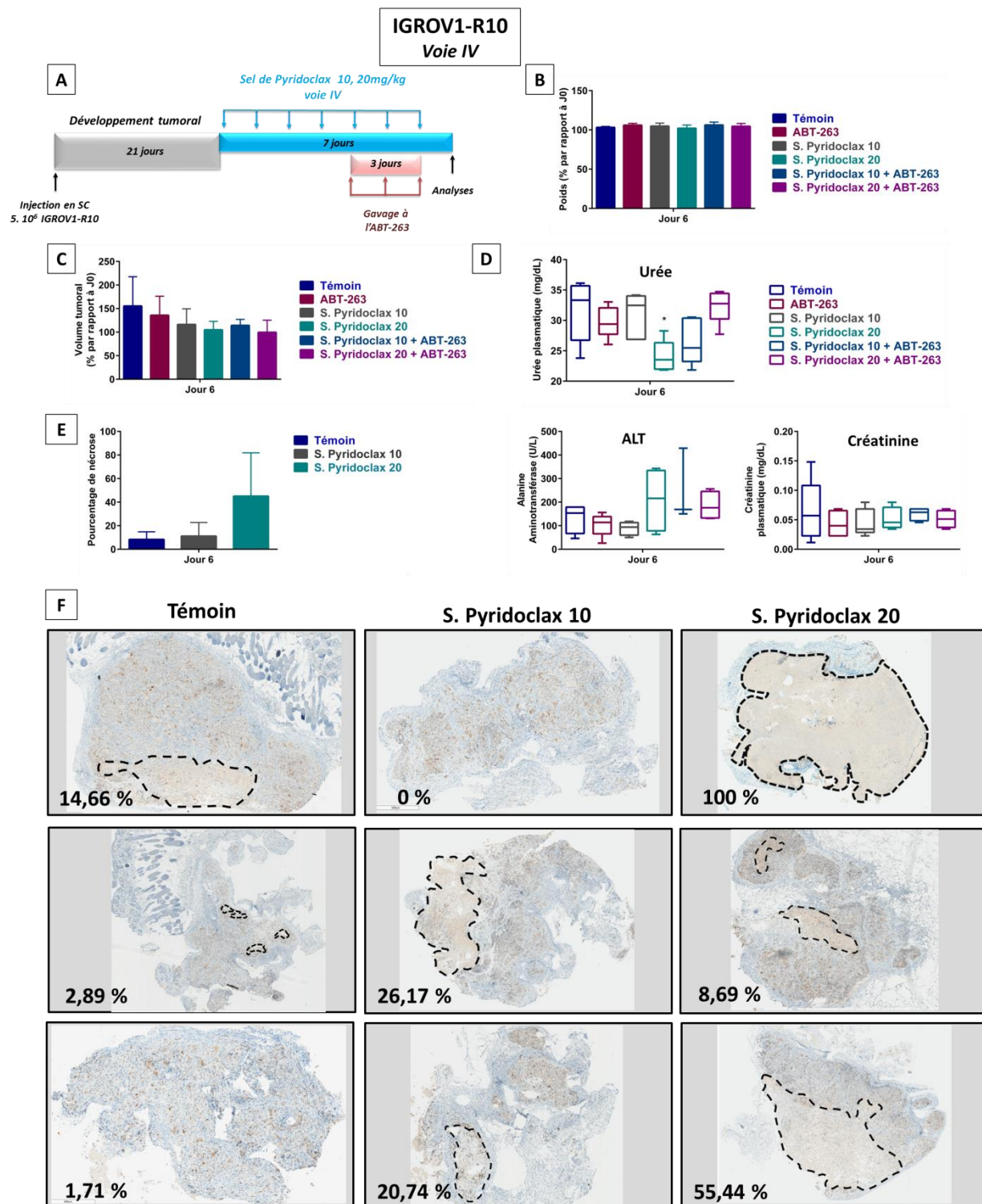


Figure 95. Effet du sel de Pyridoclast administré par voie IV aux doses de 10 et 20mg/kg sur le modèle de xénogreffe IGROV1-R10. (A) Les cellules cancéreuses IGROV1-R10 ($5 \cdot 10^6$ cellules) sont injectées en sous-cutané chez les souris *Nude*. Après 21 jours de développement tumoral, les souris reçoivent les différentes doses (10 et 20mg/kg) du sel de Pyridoclast par voie IV une fois par jour pendant 7 jours consécutifs (n=5). (B) Les souris de chaque groupe sont pesées au début et à la fin du traitement et leur poids relatif est représenté pour chaque groupe. (C) Le volume tumoral est mesuré au début et à la fin du traitement et le volume tumoral relatif pour chaque groupe est représenté. (D) A la fin du traitement, des prélèvements sanguins sont effectués sur les souris des différents groupes et le sérum est isolé pour l'analyse des paramètres biochimiques (urée, ALT et créatinine). (E) Les tumeurs sont prélevées à la fin des traitements et l'induction de l'apoptose est analysée par immuno-marquage de la caspase-3 clivée et les zones de nécrose sont délimitées et (F) quantifiées pour le groupe témoin et les groupes de souris traitées avec les doses de 10 et 20mg/kg. Les différences statistiques sont calculées par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un post-test de Dunns (*, $P < 0.05$).

Cependant, les résultats présentés plus loin suggèrent un effet puissant du Pyridoclax sans diminution visible du volume tumoral. Ce point sera abordé plus loin. L'étude de toxicité hépatique, cardiaque et rénale a également été réalisée en évaluant à la fin du traitement les paramètres biochimiques sériques suivant : l'ALT, la créatinine et l'urée (Figure 95D). Les analyses des niveaux d'ALT et de créatinine sériques n'ont pas mis en exergue de différences significatives entre les groupes traités et le groupe témoin. Cependant, l'analyse de l'urée a mis en évidence une diminution significative dans le groupe traité au sel de Pyridoclax à 20mg/kg qui pourrait être due à une éventuelle toxicité hépatique. Cette observation n'avait cependant pas été réalisée dans l'expérimentation précédente réalisée dans les mêmes conditions d'administration que celle-ci sur des souris porteuses de tumeurs A2780. La réalité et l'importance de cette potentielle variation d'urémie sera évaluée prochainement par un prestataire externe en charge des études de toxicité mises en œuvre tel que détaillé dans la discussion générale de la thèse.

Néanmoins, le niveau d'ALT, généralement dérégulé dans les dysfonctionnements hépatiques, ne varie pas entre les différents groupes. Nous avons par la suite tenté d'apprécier l'induction de l'apoptose en réponse aux différents traitements par immuno-marquage de la caspase 3 clivée. Nous nous sommes aperçus que les tumeurs traitées par le sel de Pyridoclax, et particulièrement celles traitées à la plus forte dose (20mg/kg), présentaient des foyers de nécroses plus ou moins étendus au sein du même groupe, rendant difficile l'évaluation du taux de caspase 3 clivée dans ces tumeurs (Figure 95F). Par conséquent, pour évaluer l'effet des traitements, nous avons choisi de quantifier la surface des foyers nécrotiques dans les différents groupes de ce protocole. L'évaluation de la surface de nécrose par rapport à la surface totale de la tumeur a mis en exergue la présence d'abondantes zones de nécrose dans les tumeurs traitées par le sel de Pyridoclax de façon dose-dépendante ($45\% \pm 34\%$ pour la dose de 20mg/kg et $11\% \pm 12\%$ pour la dose de 10mg/kg) par rapport au groupe témoin dont la surface de nécrose est estimée à $8\% \pm 7\%$ (Figure 95E). Toutefois, l'association de l'ABT-263 avec le sel de Pyridoclax n'a pas amélioré significativement l'effet du sel de Pyridoclax seul ($25\% \pm 21\%$ par rapport à $11\% \pm 12\%$ pour la dose de 10mg/kg et $38\% \pm 37\%$ par rapport à $45\% \pm 34\%$ pour la dose de 20mg/kg). Sur la base de ces résultats, il semblerait que la dose de 20mg/kg de sel de Pyridoclax administrée par voie IV pendant 7 jours ait un fort potentiel anti-tumoral sur le modèle de xénogreffe IGROV1-R10 sans toxicité associée. De façon intéressante, le sel de Pyridoclax en agent seul semble donc capable d'avoir un effet anti-tumoral sur ces tumeurs, et cela en dépit de l'expression de Bcl-X_L dans

ce modèle. Pour confirmer ces résultats préliminaires, nous avons reproduit le même protocole de traitement sur le modèle de xénogreffe SKOV-3.

III.4.1.1.3. Dans le modèle SKOV-3

Dans cette étude, le sel de Pyridoclax a été administré à la dose de 20mg/kg par voie IV pendant 7 jours en agent seul ou en association avec l'ABT-263 administré pendant les 3 derniers jours du traitement. Sur ce même modèle, l'effet du sel de Pyridoclax en agent seul a également été étudié à des temps plus courts de traitement (3 et 5 jours) (Figure 96A) afin de mettre en évidence l'induction éventuelle de l'apoptose et sa progression vers la nécrose, permettant ainsi de déterminer le délai optimal pour l'analyse. Les résultats présentés ci-dessous sont les résultats obtenus après 7 jours de traitement. L'analyse de la croissance tumorale n'a pas démontré de différence entre les groupes traités au sel de Pyridoclax seul ou en association avec l'ABT-263 et le groupe témoin (Figure 96B). Les études d'histologie par coloration HES effectuées après 7 jours n'ont pas mis en exergue la présence de zones de nécrose en réponse au traitement par le sel de Pyridoclax seul ou à son association avec le l'ABT-263 (Figure 96D).

Enfin, l'évaluation de la prolifération tumorale par marquage Ki-67 et sa quantification n'a pas démontré d'inhibition significative dans la prolifération des cellules tumorales en réponse au sel de Pyridoclax seul ou en association avec l'ABT-263 (Figure 96C et 96D). Ces résultats montrent que le modèle de xénogreffe SKOV-3, contrairement au modèle IGROV1-R10, est résistant au traitement par le sel de Pyridoclax seul ou combiné à l'ABT-263.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette différence dans la réponse au traitement entre ces deux modèles. En premier lieu, les doses et la durée du traitement pourraient ne pas être adaptées à ce modèle pour permettre un effet anti-tumoral. En second lieu, le modèle de xénogreffe SKOV-3 pourrait ne pas être uniquement en addiction à Bcl-x_L et Mcl-1, contrairement au comportement de la lignée *in vitro*. D'autres protéines de la famille Bcl-2 pourraient ainsi conférer la résistance au traitement.

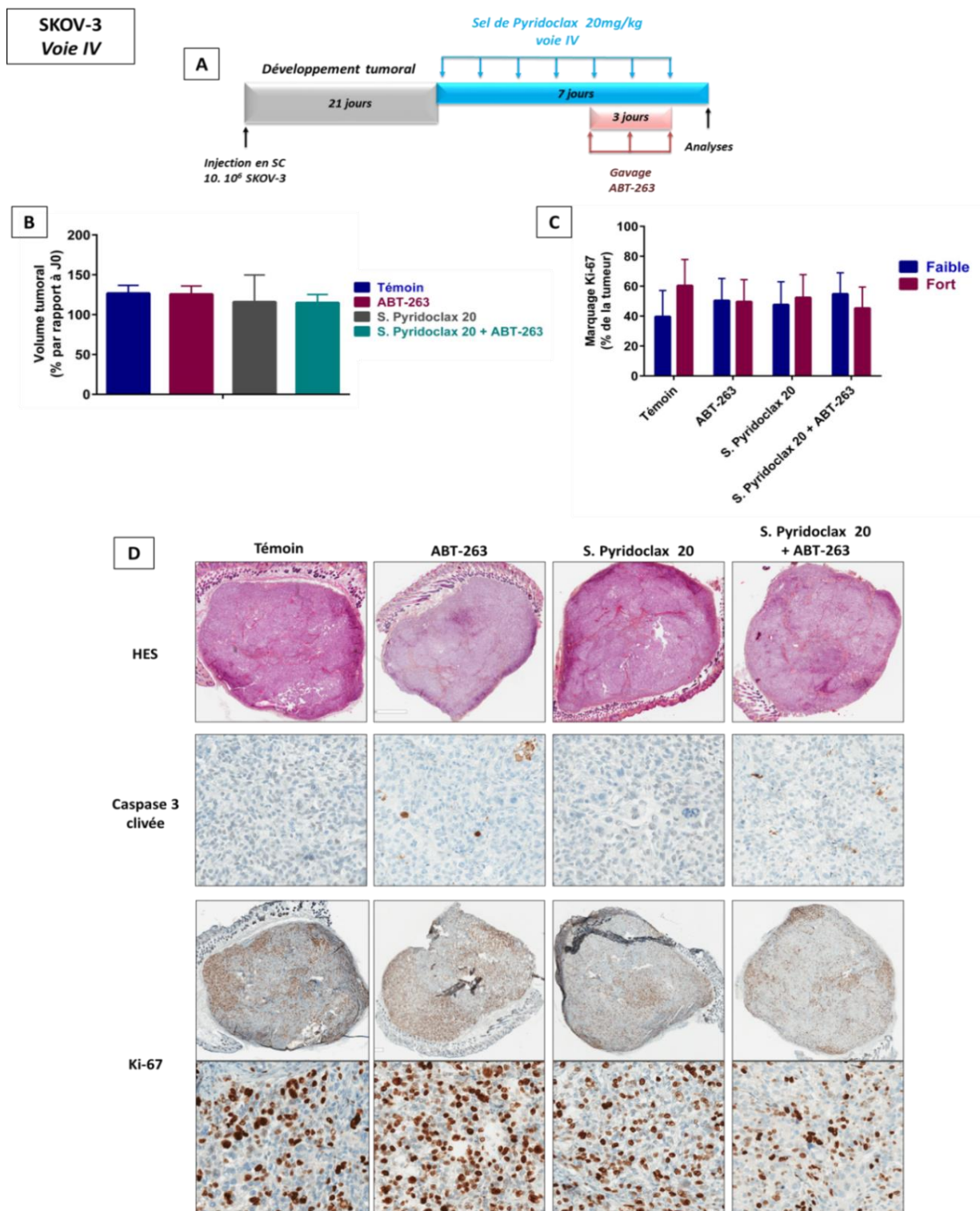


Figure 96. Effet du sel de Pyridoclast administré par voie IV à la dose de 20mg/kg sur le modèle de xénogreffe SKOV-3. (A) Les cellules cancéreuses SKOV-3 (10.10⁶ cellules) sont injectées en sous-cutané chez les souris *Nude*. Après 21 jours de développement tumoral, les souris reçoivent une dose de 20mg/kg de sel de Pyridoclast par voie IV une fois par jour pendant 7 jours consécutifs (n=5). **(B)** Le volume tumoral est mesuré au début et à la fin du traitement et le volume tumoral relatif pour chaque groupe est représenté. **(D)** Les tumeurs sont prélevées à la fin des traitements et l'aspect histologique, la prolifération cellulaire et l'induction de l'apoptose sont analysés respectivement par coloration HES et immuno-marquage de Ki-67 et de la caspase-3 clivée. **(C)** La surface des zones des tumeurs présentant une intensité du marquage Ki-67 « forte » ou « faible » par rapport à la surface totale a été estimée. Les différences statistiques sont calculées par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un post-test de Dunns (*, P < 0.05).

Pour déterminer les mécanismes sous-jacents responsables de cette différence de réponse au traitement, nous nous sommes d'abord intéressés à étudier l'expression des membres la famille Bcl-2 dans ces deux modèles. L'évaluation par IHC de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-x_L et Mcl-1 dans les tumeurs témoins a démontré que ces deux protéines sont exprimées de manière similaire dans les deux modèles de xénogreffes (Figure 97). Nous avons ensuite évalué l'expression des BH3-only tels que de Bim, Puma et Noxa dans chacun de ces modèles. Ces protéines peuvent avoir un rôle très important dans la réponse aux traitements BH3-mimétiques, tel que présenté dans la partie bibliographique de ce manuscrit. En effet, notre équipe a démontré que l'expression de Bim dans les tumeurs ovariennes humaines conditionnait la réponse à l'ABT-737. Ainsi, l'évaluation par IHC de l'expression de ces BH3-only a mis en évidence que la protéine Bim est retrouvée exprimée uniquement dans le modèle tumorale IGROV1-R10 et totalement absente dans le modèle des SKOV3, contrairement à Puma et Noxa qui sont exprimées dans les deux modèles (Figure 97). Cette différence entre ces deux modèles a déjà été démontrée *in vitro* dans les lignées à partir desquelles ces tumeurs ont été établies. En effet, la lignée cancéreuse ovarienne SKOV-3 est dépourvue de la protéine Bim qui est constitutivement phosphorylée par la voie MAPK/ERK et dégradée par le protéasome. Sur la base de ces observations, nous avons analysé la phosphorylation de la protéine ERK dans ces deux modèles et nous avons constaté que P-ERK est fortement exprimée au sein du modèle de xénogrefe SKOV-3 par rapport au modèle IGROV1-R10, expliquant ainsi l'absence de Bim dans ces tumeurs.

L'absence de Bim dans les xénogreffes SKOV-3 pourrait donc expliquer la différence de sensibilité observée entre les deux modèles de xénogreffes et être à l'origine du phénomène de résistance au sel de Pyridoclast.

L'administration par voie IV du sel de Pyridoclast pendant 7 jours consécutifs n'a pas mis en évidence de problèmes de toxicité majeurs puisqu'aucun symptôme de souffrance n'a été observé sur les souris traitées. En outre, l'analyse des paramètres biochimiques (ALT, créatinine et urée) n'a pas détecté de dysfonctionnements dans les fonctions cardiaque, hépatique ou rénale des souris.

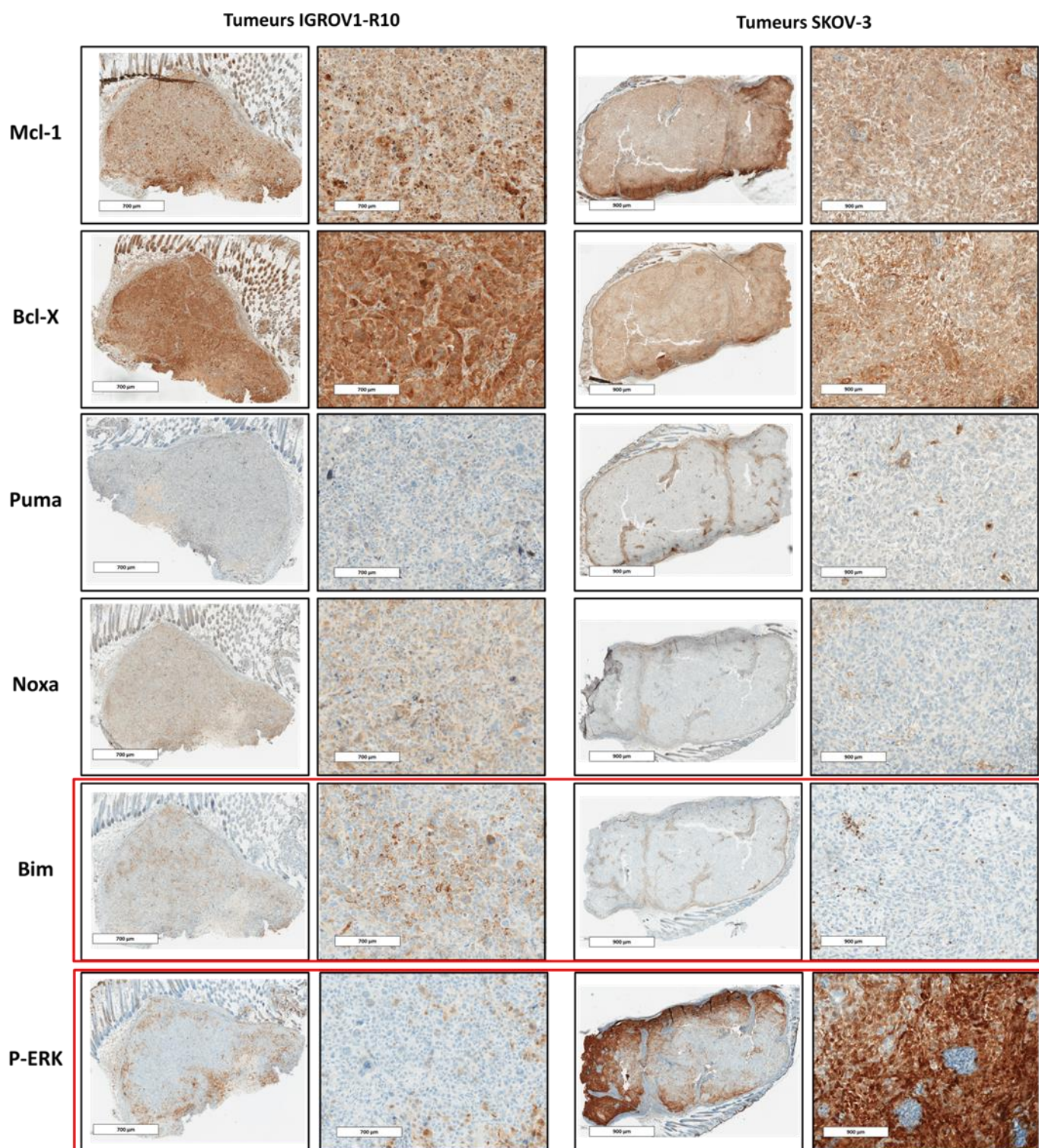


Figure 97. Comparaison de l'expression des différentes protéines de la famille Bcl-2 et de P-ERK dans les xénogreffes IGROV1-R10 et SKOV-3. Deux tumeurs non traitées issues de chacun des modèles IGROV1-R10 et SKOV-3 ont été prélevées et immuno-marquées par des anticorps dirigés contre Mcl-1, Bcl-X, Puma, Noxa, Bim et P-ERK.

Dans le même temps, l'administration du sel de Pyridoclax par voie IV a mis en exergue un effet anti-tumoral très prononcé sur deux modèles de xénogreffes de lignées tumorales ovariennes IGROV1-R10 et A2780. De larges plages de nécroses sont observées dans les tumeurs implantées en sous-cutané à la suite du traitement. L'étendue de ces foyers nécrotiques est très hétérogène entre les tumeurs d'un même groupe mais elle est cependant plus prononcée dans les tumeurs traitées avec 20mg/kg du sel de Pyridoclax. L'administration par la voie IV permettrait ainsi une distribution de la molécule au niveau de la tumeur et la dose de 20 mg/kg serait suffisante pour exercer une activité anti-tumorale.

De façon surprenante, le traitement combinant l'association du sel de Pyridoclax avec l'ABT-263 sur des xénogreffes établies à partir de la lignée tumorale dépendante de Bcl-x_L et Mcl-1 IGROV1-R10 n'a pas amélioré l'efficacité anti-tumorale. En effet, le traitement avec le sel de Pyridoclax administré par voie IV en agent seul était suffisant pour induire une nécrose massive dans la majorité des tumeurs issues de cette lignée. Le microenvironnement tumoral *in vivo* pourrait être à l'origine de cette observation et modifier la dépendance des cellules tumorales aux différentes protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Ainsi, la lignée IGROV1-R10 pourrait avoir perdu sa dépendance à Bcl-x_L *in vivo* et être davantage dépendante de Mcl-1. Par ailleurs, l'effet anti-tumoral prononcé du sel de Pyridoclax en tant qu'agent seul pourrait être dû à un effet délétère sur les cellules endothéliales murines qui conduirait à un déficit en nutriments et oxygène et à terme à la nécrose.

Enfin, la résistance des tumeurs SKOV-3 au traitement par le sel de Pyridoclax administré par voie IV pourrait être due à la faible expression de Bim et à la forte activation de la voie ERK. En effet, à la différence des tumeurs IGROV1-R10, les tumeurs SKOV-3 expriment fortement P-ERK. Cette dernière est capable de phosphoryler Bim, favorisant ainsi son instabilité et sa dégradation par le protéasome. Bim interagissant avec Mcl-1, son expression pourrait être essentielle dans la réponse au sel de Pyridoclax, d'autant plus que nous avons montré que le Pyridoclax était capable d'inhiber l'interaction Mcl-1/Bim (Gloaguen et al, 2015). De plus, nous avons également pu mettre en évidence que l'inhibition de l'expression de Bim dans la lignée IGROV1-R10 *in vitro* atténue l'effet pro-apoptotique du Pyridoclax en association avec l'ABT-737 (résultats non présentés). La combinaison du sel de Pyridoclax avec des molécules pharmacologiques capables d'induire l'expression de Bim telles que le Trametinib, actuellement en clinique, pourrait conduire à la sensibilisation des tumeurs SKOV-3 au traitement par le sel de Pyridoclax.

Voie testée	Voie orale			Voie intra-tumorale		Voie intraveineuse		
	IGROV1-R10 100 mg/kg 7	SKOV-3 100 mg/kg 7	A2780	A2780	A2780	A2780	IGROV1-R10 100 mg/kg 3 (en fin de traitement) 10, 20 mg/kg 7	SKOV-3 100 mg/kg 3 (en fin de traitement) 10, 20 mg/kg 3, 5 et 7
Modèle de xénogreffe ABT263 Réitérations			-	-	-	-	3 (en fin de traitement) 10, 20 mg/kg 7	3 (en fin de traitement) 10, 20 mg/kg 3, 5 et 7
Sel de Pyridoclast Réitérations	50 mg/kg 3 (en fin de traitement)	50 mg/kg 3 (en fin de traitement)	50 mg/kg 3 et 7	1, 4 et 10 mg/kg 1	1, 4, 10 mg/kg 3	10, 15, 20 mg/kg 7	Niveaux normaux de créatinine et d'ALT sériques. Pas de perte de poids et de symptômes de souffrance	Pas de symptômes de souffrance
Eventuelle toxicité	Pas de perte de poids et de symptômes de souffrance	Pas de perte de poids et de symptômes de souffrance	Pas de symptômes de souffrance	Pas de symptômes de souffrance	Pas de symptômes de souffrance	Niveaux normaux d'urée, de créatinine et d'ALT sériques. Pas de perte de poids et de symptômes de souffrance	Niveaux normaux de créatinine et d'ALT sériques. Pas de perte de poids et de symptômes de souffrance	Pas de symptômes de souffrance
Effet anti-tumoral	Pas d'effets sur le volume tumoral, la nécrose, et l'apoptose	Pas d'effets sur le volume tumoral, la nécrose, et l'apoptose	Pas d'effets sur le volume tumoral, la nécrose, et l'apoptose	Diminution de prolifération cellulaire (marqueur Ki-67) pour le groupe ayant reçu la dose 10 mg/kg. Pas d'effets sur le volume tumoral, la nécrose, et l'apoptose	Diminution de prolifération cellulaire (marqueur Ki-67) pour le groupe ayant reçu la dose 10 mg/kg et légère induction de l'apoptose (marqueur caspase 3 clivée)	Diminution du volume tumoral dans le groupe ayant reçu la dose de 10 mg/kg. Davantage de plages de nécrose dans le groupe ayant reçu la dose de 20 mg/kg	Davantage de plages de nécrose dans le groupe ayant reçu la dose de 20 mg/kg. Pas d'effet potentialisateur de l'association avec l'ABT-263	Pas d'effets sur le volume tumoral, la prolifération cellulaire, la nécrose, et l'apoptose
N° de Figure	Résultats non représentés	Figure 6	Figure 7	Figure 8	Figure 9	Figure 10	Figure 11	Figure 12

Tableau 6. Récapitulatif des expériences réalisées in vivo pour évaluer l'efficacité antitumorale du sel de Pyridoclast et sa toxicité associée

III.5. Conclusion et perspectives :

La collaboration entre les équipes de modélisation moléculaire et de chimie thérapeutique du CERMN, l'INSERM U1232, (Nantes) et notre Unité a permis de démontrer le potentiel d'une nouvelle catégorie de structures oligopyridiniques comme perturbateurs des interactions protéine-protéine au sein de la famille Bcl-2. Le hit de la série, appelé Pyridoclax, est capable d'interagir physiquement avec Mcl-1 et de la séparer des protéines pro-apoptotiques qu'elle séquestre (Bim et Bak). Cette molécule sensibilise les lignées tumorales ovariennes chimiorésistantes aux inhibiteurs de Bcl-x_L *in vitro* et est actif en agent seul sur les lignées dont la survie dépend uniquement de Mcl-1.

Ces résultats prometteurs ont conduit à l'évaluation préclinique du potentiel thérapeutique du Pyridoclax sur des modèles de xénogreffes de lignées tumorales ovariennes. Dans cette optique, un sel de cette molécule a été produit par le CERMN afin de remédier à la faible solubilité du Pyridoclax, qui était problématique pour son utilisation *in vivo*. Nous avons pu montrer que ce sel, 4 fois plus soluble que le Pyridoclax (Groo et al., 2017), conservait les propriétés pro-apoptotiques du Pyridoclax observées *in vitro*.

Par la suite, nous avons utilisé le sel de Pyridoclax sur des souris *Nudes* porteuses de tumeurs sous-cutanées issues de l'injection de lignées tumorales ovariennes (A2780, IGROV1-R10 et SKOV-3) sur lesquelles le Pyridoclax avait montré un effet pro-apoptotique *in vitro*.

L'administration par voie orale de 100mg/kg de sel de Pyridoclax sur des souris mâles *NMRI* (GMPC, Pr M. Boulouard et Pr T. Fréret EA4259, Caen) n'ayant révélé aucune toxicité, nous avons administré deux doses (50 et 100mg/kg) de la molécule par voie orale à notre modèle animal, des souris femelles *Nudes* immunodéprimées *Foxn-1*. La dose de 100mg/kg s'est révélée extrêmement toxique pour ces souris puisque la plupart sont décédées 1h après l'injection, nous imposant la dose de 50mg/kg, sans effets toxiques apparents, pour les études ultérieures.

Nous avons donc administré **par voie orale** cette dose en combinaison avec l'ABT-263 dans les modèles de xénogreffes SKOV-3 et IGROV1-R10 dont la survie dépend de Mcl-1 et Bcl-x_L *in vitro*, et en agent seul dans le modèle de xénogreffe A2780 dont la survie dépend uniquement de Mcl-1. L'ABT-263 seul induit une apoptose modérée après 3 jours de traitement alors qu'aucune activité anti-tumorale n'a été observée avec le sel de Pyridoclax, seul ou en association avec l'ABT-263 dans les modèles SKOV-3 et IGROV1-R10. De

même, le traitement avec le sel de Pyridoclax seul n'a eu aucun effet sur les xénogreffes A2780 (Tableau 1), nous conduisant à reconsidérer le mode d'administration de notre molécule. Pour nous assurer de sa présence dans la tumeur, nous avons choisi d'administrer le sel de Pyridoclax par voie intra-tumorale dans le modèle des xénogreffes A2780. Nous avons ainsi pu mettre en évidence un effet anti-prolifératif dose-dépendant (1, 4 et 10 mg/kg), suggérant que la voie orale ne permettait pas la distribution de notre molécule dans la tumeur.

Nous avons donc considéré l'administration par voie intraveineuse, beaucoup plus pertinente vis à vis des pratiques cliniques. Aucune toxicité évidente n'a été constatée lorsque le sel de Pyridoclax a été administré par cette voie. Une légère induction de l'apoptose a été observée dans le modèle A2780 après 3 jours de traitement avec le sel de Pyridoclax à la dose de 10mg/kg. Avec des doses plus élevées (10, 15 et 20 mg/kg) et lorsque le traitement se prolonge (7 jours), nous avons mis en évidence la présence de plus grandes surfaces de nécrose dans les xénogreffes traitées avec le Pyridoclax à la dose de 20mg/kg (Tableau 1). Il est possible de postuler sur le fait que les cellules en phase tardive de l'apoptose induite par le sel de Pyridoclax pourraient perdre l'intégrité de leur membrane plasmique et finalement s'engager dans une nécrose dite secondaire.

Afin de confirmer ces résultats sur d'autres modèles de xénogreffes, nous avons administré le traitement combinant le sel de Pyridoclax (voie IV) à l'ABT-263 (voie orale) sur le modèle IGROV1-R10. Curieusement, nous avons observé une activité anti-tumorale du sel de Pyridoclax en agent seul, alors que le traitement avec l'ABT-263 n'a pas permis de potentialiser cet effet. Néanmoins, nous n'avons pas pu mettre en évidence une telle activité de notre molécule sur le modèle de xénogreffe SKOV-3. Nous suspectons que l'absence de Bim et la forte expression de P-ERK dans les tumeurs établies *in vivo* par injection de cette lignée pourrait être préjudiciable à l'activité du sel de Pyridoclax *in vivo*.

Néanmoins, les résultats prometteurs obtenus sur les xénogreffes A2780 et IGROV1-R10 par administration intraveineuse nous conduisent à envisager des études *in vivo* supplémentaires. Afin de valider l'effet de la molécule sur ces modèles, la croissance tumorale sera suivie par imagerie par bioluminescence (collaboration avec Dr. G. Roué, Institut d'investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelone, et Pr. B. Couderc, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse) et par TEP (Tomographie par Emission de Positons). Ces modalités d'investigation permettent en effet un suivi longitudinal de l'évolution de la tumeur, chaque tumeur constituant ainsi son propre témoin. Ceci permet de s'affranchir d'éventuels

biais liés à la présence de zones nécrotiques à l'état basal et à une éventuelle distribution hétérogène de telles tumeurs dans les lots de souris. Une baisse de l'activité luciférase ou de l'activité métabolique évaluée par la μ TEP au 18F-desoxy-glucose (^{18}F -DG) dans la tumeur d'une souris ayant reçu un traitement donné est alors beaucoup plus informative et convaincant qu'une proportion de surface nécrotique hétérogène entre le lot traité et le lot témoin. Ces expérimentations sont prévues pour les semaines / mois à venir, et seront déterminantes pour conclure positivement à un effet du sel de Pyridoclax sur nos modèles.

Nous envisageons également deux autres études parallèles, la première visant à déterminer la possibilité d'utiliser des doses supérieures de Pyridoclax par voie IV, notamment pour permettre une augmentation de l'effet observé dans le modèle A2780 qui exprime fortement la protéine Mcl-1, la seconde visant à déterminer la possibilité d'observer un effet après administration IP, cette voie permettant d'envisager sans difficulté des études d'administration à plus long terme, difficilement envisageables par voie IV.

L'absence d'effet observable après 7 jours d'administration IV dans le modèle SKOV-3 est tellement contrastante avec l'effet observé dans les deux autres modèles que nous suspectons fortement une résistance au Pyridoclax liée aux caractéristiques intrinsèques des tumeurs SKOV-3. Le Pyridoclax agissant en libérant Bim et Bak de Mcl-1, l'absence de Bim apparaît comme potentiellement problématique. Notre Unité a déjà observé que cette absence dans les cellules SKOV-3, en partie liée à une forte activation de la voie MEK/ERK, provoquait la résistance à l'association d'un inhibiteur de Bcl-x_L avec un inhibiteur d'Akt, elle-même active dans la lignée IGROV1-R10 (qui exprime fortement Bim). En revanche, l'inhibition de la phosphorylation d'ERK par différents moyens entraîne une forte expression de Bim et la sensibilisation à l'association précitée. Pour le traitement des tumeurs SKOV-3, nous souhaitons donc combiner le sel de Pyridoclax avec d'autres traitements permettant d'induire l'expression de Bim (Tramétinib, AZD2014 et Belinostat).

Notre équipe vient d'initier le développement de modèles de PDX (*Patient-Derived Xenograft*), très proches des tumeurs des patientes en termes de caractéristiques comme en termes de réponse au traitement. A terme, nous souhaitons bien entendu apprécier l'effet du sel de Pyridoclax sur ces modèles. Par ailleurs, des études sont en cours pour améliorer la solubilité et l'activité du Pyridoclax par encapsulation dans des nanoémulsions (collaboration avec Dr. A-C. Groo et Pr. A. Malzert-Fréon, Centre d'Etudes et de Recherche sur le

Médicament de Normandie, Caen) et ainsi permettre l'administration par voie orale *in vivo*. L'évaluation de l'intérêt de cette formulation sera appréciée courant 2018.

Enfin, le projet Pyrimedic présenté conjointement par le CERMN et notre Unité vient d'obtenir le soutien de Normandie Valorisation pour la maturation du projet concernant l'utilisation du Pyridoclast *in vivo*. Ce projet comprend notamment une étude de toxicité complète qui sera réalisée par un prestataire extérieur pour déterminer la bio-distribution du Pyridoclast par voie orale et IV et en définir l'éventuelle toxicité aiguë et chronique chez des souris immunocompétentes ou chez des souris immunodéprimées porteuses de tumeurs ovariennes humaines.

Discussion générale

Utilisation de molécules BH3-mimétiques pour le traitement des cancers de l’ovaire : forces, faiblesses, opportunités et risques

Traitement des cancers de l’ovaire : quelles perspectives ?

Les cancers de l’ovaire représentent un vrai problème de santé publique en termes de gravité, même si leur incidence est très inférieure à celle des cancers du sein par exemple. Ils se placent ainsi au premier rang des affections malignes gynécologiques en termes de mortalité, et ce malgré une bonne réponse à la chimiothérapie de première ligne (Colombo et al., 2014). En dehors du fait qu’ils sont en général détectés à un stade avancé de la maladie, c’est bien leur capacité à récidiver et à développer une résistance au cours des traitements qui est responsable de ce dramatique constat. Du point de vue de la prise en charge, cela soulève un problème évident lié à l’absence de solutions alternatives satisfaisantes pour le traitement de la récurrence.

Le développement de stratégies anti-angiogéniques a représenté un espoir important au cours de la dernière décennie. Dans les cancers ovariens, ces stratégies présentent un certain intérêt, et le Bevacizumab a ainsi été autorisé en première ligne de traitement. Il offre aux patientes éligibles à ce traitement un vrai bénéfice en termes de qualité de vie, mais reste très décevant en termes de survie globale (Perren et al., 2011 ; Burger et al., 2011). Les efforts des oncologues portent désormais sur la démonstration de son intérêt en maintenance pour augmenter le délai de survie sans progression (ou l’intervalle libre de platine, ce qui revient presque au même).

L’apparition des inhibiteurs de PARP (Olaparib, Rucaparib etc.) représente certainement une réelle opportunité pour les patientes présentant des altérations de la voie de réparation de l’ADN par recombinaison homologue (phénotype BRCAness ou HRD) (George et al., 2017). Même si ces patientes montrent une sensibilité accrue au platine, la communauté scientifique investit ses efforts dans la recherche de moyens d’identifier aussi rapidement que possible le phénotype HRD pour développer une stratégie personnalisée basée sur ces inhibiteurs.

Ces dernières années ont donc vu quelques avancées significatives qui pourraient permettre aux patientes sensibles au platine de voir leur survie globale nettement améliorée, mais en ce qui concerne les patientes résistantes, aucun réel progrès n’est encore accessible pour leur prise en charge. Ceci souligne la nécessité persistante d’identifier de nouvelles stratégies

thérapeutiques pour le traitement de ces cancers, et justifie le fait que de multiples stratégies soient en cours d'investigation au niveau préclinique et clinique.

Modulation pharmacologique de l'apoptose en onco-gynécologie : résistance... des oncologues ?

Si les modulateurs pharmacologiques des voies de contrôle de l'apoptose, et plus particulièrement de la famille Bcl-2, ont depuis de nombreuses années convaincu les chercheurs et cliniciens travaillant dans le domaine de l'onco-hématologie, cette réalité ne s'applique pas aux tumeurs solides de façon générale encore moins au domaine des cancers ovariens.

Plusieurs équipes ont pourtant montré que les protéines de la famille Bcl-2 étaient fréquemment surexprimées dans les cancers de l'ovaire (Marone et al., 1998 ; Liu et al., 1998 ; Villedieu et al., 2007 ; Shigemasa et al., 2002), et ce parfois de façon associée au pronostic comme c'est le cas avec Bcl-x_L (Liu et al., 1998), Bcl-2 (Mano et al., 1999) ou encore Mcl-1 (Shigemasa et al., 2002). Notre équipe a démontré l'importance particulière de Bcl-x_L et Mcl-1 pour la survie des cancers ovariens (Brotin et al., 2010), et l'intérêt de leur modulation pharmacologique pour les sensibiliser à la chimiothérapie (Simonin et al., 2009 ; Simonin et al., 2013) ou même pour les entrainer vers la mort par apoptose en absence de chimiothérapie (Lheureux et al., 2015). D'autres équipes ont démontré l'intérêt de telles stratégies (Dodier and Piché, 2006 ; Abed et al., 2016 ; Witham et al., 2007). Il est vrai que toutes ces démonstrations restent expérimentales *in vitro* et que la preuve de l'efficacité de ces stratégies *in vivo* n'est pas encore faite. L'équipe d'Alan Richardson a démontré l'intérêt de l'association de l'ABT-737 avec le carboplatine dans un modèle de cancer ovarien établi chez la souris *nude* (Witham et al., 2007), mais cette association a été définitivement écartée des possibilités d'utilisation clinique du fait de sa forte toxicité révélée au cours des essais cliniques de phase I menés avec l'association ABT-263/carboplatine/paclitaxel.

Notre propre expérience de l'utilisation clinique du Navitoclax (ABT-263) montre une certaine toxicité plaquettaire en monothérapie, celle-ci n'ayant cependant représenté un frein à la poursuite du traitement que dans une part minime des patientes incluses dans l'essai MONAVI.

La poursuite du développement du Navitoclax reste très incertaine. En dépit de cela, plusieurs essais cliniques vont être initiés, principalement pour tester l'association du Navitoclax avec d'autres thérapies ciblées telles que la triple combinaison avec le Dabrafenib (inhibiteur de BRAF) et le Trametinib (inhibiteur de MEK) chez des patients atteints de mélanome avec la mutation BRAF ou de tumeur solides métastatiques non résecables. Cependant, si les difficultés rencontrées en clinique avec l'utilisation du Navitoclax ont entamé un temps l'espoir de voir les molécules BH3-mimétiques utilisées en clinique, l'identification de l'ABT-199 (Vénétoclax, ou VenclaxtaTM) comme inhibiteur spécifique de Bcl-2 (Souers et al., 2013) et son ascension fulgurante vers une utilisation clinique a été exemplaire. Le Laboratoire Abbvie a en effet découvert cet inhibiteur pharmacologique particulièrement actif et sélectif de Bcl-2 et a engagé une série d'essais cliniques pour le traitement d'un sous-type de leucémies lymphoïdes chroniques à pronostic particulièrement sombre. Les résultats des essais de phase II ont été tellement impressionnants que ce médicament a reçu une autorisation accélérée de mise sur le marché par la FDA (Food and Drug Administration) aux USA. Il est également aujourd'hui évalué en clinique pour le traitement d'autres types de cancers hématologiques (Grant, 2017).

Cette « success story » a nettement crédibilisé les recherches portant sur les molécules BH3-mimétiques, et l'attention des oncologues est désormais attirée sur cette nouvelle classe de médicaments. Notre devoir est maintenant de faire en sorte que ce soit également le cas en onco-gynécologie, même si au sein de notre équipe c'est déjà chose faite.

Mcl-1 : une cible prioritaire et pertinente en oncologie

Si le ciblage direct de Bcl-x_L, pourtant accessible *via* l'utilisation du Navitoclax, est identifié comme une importante source de toxicité associée au traitement, Mcl-1 reste une cible d'intérêt à la fois pour sensibiliser aux inhibiteurs de Bcl-x_L et Bcl-2 et pour induire la mort des cellules cancéreuses dépendantes de cette protéine pour leur survie.

La communauté scientifique a donc progressivement investi ses efforts dans la recherche de solutions capables d'inhiber l'expression ou la fonction de Mcl-1, en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques directs ou indirects. Les travaux proposant diverses solutions d'inhibition indirecte sont nombreux, et montrent par exemple la possibilité de moduler les voies de signalisation PI3/AkT/mTOR et MEK/ERK (Pétigny-Lechartier et al., 2017; Jebahi et al., 2014; Zang et al., 2013 ; Nishioka et al., 2010 ; Konopleva et al., 2012), d'utiliser l'induction du stress du RE (Gomez-Bougie et al., 2011), la modulation des flux calciques (Bonfond et

al., 2015), l'inhibition du protéasome ou encore la chimiothérapie conventionnelle (Simonin et al., 2013 ; Lee et al., 2011) pour inhiber Mcl-1 ou induire ses partenaires pro-apoptotiques Bim, Puma ou Noxa. Ces différentes possibilités ont été évoquées dans la partie bibliographique et constituent de réelles opportunités thérapeutiques, la limitation à leur utilisation restant toujours la toxicité combinée relevée lors d'utilisation d'associations pharmacologiques.

Notre Laboratoire s'intéresse à plusieurs de ces stratégies, mais mon travail de thèse a été focalisé sur les inhibiteurs pharmacologiques directs de Mcl-1, c'est-à-dire sur les petites molécules BH3-mimétiques. Je focaliserai donc également cette discussion sur l'intérêt de ces molécules et l'espoir qu'elles représentent en oncologie.

Inhibiteurs Pharmacologiques directs de Mcl-1 : des centaines de molécules décrites, une seule in vivo, aucune en clinique.

Différentes molécules BH3-mimétiques (Obatoclax, BH3-M6, Gossypol et ses dérivés) ont été proposées comme inhibiteurs de Mcl-1. Il s'agit cependant de molécules soi-disant pan-inhibitrices qui finalement ne semblent pas capables d'interagir avec Mcl-1 *in cellulo*, mais plutôt d'aboutir à son inhibition indirecte (ce qui n'est pas inintéressant en soi mais sort du contexte de la recherche d'inhibiteurs directs de Mcl-1).

La découverte de deux peptides BH3, l'un (BimS2A) constitué par un variant de Bim (Lee et al., 2014b), l'autre (Mcl-1 SAHB), constitué par le propre domaine BH3 de Mcl-1 (Stewart et al., 2010), et tous les deux capables d'inhiber spécifiquement la fonction de Mcl-1 par un mécanisme « noxa-like », a établi la preuve de concept que de tels inhibiteurs spécifiques peuvent être développés.

Plusieurs approches ont également permis l'identification de molécules inhibitrices de Mcl-1, soit relativement peu spécifique comme les composés S1 (Song et al., 2012) ou 4g (Zang et al., 2013), soit de façon beaucoup plus spécifique et active comme le Marinopyrrole A (Maritoclax) (Doi et al., 2012) ou le composé MIM1 (Cohen et al., 2012). Peu de données sont disponibles sur ces molécules, mais leur découverte laissait espérer que nous entrions dans une nouvelle ère de design de tels inhibiteurs.

La découverte récente de la molécule S63845 (Kotschy et al., 2016) suscite de nouveaux espoirs, puisqu'il s'agit de la première molécule spécifique pour laquelle une activité antitumorale a pu être démontrée ***in vivo***. Cette activité est tout à fait remarquable en agent

seul (25mg/kg) sur les tumeurs hématologiques étudiées issues de l'injection de lignée de myélome multiple (AMO1 et H929) et de leucémie aiguë myéloblastique (MV-4-11). Néanmoins, il faut souligner qu'à la dose de 12,5mg/kg, la molécule n'exerce aucun effet anti-tumoral sur les xénogreffes issues de la lignée H929. De plus, alors que cette molécule est très active en agent seul sur certaines lignées tumorales mammaires ou certaines lignées dérivées de PDX mammaires *in vitro*, son activité en agent seul reste très modeste voire nulle sur ces mêmes modèles dépendants de Mcl-1 lorsqu'ils sont xénogreffés chez la souris immunodéprimée. Toutefois, elle sensibilise ces mêmes modèles à différentes chimiothérapies, au docétaxel (stabilisateur de microtubules) dans un modèle de cancer du sein triple-négatif et aux lapatinib (inhibiteur de l'activité tyrosine kinase des récepteurs EGFR et HER2/Neu) et trastuzumab (anticorps dirigé contre les récepteurs HER2/neu) dans des modèles présentant une surexpression de HER2. Ceci semble suggérer que la biodistribution de cette molécule est moins favorable à une utilisation sur les tumeurs solides que sur les tumeurs hématologiques et appelle de nouveaux développements visant à améliorer sa distribution intratumorale et/ou son activité.

Le développement du Pyridoclax (et de ses dérivés) par notre équipe se place dans une même démarche. Bien placé en termes d'affinité pour Mcl-1 (de l'ordre du nM), il semble très difficile à retirer de Mcl-1 une fois qu'il lui est associé. De façon surprenante, une concentration de 25µM est nécessaire *in vitro* pour observer son activité. Cette différence pourrait être due à son interaction avec l'albumine, suggérée par la modélisation moléculaire et démontrée par l'expérience (résultats non présentés). Ayant réalisé cette observation, nous avons également pu montrer que son activité était très fortement augmentée lorsque les cellules sont exposées au Pyridoclax dans du milieu sans sérum puisqu'il présente une activité persistante à 2.5µM. Une telle liaison de molécules inhibitrices de Mcl-1 à l'albumine a été récemment décrite par l'équipe de S. Fesik (Zhao et al., 2017). En effet, l'inhibiteur de Mcl-1 est capable de se lier à l'albumine sérique humaine *via* son site 3. Ce dernier est capable d'accepter des molécules plus larges et plus rigides que les sites 1 et 2 de la protéine, comme la camptothécine. S'il est vrai que cette liaison peut représenter un net désavantage *in vitro*, il n'est pas impossible qu'elle représente au contraire un avantage *in vivo*, en permettant au Pyridoclax d'être protégé dans le sérum et transporté de façon optimale dans la tumeur. Cette propriété de l'albumine à augmenter la concentration de molécules (ou nutriments) grâce à une capture privilégiée au niveau de la tumeur est documentée. En effet, des études anciennes et une plus récente ont montré que les cellules tumorales capturaient des niveaux élevés

d'albumine (Commisso et al., 2013 ; Schilling et al., 1992 ; Stehle et al., 1997) afin de générer des substrats pour subvenir à leurs besoins en énergie, pour leur métabolisme et leur prolifération. Ainsi, les faibles concentrations sériques en albumine observées chez les patients atteints de cancer pourraient être la conséquence du catabolisme de l'albumine par la tumeur (Stehle et al., 1997). En outre, les tumeurs solides présentent fréquemment des vaisseaux sanguins immatures et hautement perméables avec des défauts de drainage lymphatiques qui favorisent l'accumulation et la rétention de macromolécules telles que l'albumine dans la tumeur (Carmeliet and Jain, 2000 ; Greish, 2007). L'appétit des cellules tumorales pour l'albumine a ainsi été détourné à des fins thérapeutiques pour transporter du paclitaxel dans la formulation de l'Abraxane (Sparreboom et al., 2005; <http://www.abraxane.com/>).

La solubilité du Pyridoclax restant toutefois très relative, l'utilisation d'un sel s'impose *in vivo*. En parallèle de l'évaluation de l'intérêt antitumoral du sel de Pyridoclax sur des modèles de lignées tumorales ovariennes xénogreffées chez la souris nude, nous avons poursuivi notre travail de développement de molécules inhibitrices de Mcl-1 potentiellement plus solubles et plus actives que le Pyridoclax.

Recherche d'analogues de MIM1 : une très nette amélioration d'activité et de multiples leçons.

L'identification de la molécule MIM1 a également suscité de l'intérêt dans la communauté scientifique, mais l'activité décrite dans la publication initiale n'a pas été relevée par d'autres équipes sur d'autres modèles (Varadarajan et al., 2013), montrant que cette molécule est probablement peu active. Dans les cancers ovariens, la molécule MIM1 reste moins active que le Pyridoclax, comme le montrent les résultats présentés dans ce manuscrit. Cependant, la pharmacomodulation engagée par l'équipe de René Grée a permis de dégager des pistes intéressantes de relations structure / activité, et de produire des molécules beaucoup plus actives que MIM1. De façon intéressante, certaines modifications entraînent une affinité pour Bcl-x_L et font de ces molécules de potentiels « dual inhibitors ». Au contraire, l'introduction d'une pyridine offre la spécificité pour Mcl-1 tout en augmentant très nettement l'activité, laissant suspecter une interaction avec l'Arg263 de Mcl-1 avec l'azote de la pyridine (Gloaguen et al., 2015), tel que proposé par la modélisation moléculaire. Ainsi, comme c'est le cas pour la MR31367, l'Arg263 et la Lys234 semblent constituer des résidus majeurs à cibler pour l'activité et la spécificité des molécules inhibitrices de Mcl-1.

La réalité de l'interaction entre ces molécules et les protéines Mcl-1 ou Bcl-x_L doit maintenant être démontrée par des études complémentaires des interactions protéine-protéine, en utilisant des techniques de BRET (INSERM U1232, Nantes), de SPR (Inserm U1037, Toulouse) ou enfin les tests de polarisation de fluorescence (FPA) en cours de développement par le CERMN. Ces travaux sont envisagés pour les mois à venir, avant la finalisation de la publication associée à ce travail (à soumettre début 2018 à « *Journal of Medicinal Chemistry* »).

La structure de MIM1 est protégée par un brevet international, nous ne pourrions donc pas aller beaucoup plus loin avec ces structures. Cependant, cette série de pharmacomodulation de MIM1 nous ont beaucoup appris et pourront être mises à profit pour le design de molécules innovantes auxquelles nos partenaires chimistes et modélisateurs réfléchissent déjà...

Molécules dérivées du Pyridoclax : vers un nouveau lead de la série ?

La recherche de dérivés plus actifs que le Pyridoclax a fait appel à la modélisation moléculaire réalisée au CERMN par le Pr Jana Sopkova De Olivera Santos, en vue d'identifier des molécules portant des résidus permettant d'interagir avec la Lys 234 de Mcl-1, tout en conservant l'interaction avec L'Arg 263. Compte-tenu des résultats précédemment obtenus, il a été choisi de modifier une seule des deux pyridines terminales, pour donner lieu au final à la sélection et à la synthèse de deux séries de quatre molécules, chacune, désignées en série Up et série Down selon la pyridine qui est modifiée.

Sept de ces 8 molécules sont actives, mais une seule d'entre elle, la MR31367 (qui porte un acetamide oxime en position « down ») apparaît plus active que le Pyridoclax. Il faut noter que dans 3 couples sur 4, la position down offre une meilleure activité que la position up, ce qui pourrait suggérer que ces substitutions offre une position préférentielle à ces molécules dans laquelle la pyridine interagit avec l'Arg263 et le résidu placé en position down interagit avec la Lys234. La MR31367 étant la molécule qui porte le résidu de plus grande longueur, il n'est pas impossible qu'il s'agisse de la molécule ayant la plus grande capacité à interagir avec la Lys 234, expliquant ainsi son activité accrue.

Comme cela a été observé avec le Pyridoclax, l'affinité de cette molécule conçue comme une « noxa-like » est probablement inférieure ou égale à celle de Noxa pour Mcl-1 (ce qui est à priori normal) puisqu'elle n'est pas capable de déplacer Noxa de Mcl-1 (alors qu'elle déplace Bim et Bak). L'un des points importants des résultats présentés ici est constitué par le fait que

la MR31367 présente la capacité de déplacer Bim et Bak de Mcl-1 même en absence de Noxa, éliminant la possibilité que son activité soit liée à l'induction de Noxa (elle-même probablement liée à l'induction du stress du RE). Ceci différencie cette série et cette molécule d'autres molécules précédemment présentées comme BH3-mimétiques inhibiteurs de Mcl-1 alors que leur activité était en fait dépendante de l'induction de Noxa (Obatoclax par exemple) (Oliver et al., 2004).

Alors que le Pyridoclax n'est pas actif en agent seul même à 25µM sur les lignées qui dépendent à la fois de Bcl-x_L et de Mcl-1 pour leur survie, nous avons observé une activité cytotoxique de la molécule MR31367 en agent seul sur ces mêmes lignées. Il peut s'agir d'un effet complètement « off-target », ou éventuellement révéler un aspect dual-inhibiteur observable uniquement à cette concentration. Ceci signifierait que cette molécule pourrait être capable de se lier à Bcl-x_L à de fortes concentrations, cet effet étant rapidement perdu lorsque la concentration baisse. Ainsi, à 15µM, cette molécule perd toute activité en agent seul, ne sensibilise pas du tout à l'inhibition de Mcl-1 par un siRNA (qui indiquerait un éventuel effet sur Bcl-x_L), mais reste très active en association avec l'inhibition de Bcl-x_L (suggérant l'inhibition de Mcl-1 qui a ensuite été démontrée). Nous n'avons pas étudié la possibilité de cette molécule se fixe à Bcl-x_L (modélisation moléculaire, BRET et SPR) à de fortes concentrations, mais ce travail pourrait être très informatif.

Les premiers résultats de SPR n'ont en revanche pas confirmé la forte interaction entre Mcl-1 et la MR31367 que nous suspicions. Néanmoins, la modification du protocole d'immobilisation (immobilisation de Mcl-1 *via* la fonction amine plutôt que le motif histidine) a permis de considérablement diminuer la constante d'affinité (70µM versus 3mM) ce qui laisse espérer que le protocole peut encore être optimisé. Il est cependant intéressant de constater à quel point la simple modification de l'une des deux pyridines terminales et l'interaction probable avec la Lys 234 peuvent influencer l'interaction avec Mcl-1 et changer les propriétés de la molécule. Les nouveaux tests de SPR en cours nous diront si ces observations sont confirmées, et nous aideront à comprendre les propriétés de cette intéressante molécule.

Quoi qu'il en soit, la molécule MR31367 pourrait constituer le nouveau lead de la série des oligopyridines. Elle devrait montrer une solubilité augmentée par rapport au Pyridoclax en raison de la présence de groupes polaires et présente une activité plus importante *in vitro*. Il reste maintenant à étudier son activité et sa toxicité éventuelle *in vivo*, ce qui représente un

travail très conséquent. Cette évaluation pourrait être réalisée dans les mois à venir en parallèle de l'évaluation du Pyridoclax *in vivo* dans le cadre du projet Pyrimedic récemment financé par Normandie Valorisation. Seuls les résultats d'une telle étude comparative *in vivo* pourront déterminer laquelle des deux molécules représentera le meilleur candidat médicament pour une application clinique éventuelle en oncologie.

Pyridoclax in vivo : fait des efforts mais peut mieux faire (?)

L'étude de l'intérêt du Pyridoclax et de ses dérivés *in vivo* n'en est qu'à ses débuts, mais les prémices de résultats que nous avons obtenus sont relativement excitants, puisque malgré une activité très modeste *in vitro* (25µM), le Pyridoclax semble actif à une dose (20mg/kg/j) tout à fait comparable à celles utilisées pour le Navitoclax d'Abbvie (100mg/kg/j ; Shoemaker et al., 2008) ou encore le S63845 (25mg/kg/j ; Kotschy et al., 2016) de Servier.

Les études de toxicité préliminaires qui ont été réalisées chez la souris NMRI montrent qu'il est possible de dépasser 100mg/kg sans aucun signe de toxicité, mais chez la souris *Nude*, plus fragile, cette dose est létale par voie orale. La dose de 50mg/kg/j est en revanche très bien tolérée par voie orale, et la dose de 20 mg/kg/j administrées par voie IV l'est également.

Il faut préciser que ces études ne concernent qu'une administration sur 7 jours, et qu'à la fois la toxicité et l'efficacité du Pyridoclax pourraient se trouver modifiées dans le cadre d'une administration plus longue.

Par ailleurs, nous n'avons pas réalisé d'étude de toxicité à proprement parler. Il est donc nécessaire d'engager une étude beaucoup plus lourde concernant cette toxicité avant d'aller beaucoup plus loin avec cette molécule et ses dérivés, une toxicité inacceptable avérée pouvant donner un coup d'arrêt brutal à ces travaux. Dans le cadre du projet Pyrimedic soutenu par Normandie Valorisation, un appel d'offre vient d'être lancé pour la réalisation d'une prestation d'étude complète de la toxicité aiguë et chronique du Pyridoclax et de l'un de ses dérivés (peut-être la MR31367). Les paramètres pharmacocinétiques et de bio-distribution dans les organes chez la souris immunocompétente et dans les organes et la tumeur xénogreffée chez la souris immunodéprimée, après administration par voie orale et par voie IV seront ainsi déterminés. Ces études, très couteuses et chronophages, avaient besoin des résultats préliminaires que nous avons obtenus pour être engagées.

En attendant les résultats de ces études, nos observations comportementales, biochimiques et histologiques n'ont pas révélé de toxicité après 7 jours d'administration du Pyridoclax, ce qui

est encourageant. Nos résultats préliminaires concernant l'analyse de la formule sanguine montre que le Pyridoclax, contrairement à l'ABT-737, n'entraîne aucune baisse du nombre de plaquettes. Ceci confirme ce que nos travaux *in vitro* et la SPR ont précédemment établi, à savoir que le Pyridoclax n'inhibe pas Bcl-x_L.

Concernant la voie orale, nous n'avons observé strictement aucun effet à une dose proche de la dose maximale tolérée, malgré le fait que cette dose soit plus de deux fois supérieure à la dose administrée par voie IV. L'étude de pharmacocinétique et de biodistribution devrait rapidement nous renseigner sur les raisons de cette absence d'effet. L'élimination de la voie orale n'est pas définitive, certains travaux de formulation réalisés par le CERMN étant susceptibles d'améliorer la distribution du Pyridoclax par voie orale. Cependant, bien que cette voie présente un intérêt évident pour une application clinique (notamment vis-à-vis de la compliance et de la facilité d'administration), nous l'avons pour l'instant exclue de nos investigations précliniques.

Les différentes études réalisées par voie IV sont en revanche beaucoup plus encourageantes. Un effet anti-tumoral semble avoir été mis en évidence, dans deux de nos trois modèles, et ce de façon spectaculaire puisque de très importantes zones de nécroses sont observées après 7 jours d'administration du Pyridoclax. Il faut noter qu'après 3 jours de traitement, aucun effet n'est encore observé. Ceci suggère d'une part que l'effet observé après 7 jours dans les deux modèles IGROV1-R10 et A2780 est bien réel, et d'autre part que le Pyridoclax a peut-être besoin de s'accumuler au cours des administrations avant d'atteindre la concentration efficace.

L'activité observée est également relativement paradoxale par rapport aux résultats obtenus *in vitro*, qui montrent une activité modeste du Pyridoclax par rapport à d'autres molécules BH3-mimétiques, et qui montrent une absence d'effet en agent seul dans les IGROV1-R10.

Concernant le fait que la dose efficace du Pyridoclax *in vivo* soit inférieure à celle du Navitoclax ou du S63845 par exemple alors que ces molécules sont plus actives *in vitro*, la liaison du Pyridoclax à l'albumine évoquée plus haut pourrait en partie expliquer ce paradoxe. Des propriétés pharmacocinétiques différentes ou une biodistribution plus avantageuse peuvent en effet tout à fait expliquer ces différences. L'étude envisagée avec notre prestataire devrait répondre également à une partie de la question.

Enfin, il n'est pas exclu que le Pyridoclax puisse agir au sein du stroma tumoral sur une autre cible cellulaire dont la survie dépend de Mcl-1. C'est en particulier le cas des cellules endothéliales des néo-vaisseaux (Watson et al., 2016) qui semblent particulièrement sensibles à l'inhibition de Mcl-1. Une telle activité spécifique des neo-vaisseaux, si elle était avérée, pourrait présenter un intérêt mais reviendrait à une action anti-angiogénique. Nous travaillons sur ces hypothèses vis-à-vis desquelles nous n'avons pour l'instant pas plus d'éléments de réponse. Toutefois, cet effet n'ayant pas été observé sur les tumeurs SKOV-3, à moins de postuler sur le fait que ces tumeurs présentent des néovaisseaux (d'origine murine, comme dans les autres modèles) différents, cette hypothèse est peu vraisemblable.

Enfin, nous n'avons pas observé de diminution du volume tumoral sur 7 jours dans aucun des modèles. Cette observation n'est pas particulièrement étonnante, ce temps étant somme toute assez court. Par ailleurs, nous avons observé que les tumeurs présentant des zones de nécrose ont conservé un volume important, la zone de nécrose n'ayant pas encore involué. De façon intéressante, nous avons observé que dans certaines tumeurs, les cellules tumorales ont presque complètement disparues pour ne plus laisser que quelques traces des motifs initiaux, alors que les cellules normales du stroma sont encore en place. Cette observation est tout à fait compatible avec un effet du Pyridoclax sur les cellules tumorales ayant épargné les cellules normales (dont la survie n'est pas dépendante de Mcl-1), rejoignant alors la notion de cellules cancéreuses « primed to death ».

Cependant, même si un faisceau d'arguments en faveur de la réalité de l'effet antitumoral du Pyridoclax a été accumulé (effet dose, effet sur deux modèles, effet temps etc.), il n'est pas possible d'exclure complètement que la nécrose observée n'ait pas été présente dès le début du traitement (biais de sélection des souris dans les lots). C'est pour cette raison, afin de pouvoir conclure de façon plus robuste, que nous souhaitons engager des études longitudinales (bioluminescence et μ TEP au ^{18}F -DG) dans lesquelles chaque tumeur constitue son propre témoin au cours du temps. De cette façon, la diminution de l'activité luciférase ou de l'activité métabolique au cours du temps dans une tumeur donnée en fonction du traitement administré sera indubitable et nous permettra de conclure de façon plus forte quant à l'activité du Pyridoclax *in vivo* sur des tumeurs solides.

Par ailleurs, d'autres perspectives s'ouvrent vis-à-vis de l'amélioration de l'effet observé. Il s'agit en particulier de l'augmentation de la dose administrée (nous n'avons aucune idée de la tolérance de doses plus élevées par voie IV) et/ou de la prolongation de la durée du traitement.

Les études de toxicité précitées devraient nous aider à définir les conditions optimales de traitement. L'investigation de l'intérêt de la voie IP pour le traitement des tumeurs ovariennes sous-cutanées ou même intra-péritonéales est prévue, cette dernière voie d'administration étant particulièrement intéressante chez la souris pour les études d'administration à long terme.

En cas de succès, il est évident que l'extension de ces stratégies à d'autres modèles de tumeurs solides ou hématologiques sera réalisée, potentiellement en collaboration avec d'autres groupes qui maîtrisent ces modèles, tel qu'initié avec le Dr Gaël Roué (IDIBAPS, Barcelone).

Importance du contexte cellulaire pour l'activité des molécules BH3-mimétiques et... importance de l'identification de facteurs prédictifs de la réponse aux traitements pour une application clinique

L'identification des altérations moléculaires associées à la réponse à un agent donné constitue la base de la médecine personnalisée, en particulier en oncologie. L'utilisation des molécules BH3-mimétiques n'échappe pas à la règle, et l'utilisation clinique du Venclaxta, du Navitoclax, ou même à terme du S63845 est notamment soumise à l'identification de la présence de la cible. Au-delà de cette présence, la bibliographie a très largement démontré l'importance du contexte cellulaire dans la réponse à ces molécules, notamment en termes d'expression des protéines de la famille Bcl-2. Les éléments qui contrôlent l'expression des membres de cette famille étant très complexe, comme présenté en partie dans l'introduction de ce manuscrit, différentes pistes d'investigation se sont mises en place pour définir des signatures de la réponse à ces molécules. Ainsi, des études génomiques (Susnow et al., 2009), de criblages CRISPR-Cas9 de banque sgRNA humaine (Merino et al., 2017), par des tests fonctionnels de type « BH3 profiling » (Certo et al., 2006 ; Dousset et al., 2016) ou encore des études d'expression des protéines de la famille Bcl-2 (Lheureux et al., 2015 et étude MONAVI en cours) ont permis d'identifier des facteurs prédictifs de la réponse aux molécules BH3-mimétiques. Ces études continueront à se développer et à s'affiner au fur et à mesure que des patients seront inclus dans de tels essais.

Toutefois, à l'exclusion du Navitoclax dont la toxicité propre semble avoir découragé toute tentative d'association, les molécules BH3 mimétiques semblent présenter un intérêt évident en dehors de leur utilisation en monothérapie, soit en association avec la chimiothérapie conventionnelle, ou de façon plus rationnelle encore, en association avec certaines thérapies

ciblées. Ainsi, il apparaît pertinent d'associer ces molécules avec des perturbateurs des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la famille Bcl-2, tel que démontré par divers groupes (Liu et al., 2016) et par notre équipe (Jebahi et al., 2014 ; Bonnefond et al., 2015 ; Pétigny-Lechartier et al., 2017).

Dans le cas des tumeurs SKOV-3 par exemple, dans lesquelles nous n'observons qu'une très faible quantité de Bim, son induction par l'intermédiaire d'inhibiteurs des voies de signalisation PI3K/Akt/mTOR ou encore MEK/ERK (plus pertinente ici compte-tenu des résultats des travaux antérieurs du laboratoire) pourrait présenter une action sensibilisatrice au Pyridoclast.

En termes de biomarqueurs prédictifs, la question peut être tout à fait différente en cas d'association par exemple à un inhibiteur des voies de signalisation. Dans ce cas, une prise en compte globale du phénotype concerné devra être réalisée, par exemple par étude du niveau d'activation de la voie concernée ou de ses altérations moléculaires. Cela peut et probablement doit être l'étude des caractéristiques tumorales qui oriente le choix de l'association pharmacologique à utiliser.

Ainsi, les différences de réponse aux molécules BH3 mimétiques d'une tumeur à l'autre, tel qu'observé avec l'ABT-737 lors de nos travaux réalisés *ex vivo* sur 25 tumeurs ovariennes humaines séreuses de haut grade (Lheureux et al., 2015) et *in vivo* avec le Pyridoclast sur les modèles précités, soulignent l'intérêt éventuel des tests fonctionnels *ex vivo* de différentes natures (BH3 profiling, culture de tranches etc.) et de l'utilisation de PDX pour identifier les signatures moléculaires prédictives, pour prédire directement et rapidement la réponse au traitement par les BH3-mimétiques (test fonctionnels), ou enfin définir les associations les plus pertinentes de ces molécules avec une thérapie ciblée.

Dans le domaine de l'utilisation d'inhibiteurs de Mcl-1, presque rien n'est encore en place en comparaison de ce qui a déjà été fait avec les inhibiteurs de Bcl-x_L ou Bcl-2. Mais l'identification, en quelques années seulement, de plusieurs molécules actives et sélectives, et mieux encore de la publication très récente de travaux faisant état d'une possible utilisation de ces molécules *in vivo* (Kotschy et al., 2016 ; Merino et al., 2017) ouvre des perspectives jusque-là inespérées pour le développement de médicaments basés sur l'inhibition pharmacologique directe de Mcl-1. Nos travaux contribuent à cette gigantesque entreprise, dans l'espoir que les patients atteints d'un cancer pourront un jour prochain bénéficier d'une telle stratégie thérapeutique personnalisée.

Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes *in vitro*

Culture cellulaire

Les lignées IGROV1 et SKOV-3 ont été isolées à partir d'adénocarcinomes ovariens humain et la lignée A2780 à partir d'un carcinome ovarien humain. La lignée IGROV1 a été aimablement fournie par le Pr. Jean Benard de l'Institut Gustave Roussy à Villejuif. La lignée SKOV-3 a été achetée auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection) et la lignée A2780 auprès de l'ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures). IGROV1-R10 est dérivée de la lignée IGROV1. Elle a été obtenue au laboratoire après des expositions répétées à des concentrations croissantes de cisplatine, reproduisant l'exposition des cellules aux agents anti-tumoraux *in vivo* (Poulain et al., 1998). La lignée A549, initialement établie à partir d'un explant de tissu alvéolaire carcinomateux, a été achetée auprès de l'ATCC. La lignée de fibroblastes normaux humains AG1521 a été obtenue auprès du Coriell Institute (Camden, New Jersey, USA). Les lignées IGROV1-R10, A2780 et SKOV3 sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Gibco), avec 20 mM d'Hepes, 10 % de sérum de veau foetal (Gibco) décomplémenté, 2 mM de Glutamax (Gibco), 33 mM de bicarbonate de sodium (Gibco). Les lignées A549 et AG1521 sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec 4500mg/L de glucose (Gibco), 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté, 2 mM de Glutamax, 33 mM de bicarbonate de sodium. Les cellules sont cultivées à 37°C en atmosphère humide enrichie en CO₂ (5 %). Le milieu est changé tous les deux jours et les cellules sont repiquées deux fois par semaine (trypsine-EDTA, Gibco). La viabilité cellulaire est estimée par la technique d'exclusion du bleu trypan, la proportion de cellules mortes ne devant pas excéder 5 %. L'absence de mycoplasme est contrôlée par l'utilisation de kits commerciaux tels que MycoAlert® (Lonza).

Molécules

ABT-737: La solution stock d'ABT-737 (Selleck Chemical) a été préparée dans du DMSO stérile à la concentration de 20 mM, aliquotée et conservée à -20°C à l'abri de la lumière. Les cellules ont été exposées de façon continue à la concentration de 5 µM d'ABT-737, préparée dans du milieu complet. La quantité de DMSO représente moins de 1% du volume final.

Oligopyridines: Les solutions stocks des différentes molécules de la famille des oligopyridines (MR31364, MR31379, MR31365, MR31381, MR31366, MR31386, MR313667, MR31382 et le Pyridoclax) synthétisées par le CERMN ont été préparées dans du DMSO stérile à la concentration de 25 mM, aliquotées et conservées à -20°C à l'abri de la lumière. Les cellules ont été exposées de façon continue aux concentrations indiquées, préparées dans du milieu complet. La quantité de DMSO représente moins de 1% du volume final.

MIM1 et analogues de MIM1 : Les solutions stocks de MIM1 et de ses analogues (AHAN1-14 à AHAN13-14, AHAN1-15, AHAN4-15) synthétisés par l'Institut des Sciences Chimiques de Rennes ont été préparées dans du DMSO stérile à la concentration de 25 mM, aliquotées et conservées à -20°C à l'abri de la lumière. Les cellules ont été exposées de façon continue aux concentrations indiquées, préparées dans du milieu complet. La quantité de DMSO représente moins de 1% du volume final.

Evaluation de l'apoptose

Le 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI)

Cette technique permet l'étude de la morphologie nucléaire par la coloration des noyaux. Les cellules sont trypsinées et un aliquot est prélevé après mélange du tapis cellulaire et du surnageant. Les cellules sont ensuite cytocentrifugées sur lames polysilanisées (Cytospin, Shandon) puis fixées avec 30 µl d'une solution contenant de l'éthanol, du chloroforme et de l'acide acétique (6:3:1). Les cellules sont ensuite incubées 15 minutes à l'obscurité dans une solution de DAPI à 1 mg/mL et montées sur lames dans du Mowiol. La morphologie des noyaux est observée avec un microscope à fluorescence. Les cellules vivantes présentent une chromatine homogène, alors que les cellules en apoptose présentent des noyaux condensés et fragmentés caractéristiques de la mort cellulaire par apoptose (Figure 98).

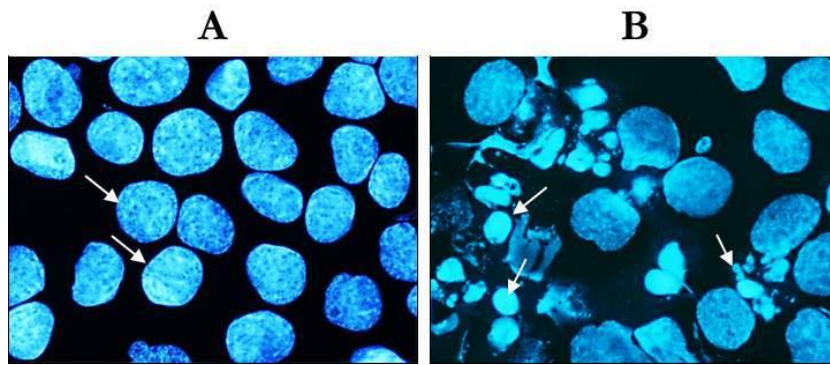


Figure 98. Morphologie nucléaire observée après coloration des noyaux par le DAPI. (A) Noyaux normaux (objectif x40), **(B)** Noyaux condensés et fragmentés caractéristiques de l'apoptose (objectif x40).

La cytométrie en flux

Cette technique permet la détermination du contenu cellulaire en ADN. Les cellules détachées et adhérentes sont mélangées, rincées au PBS 1X puis fixées dans l'éthanol 70%. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée à 4000 rpm pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est repris dans 5 mL de Phosphate Buffer Saline (PBS) 1X et incubé à 37°C pendant 30 minutes. Après une nouvelle centrifugation à 4000 rpm pendant 5 minutes, 50 µl de perméabilisant et 500 µl d'une solution d'iodure de propidium contenant de la RNase (Life Technologies) sont ajoutés selon les instructions du fournisseur. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'échantillon est analysé sur un cytomètre en flux Gallios (Beckman Coulter, USA) par utilisation du logiciel Gallios (Beckman Coulter) (Figure 99).

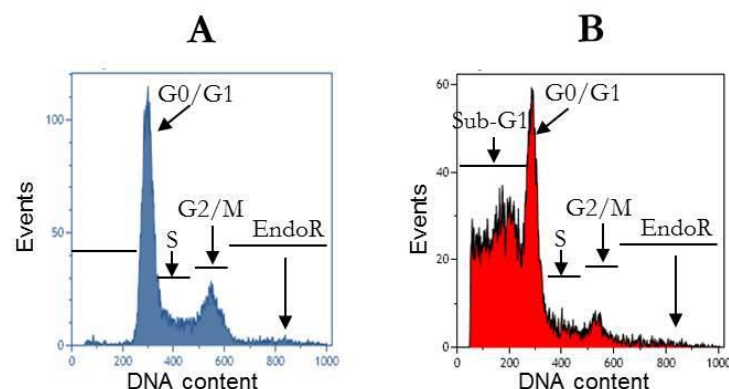


Figure 99. Histogrammes de contenu en ADN obtenus par cytométrie en flux. (A) Exemple d'un profil de cellules témoin et **(B)** exemple d'un profil de cellules traitées.

La mort cellulaire par apoptose provoque une condensation et une fragmentation nucléaire conduisant à une moindre accessibilité de l'iodure de propidium à l'ADN et à un déplacement des pics vers la gauche (Figure 99). L'endo-réplication (Endo R) correspond à un découplage entre réplication et mitose, provoquant un contenu en ADN supérieur à celui du G2 (déplacement des pics vers la droite).

Recherche du clivage des caspases 3 et 9 et de la PARP par western-blot

Les western-blot sont réalisés suivant la méthode décrite ci-après. Les anticorps primaires utilisés pour apprécier l'apoptose reconnaissent la PARP (totale et clivée), la caspase 3 (totale et clivée) et la caspase 9 (totale et clivée).

Etude de l'expression des protéines par western-blot

Préparation du lysat protéique

Pour obtenir les lysats protéiques, le tapis est rincé 2 fois avec du PBS 1X à 4°C, qui est ensuite soigneusement éliminé par aspiration, puis les cellules sont lysées à 4°C à l'aide d'un tampon de lyse. Si le lysat est préparé dans l'optique de réaliser un Western Blot classique, le tampon de lyse utilisé est un tampon de lyse dénaturant (RIPA : PBS, NP40 1 %, SDS 0,1 %, PMSF 10 µg/ml, EDTA 5 mM, Na₃VO₄ 1 mM, NaPPi 5 mM, NaF 10 mM, aprotinine 0,5 µl/ml). Le lysat protéique est récupéré avec un grattoir et dissocié à l'aide du vortex.

Pour les lysats protéiques préparés à partir de cellules trypsinées, le tampon de lyse (RIPA) est ajouté au culot cellulaire obtenu après une centrifugation de 2 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C.

Après une incubation de 30 minutes à 4°C, la clarification (consistant en une centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C) est effectuée. Le surnageant est récupéré, aliquoté et conservé à -80°C. 10 µl sont réservés pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford.

Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Cette méthode est basée sur la formation de complexes entre les protéines et le Bleu de Coomassie G-250, dont le pic d'absorption à 595 nm est proportionnel à la concentration en protéines totales.

Pour ce dosage, une solution de Bradford (Bio-Rad, Allemagne) à 1X a été préparée, à partir d'une solution mère à 5X, pour tous les échantillons ainsi que pour la gamme étalon préparée à partir d'une solution mère à 10µg/µL. La gamme étalon ainsi que les échantillons préparés ont été déposés en triplicats (200µL) dans une plaque 96 puits. La lecture est effectuée à 595 nm sur un lecteur FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech).

Electrophorèse et transfert sur membrane de PVDF

Les extraits protéiques (30µg) mélangés avec du tampon Laemmli 4x, du dithiothreitol 1M (DTT) (10%) (Sigma) et de l'eau ultra pure sont portés à ébullition pendant 10 minutes avant d'être déposés (25 µl) sur le gel en gradient de polyacrylamide 4-15 % Mini-PROTEAN-TGX™ (BioRad, Hercules, USA). Après migration dans le tampon TGS1x (Bio-Rad), les protéines sont transférées sur une membrane PVDF avec le système de transfert Turbo® (Bio-Rad).

Détection par les anticorps

Après le transfert, les membranes sont immédiatement bloquées dans du Tris Buffer Saline (TBS)-Tween-lait (T-TBS-lait) 5% pendant 1 heure à température ambiante. Les membranes sont ensuite incubées pendant 1 heure à température ambiante ou une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du T-TBS-lait 5% (Tableau 7). Après 3 rinçages dans du T-TBS, les membranes sont incubées pendant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire spécifique de l'espèce utilisée couplé à la peroxydase et dilué dans du T-TBS-lait 5 %. L'anticorps secondaires spécifiques de la souris (Amersham) est dilué au 1/2000^{ème} et l'anticorps secondaires spécifiques du lapin (Cell Signaling) est dilué au 1/5000^{ème}. Après un rinçage d'au moins une heure dans du T-TBS, les membranes sont rincées une fois dans du TBS 1X pour éliminer le tween qui entraîne l'apparition d'un bruit de fond. Les complexes immuns sont révélés par utilisation du kit ECL (GE Healthcare, Orsay, France) et détection de la chimiluminescence (réactifs Bio-Rad). La détection de la chimiluminescence est réalisée à l'aide d'un imageur (ImageQuant® LAS 4000). L'ensemble des anticorps utilisés sont décrits dans le Tableau 7 de synthèse.

Tableau 7. Description des différents anticorps utilisés en western-blot

Antigène	Poids moléculaire	Fournisseur de l'anticorps	Référence	Source	Clone	Dilution	Tampon de dilution
Actine	42 kDa	Merck	MAB1501	Souris	C4	1/1000ème	Lait 5 %
Bak	25 kDa	Cell Signaling	3814S	Lapin	-	1/500ème	Lait 5 %
Bax	20 kDa	Cell Signaling	2774S	Lapin	-	1/500ème	Lait 5 %
Bcl-xL	30 kDa	Cell Signaling	2764S	Lapin	54H6	1/500ème	Lait 5 %
Bim	23, 15 et 12 kDa	Cell Signaling	2819S	Lapin	-	1/500ème	Lait 5 %
Caspase-3 et caspase-3 clivée	35, 19 et 17 kDa	Cell Signaling	9662S	Lapin	-	1/1000ème	Lait 5 %
Caspase-9 et caspase-9 clivée	47, 37 et 35 kDa	Cell Signaling	9502S	Lapin	-	1/1000ème	Lait 5 %
Mcl-1	40 kDa	Cell Signaling	5453S	Lapin	D35A5	1/1000ème	Lait 5 %
Noxa	6 kDa	Merck	OP180	Souris	114C307	1/250ème	Lait 5 %
PARP et PARP clivée	116 et 89 kDa	Cell Signaling	9542S	Lapin	-	1/1000ème	Lait 5 %
Puma	23 kDa	Cell Signaling	12450S	Lapin	D30C10	1/250ème	Lait 5 %
α -Tubuline	50 kDa	Sigma-Aldrich	T6199	Souris	DM1A	1/4000ème	Lait 5 %

Immunoprécipitation

Les lysats protéiques ont été préparés dans du Lysis buffer [15 mM, HEPES, 50 mM KCl, 10 mM, NaCl 1 mM, MgCl₂, 2,5% glycerol, 0,5% laurylmaltoside, 5 μ M GDP, 1 μ M microcystine, 1 mM orthovanadate de sodium et Complete Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich)]. Après 30 minutes d'incubation des lysats protéiques avec des billes de sépharose à 50% en suspension [protein G-Sepharose (VWR)], les protéines ont été immunoprécipitées une nuit à 4°C avec l'anticorps anti-Mcl-1 (#559027, BD Biosciences) préalablement couplés aux billes de sépharose. Les protéines immunoprécipitées ont été récupérées par centrifugation, rincées trois fois avec du Lysis buffer et incubées 45 minutes à 37°C dans du Laemmli 2X (Bio-Rad). Ces protéines immunoprécipitées (récupérées après centrifugation) ainsi que les protéines des lysats totaux ont ensuite été séparées par électrophorèse et leur expression a été analysée de la même manière que décrit plus haut.

ARN interférence

Les siRNA anti-Bcl-x_L, anti-Bim et anti-Puma ont été synthétisés chimiquement par la société Eurogentec, le siRNA contrôle par Dharmacon GE Healthcare Life Sciences et reçus sous forme lyophilisée. Les séquences sont décrites ci-dessous :

- Contrôle : ON-TARGETplus Non-targeting siRNA #1 (siControl)
- Bcl-x_L : 5'-auuggugagucggaucgcatt-3' (siXL1) : cible sélectivement l'ARNm Bcl-x_L et non l'ARNm Bcl-x_s.
- PUMA : 5'-uauacaguaucuuacaggctt-3' (siPuma)
- BIM : 5'-uaacagucguaagauaacctt-3' (siBim)
- NOXA : 5'-gcuauuuuaccaucugguatt-3' (siNoxa)
- MCL1 : 5'-gugccuuuguggcuaaacatt-3' (siMcl1)

Les cellules sont cultivées dans un flasque de 25 cm² dans un milieu de croissance complet 24h avant la transfection. Les cellules ayant atteint 30 à 50% de confluence sont transfectées avec un mélange contenant l'INTERFERin™, l'Opti-MEM et les duplexes de siRNA en accord avec le protocole suggéré par le fabricant (Polyplus Transfection, Strasbourg, France). La concentration finale des siRNA est de 20 nM. Le complexe siRNA/ INTERFERin™ est ajouté dans le flacon de culture contenant les cellules et incubées en continu à 37°C.

Analyse de la cytotoxicité en temps réel (xCELLigence)

Le système xCELLigence RTCA MP (Real-Time Cell Analyser Multi-plate) (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne) permet de mesurer la cytotoxicité de composés en contrôlant en temps réel les événements cellulaires par mesure de l'impédance électrique à travers des micro-électrodes interdigitées intégrées sur le fond d'une boîte de culture 96 puits nommée E-Plate. La mesure d'impédance fournit des informations quantitatives sur l'état biologique des cellules, y compris le nombre de cellules, la viabilité et la morphologie. La variation de l'impédance électrique mesurée permet de calculer l'index Cellulaire (CI). Par conséquent, cet indice reflète les changements dans la viabilité des cellules telles que décrites par Ke et al (Ke et al. 2011). Le bruit de fond de la plaque est obtenu grâce à 50 µl de milieu, puis 50 µl de

suspension cellulaire sont ajoutés (3×10^3 cellules/puits pour les SKOV3, 7×10^3 cellules/puits pour les IGROV1-R10 et 10×10^3 cellules/puits pour les A2780). Après 30 min à température ambiante, la E-plate est placée sur le RTCA-MP à l'intérieur d'un incubateur à 37°C en atmosphère humide enrichie en CO₂ (5%) pendant 24 heures avant le traitement et l'impédance est mesurée en continu jusqu'à la fin du traitement. L'augmentation du nombre et de la taille des cellules attachées aux électrodes conduit à une augmentation de l'impédance. Par conséquent, l'indice cellulaire est en corrélation avec le nombre de cellules attachées au fond du puits. Les réplicats sont analysés grâce au logiciel RTCA.

Analyse de l'apoptose en temps réel (IncuCyte)

La mort par apoptose a été suivie par le système IncuCyte ZOOM (Essen Instruments, Ann Arbor, Michigan, USA). Ce système d'imagerie et d'analyse permet de quantifier le comportement des cellules en temps réel, sans perturbation, directement depuis l'incubateur. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits 24 heures avant d'être traitées avec les oligopyridines en tant qu'agent seul ou en combinaison avec l'ABT-737 (5μM). Le réactif Caspase 3/7 a été ajouté à une concentration finale de 5μM (Essen Bioscience No. 4440, Ann Arbor, MI, USA). Des images de la fluorescence ont été prises toutes les heures pendant 48h avec un objectif x10. Les cellules ont été conservées dans l'incubateur à 37°C dans une atmosphère humide enrichie en CO₂ (5 %) durant toute l'analyse. Les résultats ont été analysés avec le logiciel d'analyse de l'IncuCyte afin de détecter et quantifier les cellules vertes (apoptotiques) par image. Chaque condition a été réalisée en triplicate et la moyenne $\pm$ SD pour chaque temps ont été représentés dans GraphPad Prism version 6.07 pour Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

BRET

Pour le test de saturation du donneur, les cellules de la lignée Hela ont étéensemencées dans des plaques 12 puits et transfectées avec 200 ng/puits de plasmide donneur pRluc-BimL et des quantités croissantes de plasmide accepteur peYFP-Mcl-1 (ou avec pCMV-Mcl-1 comme contrôle). Vingt-quatre heures après transfection, les cellules ont été trypsinées et réensemencées dans des plaques 96 puits blanches et incubées pendant 24 heures supplémentaires avant les mesures de fluorescence. Un seul rapport donneur/accepteur

(200/800) a été utilisé pour le test d'exposition aux molécules. Après réensemencement, les cellules ont été exposées aux MR31366, MR31367 ou au Pyridoclast pendant 16 heures. La lecture a été effectuée à 485 nm et 530 nm sur un lecteur Mithras LB 940 (Berthold) après l'ajout du substrat de la luciférase, la coelenterazine H (Uptima), à une concentration de 5 μ M. Les rapports de BRET ont été ensuite calculés.

Résonance des plasmons de surface

Toutes les études de liaison basées sur la technique de résonance des plasmons de surface ont été réalisées sur un appareil BIAcore T200 (GE Healthcare). L'immobilisation de la protéine de fusion purifiée His-Mcl-1 a été réalisée sur la surface d'une "chip senseur" recouverte d'acide nitrilotriacétique dans de l'HBS-P + du tampon contenant 10mM d'hépès pH 7.4, 150mM de NaCl, et 0.05 % de surfactant P20 (GE Healthcare). L'immobilisation de Mcl-1 sur la chip senseur a été stabilisée par un couplage covalent du ligand sur la surface de la chip en utilisant le couplage amine (comme décrit par GE Healthcare dans le guide du laboratoire 29-0057-17 AB). La chip senseur est saturée avec 0.5 mM de NiCl₂ puis activée par une injection de 7 minutes de NHS-EDC suivie par l'immobilisation du ligand. Toutes les étapes d'immobilisation ont été réalisées à un débit de 10 μ L/min pour une concentration finale de Mcl-1 de 4 μ g/mL. La quantité totale de Mcl-1 immobilisé était de 1000, 3500 et 5000 RU en fonction des expériences. La surface de la chip senseur a été désactivée par une injection de 7 minutes d'une solution d'éthanolamine 1M.

La protéine de fusion purifiée His-Mcl-1 a été achetée à Creative BioMart (45-16 Ramsey Road Shirley, NY 11967, USA). Une analyse d'une cinétique de type Low Mass Weight-single-cycle kinetics (LMW-SCK) pour déterminer les constantes d'association, de dissociation et d'affinité (k_a , k_d , et K_d respectivement) a été réalisée en injectant différentes concentrations de molécules. Les paramètres de liaison ont été obtenus en ajustant la superposition des sensorgram avec le modèle de liaison de Langmuir 1:1 du logiciel BIAevaluation version 1.0.

Matériel et Méthodes *in vivo*

II.1. Le modèle animal

Les femelles *Nude* immunodéprimées Foxn-1 sont le modèle utilisé dans cette étude. Elles sont obtenues auprès du laboratoire Harlan (désormais Envigo) à l'âge de 4 semaines. Après réception au laboratoire, les animaux sont maintenus dans un environnement sans agents pathogènes à une température stable $23 \pm 1^\circ\text{C}$ et un cycle de 12h lumière/obscurité. Les souris ont accès à la nourriture et à l'eau stérile tout au long de leur présence à l'animalerie.

Toute la procédure liée à l'expérimentation animale a été réalisée en accord avec les recommandations de la Communauté Européenne (directive 86/609/EEC) et du gouvernement Français (décret 87-848) concernant l'utilisation des animaux en recherche. Les expérimentations réalisées pour l'évaluation de l'effet du sel de Pyridoclax sur les modèles de tumeurs ovariennes ont reçu une autorisation par le Comité d'Ethique Normandie en Matière d'Expérimentation Animal (CENOMEXA).

II.2. Les produits utilisés pour le traitement

Les différents traitements utilisés tout au long de cette étude sont le sel de Pyridoclax (MR33709) et l'ABT-263 ou (Navitoclax®). Le sel de Pyridoclax est obtenu auprès du CERMN. Il est produit à partir du Pyridoclax (MR29072) et préparé extemporanément dans du sérum physiologique NaCl 0.9%. Il est injecté dans la tumeur ou administré directement chez la souris par voie orale ou intraveineuse. L'ABT-263 est obtenu auprès d'Euromedex et est préparé dans une mixture composée de 30% de polyéthylène Glycol 400 (PEG, Sigma Alderich), 60% de Phosal (Lipoid) et 10% d'éthanol. L'ABT-263 est repris dans cette mixture et dissous par un cycle de sonication de 15min. Il est par la suite conservé à 4°C et à l'abri de la lumière pendant tout le traitement.

II.3. Les modèles de xénogreffes de lignées tumorales ovariennes

Les souris âgées de 5 semaines sont inoculées par voie sous-cutanée avec les différentes lignées cancéreuses ovariennes IGROV1-R10, SKOV-3 et A2780. Ces cellules sont ensemencées selon le protocole de culture cellulaire suivant : lorsque les cellules atteignent une confluence de 75%, elles sont décollées par trypsination, centrifugées à 2000 rpm et reprises dans du sérum physiologique supplémenté avec 1% d'antibiotique (pénicilline/streptomycine). Un volume de 150µl de la suspension cellulaire contenant une densité cellulaire variable en fonction du modèle tumoral (Tableau) est ensuite injecté en sous-cutané unilatéralement dans le flanc droit de chaque souris maintenue endormie sous l'effet d'un agent gazeux anesthésiant (isoflurane 2.5%). Les tumeurs se développent plus ou moins rapidement selon le type cellulaire injecté (Tableau 8). Elles sont quotidiennement surveillées et le traitement débute lorsque leur diamètre moyen atteint la taille de 5mm.

Tableau 8. Caractéristique des différents modèles de xénogreffes de lignées tumorales ovariennes

Modèles tumoraux	Densité cellulaire	Temps de développement	Type de tumeur	Dépendance à Bcl-x _L et Mcl-1
IGROV1-R10	5 . 10 ⁶ cellules	15 - 21 jours	Adénocarcinome ovarien séreux	Bcl-x _L et Mcl-1
SKOV-3	10 . 10 ⁶ cellules	21 – 30 jours	Adénocarcinome ovarien séreux	Bcl-x _L et Mcl-1
A2780	4 . 10 ⁶ cellules	15 jours	Adénocarcinome ovarien séreux	Mcl-1

II.4. Protocoles de traitement des animaux

Dans cette étude, les souris sont traitées avec le sel de Pyridoclax administré par voies orale, intra-tumorale (IT) ou intraveineuse (IV) en agent seul ou en association avec l'ABT-263.

Le traitement par voie orale nécessite l'utilisation d'une canule de gavage 16G fixée sur une seringue de 1 ml. L'utilisation de cette sonde permet d'introduire la totalité du traitement au niveau de l'estomac de l'animal. Pour l'étude de cette voie, le sel de Pyridoclax et l'ABT-263 sont préparés à la dose de 50 et 100mg/kg dans leurs solutions respectives. Un volume de 100µl de ces solutions médicamenteuses est ensuite administré aux souris par voie orale. Les souris porteuses de tumeurs IGROV1-R10 ou SKOV-3 sont traitées par le sel de Pyridoclax seul pendant 3 jours consécutifs ou en association avec l'ABT-263. Ce dernier est administré

aussi par voie orale 2h après le sel de Pyridoclax avec une réitération de 3 ou 7 jours consécutifs. Les souris du groupe témoin ne reçoivent pas de traitement tandis que les souris du groupe témoin excipient reçoivent le sérum physiologique et la mixture de l'ABT à 2h d'intervalle. Les souris porteuses du modèle tumoral A2780 sont traitées uniquement avec 50mg/kg de sel de Pyridoclax pendant 3 ou 7 jours consécutifs. Dans cette expérience, les souris du groupe témoin reçoivent par gavage la solution physiologique. L'analyse est effectuée 24h après le dernier traitement.

Le traitement par voie IT consiste en l'administration du sel de Pyridoclax seul directement dans la tumeur. Pour ce protocole, le sel de Pyridoclax est préparé aux doses de 1, 4 et 10 mg/kg dans un volume de 50µl pour chaque souris. Les tumeurs témoins sont injectées avec un volume équivalent de sérum physiologique 0.9%. Les solutions sont ensuite injectées très lentement dans la tumeur afin d'éviter de créer une pression qui pourrait perturber l'architecture de la tumeur et l'intégrité des cellules.

Le traitement par voie IV permet d'introduire le sel de Pyridoclax directement dans la circulation sanguine via la veine caudale de la souris. Dans ce protocole, le sel de Pyridoclax est préparé dans une solution injectable (sérum physiologique 0.9%) aux doses de 1, 10, 15 et 20mg/kg. Un volume de 100µl de ces solutions médicamenteuses est ensuite administré dans la veine caudale des souris avec l'aide de seringues munies d'aiguilles de 30G. Les souris porteuses de tumeurs A2780 sont traitées avec différentes doses (1 et 10mg/kg) de sel de Pyridoclax en agent seul pendant 3 ou 7 jours consécutifs. Les souris porteuses des tumeurs IGROV1-R10 sont traitées aux doses de 10 ou 20mg/kg seul ou en association avec l'ABT-263 pendant 7 jours consécutifs. Ce dernier est préparé à la dose de 100mg/kg et administré par voie orale 6h après le premier traitement au sel de Pyridoclax pendant les 3 derniers jours. Enfin, les souris porteuses des tumeurs SKOV-3 sont traitées avec seule dose du sel de Pyridoclax par voie IV (20mg/kg) en agent seul ou en combinaison avec l'ABT-263 en suivant la même procédure que le protocole précédent.

Le poids des souris et la taille des tumeurs sont mesurés deux fois (J0 et J3) au cours des protocoles à court terme (3 jours) et trois fois (J0, J3 et J7) au cours des protocoles à long terme (7 jours). La taille de la tumeur est mesurée en utilisant un pied à coulisse. Le volume tumoral de chaque souris est ensuite calculé par la formule suivante : $\text{Longueur} \times \text{Largeur} \times \pi/6$ ($L \times l^2 \times \pi/6$).

II.5. Prélèvement sanguin et analyses biochimiques

Vingt-quatre heures après le dernier traitement, un prélèvement sanguin est effectué sur les souris avant leur euthanasie. Ce prélèvement est réalisé en intracardiaque à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille 25G. Les souris sont maintenues profondément endormies sous l'action d'un gaz anesthésiant (un mélange d'air/d'isoflurane 3%) tout au long de la procédure de prélèvement. Un volume compris entre 250 à 500µl de sang est prélevé et ajouté dans des tubes secs laissés à température ambiante pendant 30min. Les tubes sont ensuite centrifugés à 13 000 rpm pendant 10min afin d'isoler le sérum qui sera analysé pour différents paramètres biochimiques tels que les niveaux d'Alanine Aminotransférase (ALT), d'urée et de créatinine. Cette analyse est faite par le laboratoire d'analyses médicales au sein du Centre Hospitalier Universitaire de Caen, par l'équipe du Dr Stéphane Allouche.

II.6. Autopsie et conservation des échantillons

Une fois le sang prélevé, les souris sont euthanasiées par inhalation de CO₂ après anesthésie profonde par 5% d'isoflurane puis autopsiées.

L'autopsie de ces souris consiste en l'observation de l'état global des organes à l'intérieur de la cavité abdominale avant prélèvement. Chaque observation est notée, notamment la présence d'hémorragies, de lésions ou de changement dans la taille des organes, de leur couleur ou de leur aspect. Les organes et la tumeur de chaque souris sont ensuite rapidement prélevés, disposés dans des cassettes d'inclusion préalablement annotées et plongés directement dans un bain fixateur de paraformaldéhyde 3% (PFA). Les tissus sont fixés entre 3 et 24h en fonction de la grosseur et de la densité du prélèvement. Cette étape de fixation est cruciale car elle permet d'immobiliser les structures cellulaires et tissulaires et garder une image fidèle de l'état vivant. Le paraformaldéhyde est un fixateur doux qui permet la pénétration rapide et homogène des tissus sans causer leur rétraction ou la création d'artéfacts. Une partie des tumeurs est congelée instantanément dans l'azote liquide puis conservée à -150°C pour d'éventuelles analyses moléculaires ultérieures.

Les tissus fixés dans le PFA sont par la suite déshydratés et imprégnés de paraffine afin de substituer l'eau par de la paraffine, permettant ainsi une longue conservation des échantillons. Les cassettes contenant les échantillons sont soumises à une déshydratation par des bains d'alcool à degrés croissants puis mises en présence de xylène et de paraffine. Ce processus

d'inclusion est réalisé par l'automate ASP300S Leica du service d'Anatomie-Pathologique du CLCC F. Baclesse. Les tissus imprégnés sont alors placés dans des supports d'inclusion et recouverts de paraffine, permettant la formation des blocs. Ces derniers seront ensuite coupés au microtome pour la préparation des lames histologiques.

II.7. Analyses de l'histologie tumorale

En amont des analyses immunohistochimiques, les échantillons inclus dans les blocs en paraffine sont préparés en coupes fines et régulières d'une épaisseur de 4µm en utilisant le microtome rotatif Leica. Ces coupes sont par la suite disposées sur une lame recouverte d'eau ultra-pure puis placées sur une plaque chauffante à 50°C. Cette étape permet d'étaler la coupe et d'éviter les plis au niveau du motif. L'eau est ensuite enlevée et la lame est égouttée et séchée pendant une nuit dans une étuve à 37°C avant d'être utilisées pour les études d'histologie et d'immunomarquage.

II.7.1. Analyse de l'aspect histologique par coloration HES

La coloration Hématoxyline Erytrosine Safran (HES) est réalisée sur une coupe en paraffine en parallèle de chaque immunomarquage. Elle permet d'apprécier les différentes structures tissulaires et cellulaires. Cette coloration trichromique met en évidence les composantes nucléaires, colorées en bleu par l'hématoxyline. La composante cytoplasmique, les fibres tissulaires et les produits extracellulaires sont révélés en rouge par l'érythrosine. Enfin, le tissu conjonctif et les fibres de collagènes sont colorés en jaune par le safran. Ces colorants sont hydrophiles et nécessitent le déparaffinage des lames avant coloration. Cette étape est réalisée par deux bains de xylène, suivis d'une réhydratation par des bains d'éthanol de concentrations décroissantes, puis d'un rinçage à l'eau courante. Ce processus est effectué par l'automate Autostainer XL Leica du service d'Anatomie-Pathologique du CLCC F. Baclesse.

II.7.2. Immunohistochimie

L'immunohistochimie est une technique qui permet d'identifier l'expression d'une protéine donnée dans un tissu ou cellules donnés. Son application dans la cancérologie est très vaste ; elle permet de déterminer l'origine d'un cancer primitif ou de le confirmer, identifier des cellules cancéreuse indifférenciées et de prédire la réponse aux traitements, ou pronostiquer l'avancée du cancer.

Une fois les lames histologiques préparées, elles sont placées sur le carrousel de l'automate Ventana Discovery XT qui effectue les différentes étapes d'immunomarquage. Les motifs portés sur ces lames sont recouverts par une huile utilisée pour empêcher l'évaporation des différents réactifs au cours du processus d'immunomarquage. Les coupes de paraffine sont d'abord soumises à un déparaffinage par le tampon EZrep. Les sites antigéniques sont ensuite démasqués pour rendre les protéines accessibles à l'action des anticorps. Le démasquage est effectué par la chaleur et la distribution d'un tampon de démasquage CC1 (équivalent de l'EDTA). Par la suite, l'activité peroxydase endogène est bloquée par un traitement à l'eau oxygénée. Cette étape est primordiale pour éviter un marquage aspécifique des anticorps primaires. Les lames sont ensuite incubées pendant 40min avec les différents anticorps primaires dirigés contre Bcl-x_L, Mcl-1, Bim, Puma, Noxa, P-ERK, caspase 3 clivée et Ki-67 (Tableau 9). Après rinçage au Buffer Reaction (équivalent du T-TBS), les lames sont incubées avec l'anticorps secondaire Omnimap Rabbit pendant 16min puis à nouveau rincées au Reaction Buffer. La révélation est visualisée par l'utilisation de la DAB comme chromogène qui brunit sous l'action de l'H₂O₂ et du sulfate de cuivre (ou reactif copper). Une contre coloration est ensuite apportée par l'hématoxyline II, permettant ainsi la visualisation des noyaux en bleu. L'incubation avec le Bluing Reagent pendant 4 minutes intensifie la coloration bleue des noyaux apportée par l'hématoxyline puis les lames sont rincées abondamment à l'eau savonneuse.

Tableau 9. Récapitulatif des différents anticorps utilisés dans l'étude immuno-histochimique

Anticorps	Références	Fournisseur	Mono / poly-clonal	Espèces	Dilution	Tampon de démasquage
Bcl-X	556361	BD Pharmingen	Poly-clonal	Lapin	1/400	CC1 (équivalent EDTA)
Mcl-1 (Y37)	Ab32087	Abcam	Mono-clonal	Lapin	1/1000	CC1 (équivalent EDTA)
Bim (D30C10)	2933	Cell Signaling	Mono-clonal	Lapin	1/150	CC1 (équivalent EDTA)
Puma	12450	Cell Signaling	Mono-clonal	Lapin	1/50	CC1 (équivalent EDTA)
Noxa	3665-100	Biovision	Poly-clonal	Lapin	1/25	CC1 (équivalent EDTA)
P-p44/42 MAPK ERK ½ (Thr202/Thr204)	4370	Cell Signaling	Mono-clonal	Lapin	1/4000	CC1 (équivalent EDTA)
Caspase 3 clivée (Asp175)	9661	Cell Signaling	Poly-clonal	Lapin	1/7500	CC1 (équivalent EDTA)
Ki-67	NCL Ki-67p	Novocastra	Poly-clonal	Lapin	1/500	CC1 (équivalent EDTA)

II.7.3. Quantification des zones de nécrose

Une fois les colorations HES réalisées, les images correspondant aux motifs tumoraux sont acquises à l'aide du scanner Scanscope CS (Leica Biosystems, Nussloch, Germany). Ce scanner à haute résolution est équipé d'un objectif x20 et fournit des images de lames virtuelles (une image pour l'ensemble de la section) avec une résolution de 0,5 µm par pixel. Après acquisition, les régions correspondantes à la tumeur et aux zones de nécrose ont été délimitées tout en éliminant les artéfacts (plis, bords du tissu...) à l'aide du logiciel Image Scope (Leica Biosystems, Nussloch, Germany). Cette opération a été validée par Dr Cécile Blanc-Fournier (service d'Anatomie-Pathologique du CLCC F. Baclesse). Le traitement d'images a alors été appliqué dans les régions d'intérêt (ROIs) précédemment délimitées. La surface globale de la tumeur et des zones de nécrose ont été calculées à l'aide d'un programme écrit avec le langage Python (Dr. Nicolas Elie, Plateau Histoimagerie Quantitative, CMABIO, Université de Caen Normandie). Le pourcentage des zones de nécrose inclus dans la zone tumorale a été calculé à partir de ces surfaces.

II.7.4 Quantification du marquage Ki-67

A l'instar de ce qui a été réalisé avec la quantification de la nécrose, les images de chacun des immunomarquages de Ki-67 ont été scannées et les zones tumorales sont délimitées. L'ensemble du programme d'analyse d'images a été réalisé avec le langage de programmation Python et les bibliothèques Openslideⁱ, Geospatial Data Abstraction Library (Gdal) and mahotas (Dr. Nicolas Elie, Plateau CMABio³, Université de Caen Normandie). Les ROIs ont été divisés en fragments hexagonaux de 80µM de rayon, qui permet de s'assurer en moyenne d'avoir un minimum de 20 cellules par hexagones (Plancoulain et al, 2015) (Figure 100).

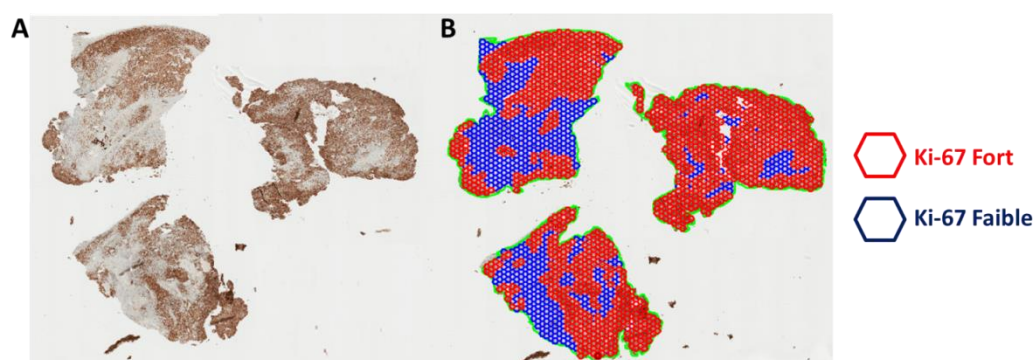


Figure 100. Quantification de l'immunomarquage Ki-67. (A) Immunomarquage de Ki-67 sur des xénogreffes établies à partir de l'injection de la lignée tumorale ovarienne A2780. (B) Représentation visuelle de l'analyse quantitative de l'expression de Ki-67 réalisées sur ces mêmes images.

Pour la détection du tissu présent dans la ROI, l'histogramme de distributions des valeurs de pixels pour la composante bleu de l'image est extrait de l'image. Un seuil automatique détermine la valeur permettant d'extraire la surface du tissu par rapport au fond de lame. Pour la détection de la coloration brune (coloration de la DAB), l'image est décomposée selon la méthode de Ruifrok et Johnston (Ruifrok et Johnston, 2001). Un seuil automatique détermine la valeur permettant d'extraire la plage de valeurs représentant le brun. Pour chaque hexagone dans les ROIs la proportion de cellules immunomarquées est calculée comme suite : proportion de cellules marquées = surface brune/surface tissu. Les proportions calculées dans les hexagones sur l'ensemble des images sont séparées en deux classes en utilisant la médiane. Puis, pour chaque image, le nombre d'hexagones est comptabilisé par classe.

II.8. Analyse statistique

Tous les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SD. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant les tests non paramétriques de Mann-Whitney pour la comparaison de deux groupes indépendants, et de Kruskal-Wallis pour la comparaison de plus de deux groupes indépendants, suivi par le post-test de Dunns pour la comparaison des différents groupes un à un avec le groupe témoin. Les valeurs de $P < 0,05$ sont considérées comme significatives. Les tests statistiques ont été réalisés en utilisant le logiciel GraphPad Prism version 6.07 pour Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com)

Références

- Abed, M.N., Abdullah, M.I., and Richardson, A. (2016). Antagonism of Bcl-XL is necessary for synergy between carboplatin and BH3 mimetics in ovarian cancer cells. *J. Ovarian Res.* 9.
- Adams, J.M. (2012). Therapeutic potential of a peptide targeting BCL-2 cell guardians in cancer. *J. Clin. Invest.* 122, 1965–1967.
- Aghajanian, C., Blank, S.V., Goff, B.A., Judson, P.L., Teneriello, M.G., Husain, A., Sovak, M.A., Yi, J., and Nycum, L.R. (2012). OCEANS: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 2039–2045.
- Akgul, C., Turner, P.C., White, M.R., and Edwards, S.W. (2000). Functional analysis of the human MCL-1 gene. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 57, 684–691.
- Alavian, K.N., Li, H., Collis, L., Bonanni, L., Zeng, L., Sacchetti, S., Lazrove, E., Nabili, P., Flaherty, B., Graham, M., et al. (2011). Bcl-xL regulates metabolic efficiency of neurons through interaction with the mitochondrial F1FO ATP synthase. *Nat. Cell Biol.* 13, 1224–1233.
- Albershardt, T.C., Salerni, B.L., Soderquist, R.S., Bates, D.J.P., Pletnev, A.A., Kisselev, A.F., and Eastman, A. (2011). Multiple BH3 mimetics antagonize antiapoptotic MCL1 protein by inducing the endoplasmic reticulum stress response and up-regulating BH3-only protein NOXA. *J. Biol. Chem.* 286, 24882–24895.
- Al-Katib, A.M., Sun, Y., Goustin, A.S., Azmi, A.S., Chen, B., Aboukameel, A., and Mohammad, R.M. (2009). SMI of Bcl-2 TW-37 is active across a spectrum of B-cell tumors irrespective of their proliferative and differentiation status. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* 2, 8.
- Altomare, D.A., Zhang, L., Deng, J., Di Cristofano, A., Klein-Szanto, A.J., Kumar, R., and Testa, J.R. (2010). GSK690693 delays tumor onset and progression in genetically defined mouse models expressing activated Akt. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16, 486–496.
- Alvarez, R.D., Karlan, B.Y., and Strauss, J.F. (2016). “Ovarian cancers: Evolving paradigms in research and care”: Report from the Institute of Medicine. *Gynecol. Oncol.* 141, 413–415.
- Amundson, R. (2000). Embryology and evolution 1920-1960: worlds apart? *Hist. Philos. Life Sci.* 22, 335–352.
- Andersen, M.H., Becker, J.C., and Thor Straten, P. (2005). The antiapoptotic member of the Bcl-2 family Mcl-1 is a CTL target in cancer patients. *Leukemia* 19, 484–485.
- Ansaloni, L., Coccolini, F., Morosi, L., Ballerini, A., Ceresoli, M., Grosso, G., Bertoli, P., Busci, L.M., Lotti, M., Cambria, F., et al. (2015). Pharmacokinetics of concomitant cisplatin and paclitaxel administered by hyperthermic intraperitoneal chemotherapy to patients with peritoneal carcinomatosis from epithelial ovarian cancer. *Br. J. Cancer* 112, 306–312.
- Antignani, A., and Youle, R.J. (2006). How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 685–689.
- Aouacheria, A. (2014). The BCL-2 database, Act 2: moving beyond dualism to diversity and pleiotropy. *Cell Death Dis.* 5, e981.
- Aouacheria, A., Brunet, F., and Gouy, M. (2005). Phylogenomics of life-or-death switches in multicellular animals: Bcl-2, BH3-Only, and BNip families of apoptotic regulators. *Mol. Biol. Evol.* 22, 2395–2416.

- Aouacheria, A., Cibiel, A., Guillemin, Y., Gillet, G., and Lalle, P. (2007). Modulating mitochondria-mediated apoptotic cell death through targeting of Bcl-2 family proteins. *Recent Pat. DNA Gene Seq.* 1, 43–61.
- Aouacheria, A., Rech de Laval, V., Combet, C., and Hardwick, J.M. (2013). Evolution of Bcl-2 homology motifs: homology versus homoplasy. *Trends Cell Biol.* 23, 103–111.
- Armstrong, D.K., Bundy, B., Wenzel, L., Huang, H.Q., Baergen, R., Lele, S., Copeland, L.J., Walker, J.L., Burger, R.A., and Gynecologic Oncology Group (2006). Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 354, 34–43.
- Arnold, A.A., Aboukameel, A., Chen, J., Yang, D., Wang, S., Al-Katib, A., and Mohammad, R.M. (2008). Preclinical studies of Apogossypolone: a new nonpeptidic pan small-molecule inhibitor of Bcl-2, Bcl-XL and Mcl-1 proteins in Follicular Small Cleaved Cell Lymphoma model. *Mol. Cancer* 7, 20.
- Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat. Rev. Cancer* 2, 420–430.
- Autret, A., and Martin, S.J. (2009). Emerging role for members of the Bcl-2 family in mitochondrial morphogenesis. *Mol. Cell* 36, 355–363.
- Bae, J., Leo, C.P., Hsu, S.Y., and Hsueh, A.J. (2000). MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. *J. Biol. Chem.* 275, 25255–25261.
- Baell, J.B., and Huang, D.C.S. (2002). Prospects for targeting the Bcl-2 family of proteins to develop novel cytotoxic drugs. *Biochem. Pharmacol.* 64, 851–863.
- Bakrin, N., Classe, J.M., Pomel, C., Gouy, S., Chene, G., and Glehen, O. (2014). Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in ovarian cancer. *J. Visc. Surg.* 151, 347–353.
- Balakrishnan, K., Burger, J.A., Wierda, W.G., and Gandhi, V. (2009). AT-101 induces apoptosis in CLL B cells and overcomes stromal cell-mediated Mcl-1 induction and drug resistance. *Blood* 113, 149–153.
- Banerjee, S., Choi, M., Aboukameel, A., Wang, Z., Mohammad, M., Chen, J., Yang, D., Sarkar, F.H., and Mohammad, R.M. (2010). Preclinical Studies of Apogossypolone, a Novel Pan Inhibitor of Bcl-2 and Mcl-1, Synergistically Potentiates Cytotoxic Effect of Gemcitabine in Pancreatic Cancer Cells. *Pancreas* 39, 323.
- Baumgrass, R., Weiwad, M., Erdmann, F., Liu, J.O., Wunderlich, D., Grabley, S., and Fischer, G. (2001). Reversible inhibition of calcineurin by the polyphenolic aldehyde gossypol. *J. Biol. Chem.* 276, 47914–47921.
- Bedikian, A.Y., Garbe, C., Conry, R., Lebbe, C., Grob, J.J., and Genasense Melanoma Study Group (2014). Dacarbazine with or without oblimersen (a Bcl-2 antisense oligonucleotide) in chemotherapy-naïve patients with advanced melanoma and low-normal serum lactate dehydrogenase: “The AGENDA trial.” *Melanoma Res.* 24, 237–243.
- Beekman, A.M., and Howell, L.A. (2016). Small-Molecule and Peptide Inhibitors of the Pro-Survival Protein Mcl-1. *ChemMedChem* 11, 802–813.
- Beroukhi, R., Mermel, C.H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J.S., Dobson, J., Urashima, M., et al. (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463, 899–905.

- Bettigole, S.E., and Glimcher, L.H. (2015). Endoplasmic reticulum stress in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 107–138.
- Billen, L.P., Kokoski, C.L., Lovell, J.F., Leber, B., and Andrews, D.W. (2008). Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *PLoS Biol.* 6, e147.
- Bingle, C.D., Craig, R.W., Swales, B.M., Singleton, V., Zhou, P., and Whyte, M.K. (2000). Exon skipping in Mcl-1 results in a bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death. *J. Biol. Chem.* 275, 22136–22146.
- Birkinshaw, R.W., and Czabotar, P.E. The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation. *Semin. Cell Dev. Biol.*
- Bleicken, S., and Zeth, K. (2009). Conformational changes and protein stability of the pro-apoptotic protein Bax. *J. Bioenerg. Biomembr.* 41, 29–40.
- Bodo, J., Zhao, X., Durkin, L., Souers, A.J., Phillips, D.C., Smith, M.R., Hsi, E.D., Bodo, J., Zhao, X., Durkin, L., et al. (2016). Acquired resistance to venetoclax (ABT-199) in t(14;18) positive lymphoma cells. *Oncotarget* 7, 70000–70010.
- Boersma, M.D., Haase, H.S., Peterson-Kaufman, K.J., Lee, E.F., Clarke, O.B., Colman, P.M., Smith, B.J., Horne, W.S., Fairlie, W.D., and Gellman, S.H. (2012). Evaluation of diverse α/β -backbone patterns for functional α -helix mimicry: analogues of the Bim BH3 domain. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 315–323.
- du Bois, A., Pfisterer, J., Meier, W., and Wagner, U. (2003). Improving first-line therapy of advanced ovarian cancer - the AGO Ovarian Cancer Study Group perspective. *Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc.* 13 Suppl 2, 169–171.
- du Bois, A., Reuss, A., Pujade-Lauraine, E., Harter, P., Ray-Coquard, I., and Pfisterer, J. (2009). Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials. *Cancer* 115, 1234–1244.
- du Bois, A., Floquet, A., Kim, J.-W., Rau, J., del Campo, J.M., Friedlander, M., Pignata, S., Fujiwara, K., Vergote, I., Colombo, N., et al. (2014). Incorporation of pazopanib in maintenance therapy of ovarian cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 32, 3374–3382.
- Bonnefond, M.-L., Lambert, B., Giffard, F., Abeilard, E., Brotin, E., Louis, M.-H., Gueye, M.S., Gauduchon, P., Poulain, L., and N'Diaye, M. (2015). Calcium signals inhibition sensitizes ovarian carcinoma cells to anti-Bcl-xL strategies through Mcl-1 down-regulation. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 20, 535–550.
- Borner, C., Martinou, I., Mattmann, C., Irmeler, M., Schaerer, E., Martinou, J.C., and Tschopp, J. (1994). The protein bcl-2 alpha does not require membrane attachment, but two conserved domains to suppress apoptosis. *J. Cell Biol.* 126, 1059–1068.
- Broton, E., Meryet-Figuière, M., Simonin, K., Duval, R.E., Villedieu, M., Leroy-Dudal, J., Saison-Behmoaras, E., Gauduchon, P., Denoyelle, C., and Poulain, L. (2010). Bcl-XL and MCL-1 constitute pertinent targets in ovarian carcinoma and their concomitant inhibition is sufficient to induce apoptosis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 126, 885–895.
- Brouwer, J.M., Westphal, D., Dewson, G., Robin, A.Y., Uren, R.T., Bartolo, R., Thompson, G.V., Colman, P.M., Kluck, R.M., and Czabotar, P.E. (2014). Bak core and latch domains separate during activation, and freed core domains form symmetric homodimers. *Mol. Cell* 55, 938–946.

Bruick, R.K. (2000). Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 9082.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857–868.

Bueno, M.J., Mouron, S., and Quintela-Fandino, M. (2017). Personalising and targeting antiangiogenic resistance: a complex and multifactorial approach. *Br. J. Cancer*.

Burger, R.A., Brady, M.F., Bookman, M.A., Fleming, G.F., Monk, B.J., Huang, H., Mannel, R.S., Homesley, H.D., Fowler, J., Greer, B.E., et al. (2011). Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 365, 2473–2483.

Callahan, M.J., Crum, C.P., Medeiros, F., Kindelberger, D.W., Elvin, J.A., Garber, J.E., Feltmate, C.M., Berkowitz, R.S., and Muto, M.G. (2007). Primary Fallopian Tube Malignancies in BRCA-Positive Women Undergoing Surgery for Ovarian Cancer Risk Reduction. *J. Clin. Oncol.* 25, 3985–3990.

Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249–257.

Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 417–427.

Carneiro, B.A., Kaplan, J.B., Altman, J.K., Giles, F.J., and Platanias, L.C. (2015). Targeting mTOR signaling pathways and related negative feedback loops for the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer Biol. Ther.* 16, 648–656.

Cartron, P.-F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., Meflah, K., Vallette, F.M., and Juin, P. (2004). The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol. Cell* 16, 807–818.

Castilla, C., Congregado, B., Chinchón, D., Torrubia, F.J., Japón, M.A., and Sáez, C. (2006). Bcl-xL is overexpressed in hormone-resistant prostate cancer and promotes survival of LNCaP cells via interaction with proapoptotic Bak. *Endocrinology* 147, 4960–4967.

Certo, M., Moore, V.D.G., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S.A., and Letai, A. (2006). Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 9, 351–365.

Chen, Y.-J. (2007). Targeted mTOR in Human Gynecologic Cancers. *J. Cancer Mol.* 3, 101–106.

Chen, Z.X., and Pervaiz, S. (2010). Involvement of cytochrome c oxidase subunits Va and Vb in the regulation of cancer cell metabolism by Bcl-2. *Cell Death Differ.* 17, 408–420.

Chen, L., Yin, H., Farooqi, B., Sebt, S., Hamilton, A.D., and Chen, J. (2005). p53 alpha-Helix mimetics antagonize p53/MDM2 interaction and activate p53. *Mol. Cancer Ther.* 4, 1019–1025.

Cheng, D., Xu, Y., Sun, C., and He, Z. (2016). MicroRNA-451 sensitizes lung cancer cells to cisplatin through regulation of Mcl-1. *Mol. Cell. Biochem.* 423, 85–91.

Cheng, P., Ni, Z., Dai, X., Wang, B., Ding, W., Smith, A.R., Xu, L., Wu, D., He, F., and Lian, J. (2013). The novel BH-3 mimetic apogossypolone induces Beclin-1- and ROS-mediated autophagy in human hepatocellular cells. *Cell Death Dis.* 4, e489.

- Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., and Green, D.R. (2010). The BCL-2 Family Reunion. *Mol. Cell* 37, 299–310.
- Chou, J.J., Li, H., Salvesen, G.S., Yuan, J., and Wagner, G. (1999). Solution Structure of BID, an Intracellular Amplifier of Apoptotic Signaling. *Cell* 96, 615–624.
- Choudhary, G.S., Al-harbi, S., Mazumder, S., Hill, B.T., Smith, M.R., Bodo, J., Hsi, E.D., and Almasan, A. (2015). MCL-1 and BCL-xL-dependent resistance to the BCL-2 inhibitor ABT-199 can be overcome by preventing PI3K/AKT/mTOR activation in lymphoid malignancies. *Cell Death Dis.* 6, e1593.
- Chresta, C.M., Davies, B.R., Hickson, I., Harding, T., Cosulich, S., Critchlow, S.E., Vincent, J.P., Ellston, R., Jones, D., Sini, P., et al. (2010). AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer Res.* 70, 288–298.
- Classe, J.-M., Muller, M., Frenel, J.-S., Berton Rigaudo, D., Ferron, G., Jaffré, I., and Gladiéff, L. (2010). [Intraperitoneal chemotherapy in the treatment of advanced ovarian cancer]. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)* 39, 183–190.
- Cohen, N.A., Stewart, M.L., Gavathiotis, E., Tepper, J.L., Bruekner, S.R., Koss, B., Opferman, J.T., and Walensky, L.D. (2012). A competitive stapled peptide screen identifies a selective small molecule that overcomes MCL-1-dependent leukemia cell survival. *Chem. Biol.* 19, 1175–1186.
- Colak, S., Zimmerlin, C.D., Fessler, E., Hogdal, L., Prasetyanti, P.R., Grandela, C.M., Letai, A., and Medema, J.P. (2014). Decreased mitochondrial priming determines chemoresistance of colon cancer stem cells. *Cell Death Differ.* 21, 1170–1177.
- Coloff, J.L., Macintyre, A.N., Nichols, A.G., Liu, T., Gallo, C.A., Plas, D.R., and Rathmell, J.C. (2011). Akt-Dependent Glucose Metabolism Promotes Mcl-1 Synthesis to Maintain Cell Survival and Resistance to Bcl-2 Inhibition. *Cancer Res.* 71, 5204–5213.
- Colombo, P.-E., Fabbro, M., Theillet, C., Bibeau, F., Rouanet, P., and Ray-Coquard, I. (2014). Sensitivity and resistance to treatment in the primary management of epithelial ovarian cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 89, 207–216.
- Commisso, C., Davidson, S.M., Soydaner-Azeloglu, R.G., Parker, S.J., Kamphorst, J.J., Hackett, S., Grabocka, E., Nofal, M., Drebin, J.A., Thompson, C.B., et al. (2013). Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature* 497, 633–637.
- Cory, S., and Adams, J.M. (2005). Killing cancer cells by flipping the Bcl-2/Bax switch. *Cancer Cell* 8, 5–6.
- Cory, S., Huang, D.C.S., and Adams, J.M. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590–8607.
- Craig, R.W. (2002). MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia* 16, 444.
- Croxton, R., Ma, Y., Song, L., Haura, E.B., and Cress, W.D. (2002). Direct repression of the Mcl-1 promoter by E2F1. *Oncogene* 21, 1359–1369.
- Czabotar, P.E., Lee, E.F., van Delft, M.F., Day, C.L., Smith, B.J., Huang, D.C., Fairlie, W.D., Hinds, M.G., and Colman, P.M. (2007). Structural insights into the degradation of Mcl-1 induced by BH3 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 6217–6222.

- Czabotar, P.E., Lee, E.F., Thompson, G.V., Wardak, A.Z., Fairlie, W.D., and Colman, P.M. (2011). Mutation to Bax beyond the BH3 Domain Disrupts Interactions with Pro-survival Proteins and Promotes Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 286, 7123–7131.
- Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A., and Adams, J.M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 49–63.
- Dai, H., Ding, H., Meng, X.W., Lee, S.-H., Schneider, P.A., and Kaufmann, S.H. (2013). Contribution of Bcl-2 phosphorylation to Bak binding and drug resistance. *Cancer Res.* 73, 6998–7008.
- Dai, Y., Jin, S., Li, X., Wang, D., Dai, Y., Jin, S., Li, X., and Wang, D. (2016). The involvement of Bcl-2 family proteins in AKT-regulated cell survival in cisplatin resistant epithelial ovarian cancer. *Oncotarget* 8, 1354–1368.
- Danese, A., Patergnani, S., Bonora, M., Wieckowski, M.R., Previati, M., Giorgi, C., and Pinton, P. (2017). Calcium regulates cell death in cancer: Roles of the mitochondria and mitochondria-associated membranes (MAMs). *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1858, 615–627.
- Danial, N.N., and Korsmeyer, S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205–219.
- Day, C.L., Chen, L., Richardson, S.J., Harrison, P.J., Huang, D.C.S., and Hinds, M.G. (2005). Solution structure of prosurvival Mcl-1 and characterization of its binding by proapoptotic BH3-only ligands. *J. Biol. Chem.* 280, 4738–4744.
- De Placido, S., Scambia, G., Di Vagno, G., Naglieri, E., Lombardi, A.V., Biamonte, R., Marinaccio, M., Carteni, G., Manzione, L., Febbraro, A., et al. (2004). Topotecan compared with no therapy after response to surgery and carboplatin/paclitaxel in patients with ovarian cancer: Multicenter Italian Trials in Ovarian Cancer (MITO-1) randomized study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 22, 2635–2642.
- Del Gaizo Moore, V., Schlis, K.D., Sallan, S.E., Armstrong, S.A., and Letai, A. (2008). BCL-2 dependence and ABT-737 sensitivity in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 111, 2300–2309.
- van Delft, M.F., Wei, A.H., Mason, K.D., Vandenberg, C.J., Chen, L., Czabotar, P.E., Willis, S.N., Scott, C.L., Day, C.L., Cory, S., et al. (2006). The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* 10, 389–399.
- Deng, X., Gao, F., Flagg, T., and May, W.S. (2004). Mono- and multisite phosphorylation enhances Bcl2's antiapoptotic function and inhibition of cell cycle entry functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 153–158.
- Denisov, A.Y., Madiraju, M.S.R., Chen, G., Khadir, A., Beauparlant, P., Attardo, G., Shore, G.C., and Gehring, K. (2003). Solution structure of human BCL-w: modulation of ligand binding by the C-terminal helix. *J. Biol. Chem.* 278, 21124–21128.
- Denisov, A.Y., Chen, G., Sprules, T., Moldoveanu, T., Beauparlant, P., and Gehring, K. (2006). Structural model of the BCL-w-BID peptide complex and its interactions with phospholipid micelles. *Biochemistry (Mosc.)* 45, 2250–2256.
- Denoyelle, C., Lambert, B., Meryet-Figuière, M., Vigneron, N., Brotin, E., Lecerf, C., Abeilard, E., Giffard, F., Louis, M.-H., Gauduchon, P., et al. (2014). miR-491-5p-induced apoptosis in ovarian carcinoma depends on the direct inhibition of both BCL-XL and EGFR leading to BIM activation. *Cell Death Dis.* 5, e1445.

- Derenne, S., Monia, B., Dean, N.M., Taylor, J.K., Rapp, M.-J., Harousseau, J.-L., Bataille, R., and Amiot, M. (2002). Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-xL is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood* 100, 194–199.
- Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388, 300–304.
- Dewson, G., Kratina, T., Sim, H.W., Puthalakath, H., Adams, J.M., Colman, P.M., and Kluck, R.M. (2008). To Trigger Apoptosis, Bak Exposes Its BH3 Domain and Homodimerizes via BH3:Groove Interactions. *Mol. Cell* 30, 369–380.
- Dewson, G., Kratina, T., Czabotar, P., Day, C.L., Adams, J.M., and Kluck, R.M. (2009). Bak Activation for Apoptosis Involves Oligomerization of Dimers via Their $\alpha 6$ Helices. *Mol. Cell* 36, 696–703.
- Dienstmann, R., Rodon, J., Serra, V., and Tabernero, J. (2014). Picking the point of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* 13, 1021–1031.
- Dilruba, S., and Kalayda, G.V. (2016). Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 77, 1103–1124.
- Ding, Q., He, X., Xia, W., Hsu, J.-M., Chen, C.-T., Li, L.-Y., Lee, D.-F., Yang, J.-Y., Xie, X., Liu, J.-C., et al. (2007). Myeloid cell leukemia-1 inversely correlates with glycogen synthase kinase-3 β activity and associates with poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Res.* 67, 4564–4571.
- Ding, Q., Huo, L., Yang, J.-Y., Xia, W., Wei, Y., Liao, Y., Chang, C.-J., Yang, Y., Lai, C.-C., Lee, D.-F., et al. (2008). Down-regulation of myeloid cell leukemia-1 through inhibiting Erk/Pin 1 pathway by sorafenib facilitates chemosensitization in breast cancer. *Cancer Res.* 68, 6109–6117.
- Dlugosz, P.J., Billen, L.P., Annis, M.G., Zhu, W., Zhang, Z., Lin, J., Leber, B., and Andrews, D.W. (2006). Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization. *EMBO J.* 25, 2287.
- Dodier, P., and Piché, A. (2006). Bcl-X(L) is functionally non-equivalent for the regulation of growth and survival in human ovarian cancer cells. *Gynecol. Oncol.* 100, 254–263.
- Doi, K., Li, R., Sung, S.-S., Wu, H., Liu, Y., Manieri, W., Krishnegowda, G., Awwad, A., Dewey, A., Liu, X., et al. (2012). Discovery of Marinopyrrole A (Maritoclax) as a Selective Mcl-1 Antagonist that Overcomes ABT-737 Resistance by Binding to and Targeting Mcl-1 for Proteasomal Degradation. *J. Biol. Chem.* 287, 10224–10235.
- Doi, K., Liu, Q., Gowda, K., Barth, B.M., Claxton, D., Amin, S., Jr, T.P.L., and Wang, H.-G. (2014). Maritoclax induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells with elevated Mcl-1 expression. *Cancer Biol. Ther.* 15, 1077–1086.
- Dousset, C., Maïga, S., Gomez-Bougie, P., Le Coq, J., Touzeau, C., Moreau, P., Le Gouill, S., Chiron, D., Pellat-Deceunynck, C., Moreau-Aubry, A., et al. (2016). BH3 profiling as a tool to identify acquired resistance to venetoclax in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.*
- Du, H., Wolf, J., Schafer, B., Moldoveanu, T., Chipuk, J.E., and Kuwana, T. (2011). BH3 Domains other than Bim and Bid Can Directly Activate Bax/Bak. *J. Biol. Chem.* 286, 491.
- Dubrez, L., Berthelet, J., and Glorian, V. (2013). IAP proteins as targets for drug development in oncology. *OncoTargets Ther.* 9, 1285–1304.
- Dutta, S., Gullá, S., Chen, T.S., Fire, E., Grant, R.A., and Keating, A.E. (2010). Determinants of BH3 binding specificity for Mcl-1 vs. Bcl-xL. *J. Mol. Biol.* 398, 747.

- Dzhagalov, I., Dunkle, A., and He, Y.-W. (2008). The Anti-Apoptotic Bcl-2 Family Member Mcl-1 Promotes T Lymphocyte Survival at Multiple Stages. *J. Immunol.* *181*, 521–528.
- Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M.M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N., and Youle, R.J. (2011). Bcl-xL Retrotranslocates Bax from the Mitochondria into the Cytosol. *Cell* *145*, 104–116.
- Edwards, A.L., Wachter, F., Lammert, M., Huhn, A.J., Luccarelli, J., Bird, G.H., and Walensky, L.D. (2015). Cellular Uptake and Ultrastructural Localization Underlie the Pro-apoptotic Activity of a Hydrocarbon-stapled BIM BH3 Peptide. *ACS Chem. Biol.* *10*, 2149–2157.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* *35*, 495.
- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., and Martinou, J.C. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 929–935.
- Ewings, K.E., Hadfield-Moorhouse, K., Wiggins, C.M., Wickenden, J.A., Balmanno, K., Gilley, R., Degenhardt, K., White, E., and Cook, S.J. (2007). ERK1/2-dependent phosphorylation of BimEL promotes its rapid dissociation from Mcl-1 and Bcl-xL. *EMBO J.* *26*, 2856–2867.
- Faber, A.C., Li, D., Song, Y., Liang, M.-C., Yeap, B.Y., Bronson, R.T., Lifshits, E., Chen, Z., Maira, S.-M., García-Echeverría, C., et al. (2009). Differential induction of apoptosis in HER2 and EGFR addicted cancers following PI3K inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 19503–19508.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan 2012. *Int. J. Cancer* *136*, E359–E386.
- Fernandez-Luna, J.L. (2008). Regulation of pro-apoptotic BH3-only proteins and its contribution to cancer progression and chemoresistance. *Cell. Signal.* *20*, 1921–1926.
- Fey, D., Matallanas, D., Rauch, J., Rukhlenko, O.S., and Kholodenko, B.N. (2016). The complexities and versatility of the RAS-to-ERK signalling system in normal and cancer cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* *58*, 96–107.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* *285*, 1182–1186.
- de Fougerolles, A., Vornlocher, H.-P., Maraganore, J., and Lieberman, J. (2007). Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* *6*, 443–453.
- Fujise, K., Zhang, D., Liu, J., and Yeh, E.T. (2000). Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* *275*, 39458–39465.
- Gabellini, C., Trisciuglio, D., and Del Bufalo, D. (2017). Non-canonical roles of Bcl-2 and Bcl-xL proteins: relevance of BH4 domain. *Carcinogenesis* *38*, 579–587.
- Galehdar, Z., Swan, P., Fuerth, B., Callaghan, S.M., Park, D.S., and Cregan, S.P. (2010). Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4-CHOP-mediated induction of the Bcl-2 homology 3-only member PUMA. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 16938–16948.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., et al. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* *19*, 107.

- Gama, V., Swahari, V., Schafer, J., Kole, A.J., Evans, A., Huang, Y., Cliffe, A., Golitz, B., Sciaky, N., Pei, X.-H., et al. (2014). The E3 ligase PARC mediates the degradation of cytosolic cytochrome c to promote survival in neurons and cancer cells. *Sci. Signal.* 7, ra67.
- Gavathiotis, E., Suzuki, M., Davis, M.L., Pitter, K., Bird, G.H., Katz, S.G., Tu, H.-C., Kim, H., Cheng, E.H.-Y., Tjandra, N., et al. (2008). BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* 455, 1076–1081.
- George, A., Kaye, S., and Banerjee, S. (2017). Delivering widespread BRCA testing and PARP inhibition to patients with ovarian cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14, 284–296.
- Germain, M., and Duronio, V. (2007). The N Terminus of the Anti-apoptotic BCL-2 Homologue MCL-1 Regulates Its Localization and Function. *J. Biol. Chem.* 282, 32233–32242.
- Ghobrial, I.M., Witzig, T.E., and Adjei, A.A. (2005). Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA. Cancer J. Clin.* 55, 178–194.
- Ghosh, A.P., Klocke, B.J., Ballestas, M.E., and Roth, K.A. (2012). CHOP potentially co-operates with FOXO3a in neuronal cells to regulate PUMA and BIM expression in response to ER stress. *PloS One* 7, e39586.
- Gilks, C.B., and Prat, J. (2009). Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances. *Hum. Pathol.* 40, 1213–1223.
- Giménez-Cassina, A., and Danial, N.N. (2015). Regulation of mitochondrial nutrient and energy metabolism by BCL-2 family proteins. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 26, 165–175.
- Giordano, A., Calvani, M., Petillo, O., Grippo, P., Tuccillo, F., Melone, M. a. B., Bonelli, P., Calarco, A., and Peluso, G. (2005). tBid induces alterations of mitochondrial fatty acid oxidation flux by malonyl-CoA-independent inhibition of carnitine palmitoyltransferase-1. *Cell Death Differ.* 12, 603–613.
- Glick, D., Zhang, W., Beaton, M., Marsboom, G., Gruber, M., Simon, M.C., Hart, J., Dorn, G.W., Brady, M.J., and Macleod, K.F. (2012). BNip3 regulates mitochondrial function and lipid metabolism in the liver. *Mol. Cell. Biol.* 32, 2570–2584.
- Gloaguen, C., Voisin-Chiret, A.S., Sopkova-de Oliveira Santos, J., Fogha, J., Gautier, F., De Giorgi, M., Burzicki, G., Perato, S., Pétigny-Lechartier, C., Simonin-Le Jeune, K., et al. (2015). First evidence that oligopyridines, α -helix foldamers, inhibit Mcl-1 and sensitize ovarian carcinoma cells to Bcl-xL-targeting strategies. *J. Med. Chem.* 58, 1644–1668.
- Goldar, S., Khaniani, M.S., Derakhshan, S.M., and Baradaran, B. (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 16, 2129–2144.
- Gomez-Bougie, P., Ménoret, E., Juin, P., Dousset, C., Pellat-Deceunynck, C., and Amiot, M. (2011). Noxa controls Mule-dependent Mcl-1 ubiquitination through the regulation of the Mcl-1/USP9X interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 413, 460–464.
- Goncharenko-Khaider, N., Matte, I., Lane, D., Rancourt, C., and Piché, A. (2012). Ovarian cancer ascites increase Mcl-1 expression in tumor cells through ERK1/2-Elk-1 signaling to attenuate TRAIL-induced apoptosis. *Mol. Cancer* 11, 84.
- Gong, J., Zhang, J.-P., Li, B., Zeng, C., You, K., Chen, M.-X., Yuan, Y., and Zhuang, S.-M. (2013). MicroRNA-125b promotes apoptosis by regulating the expression of Mcl-1, Bcl-w and IL-6R. *Oncogene* 32, 3071–3079.

- Gougeon, M.-L., and Montagnier, L. (1999). Programmed Cell Death as a Mechanism of CD4 and CD8 T Cell Deletion in AIDS: Molecular Control and Effect of Highly Active Anti-retroviral Therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 887, 199–212.
- Grad, J.M., Zeng, X.R., and Boise, L.H. (2000). Regulation of Bcl-xL: a little bit of this and a little bit of STAT. *Curr. Opin. Oncol.* 12, 543–549.
- Grant, S. (2017). Rational combination strategies to enhance venetoclax activity and overcome resistance in hematologic malignancies. *Leuk. Lymphoma* 1–8.
- Greish, K. (2007). Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: a royal gate for targeted anticancer nanomedicines. *J. Drug Target.* 15, 457–464.
- Groo, A.-C., De Pascale, M., Voisin-Chiret, A.-S., Corvaisier, S., Since, M., and Malzert-Fréon, A. (2017). Comparison of 2 strategies to enhance pyridoclast solubility: Nanoemulsion delivery system versus salt synthesis. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 97, 218–226.
- Gross, A., and Katz, S.G. (2017). Non-apoptotic functions of BCL-2 family proteins. *Cell Death Differ.* 24, 1348–1358.
- Gruosso, T., Garnier, C., Abelanet, S., Kieffer, Y., Lemesre, V., Bellanger, D., Bieche, I., Marangoni, E., Sastre-Garau, X., Mieulet, V., et al. (2015). MAP3K8/TPL-2/COT is a potential predictive marker for MEK inhibitor treatment in high-grade serous ovarian carcinomas. *Nat. Commun.* 6, 8583.
- Gurung, A., Hung, T., Morin, J., and Gilks, C.B. (2013). Molecular abnormalities in ovarian carcinoma: clinical, morphological and therapeutic correlates. *Histopathology* 62, 59–70.
- Hall, C.P., Reynolds, C.P., and Kang, M.H. (2016). Modulation of Glucocorticoid Resistance in Pediatric T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia by Increasing BIM Expression with the PI3K/mTOR Inhibitor BEZ235. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 22, 621–632.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Harada, H., Quearry, B., Ruiz-Vela, A., and Korsmeyer, S.J. (2004). Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15313–15317.
- Hekman, M., Albert, S., Galmiche, A., Rennefahrt, U.E.E., Fueller, J., Fischer, A., Puehringer, D., Wiese, S., and Rapp, U.R. (2006). Reversible membrane interaction of BAD requires two C-terminal lipid binding domains in conjunction with 14-3-3 protein binding. *J. Biol. Chem.* 281, 17321–17336.
- Herrant, M., Jacquél, A., Marchetti, S., Belhacène, N., Colosetti, P., Luciano, F., and Auberger, P. (2004). Cleavage of Mcl-1 by caspases impaired its ability to counteract Bim-induced apoptosis. *Oncogene* 23, 7863–7873.
- Hershko, T., and Ginsberg, D. (2004). Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 8627–8634.
- Hinds, M.G., Lackmann, M., Skea, G.L., Harrison, P.J., Huang, D.C.S., and Day, C.L. (2003). The structure of Bcl-w reveals a role for the C-terminal residues in modulating biological activity. *EMBO J.* 22, 1497–1507.
- Hockings, C., Anwari, K., Ninnis, R.L., Brouwer, J., O’Hely, M., Evangelista, M., Hinds, M.G., Czabotar, P.E., Lee, E.F., Fairlie, W.D., et al. (2015). Bid chimeras indicate that most BH3-only proteins can directly activate Bak and Bax, and show no preference for Bak versus Bax. *Cell Death Dis.* 6, e1735.

- Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E., and Swanson, P.E. (2009). Cell Death in Disease: Mechanisms and Emerging Therapeutic Concepts. *N. Engl. J. Med.* 361, 1570.
- Hsieh, A.C., Costa, M., Zollo, O., Davis, C., Feldman, M.E., Testa, J.R., Meyuhas, O., Shokat, K.M., and Ruggero, D. (2010). Genetic dissection of the oncogenic mTOR pathway reveals druggable addiction to translational control via 4EBP-eIF4E. *Cancer Cell* 17, 249–261.
- Hsu, Y.-T., Wolter, K.G., and Youle, R.J. (1997). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-XL during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 3668–3672.
- Huang, D.C., Adams, J.M., and Cory, S. (1998). The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *EMBO J.* 17, 1029.
- Huang, H.M., Huang, C.J., and Yen, J.J. (2000). Mcl-1 is a common target of stem cell factor and interleukin-5 for apoptosis prevention activity via MEK/MAPK and PI-3K/Akt pathways. *Blood* 96, 1764–1771.
- Huang, Y.-W., Wang, L.-S., Chang, H.-L., Ye, W., Dowd, M.K., Wan, P.J., and Lin, Y.C. (2006). Molecular mechanisms of (-)-gossypol-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Anticancer Res.* 26, 1925–1933.
- Inuzuka, H., Shaik, S., Onoyama, I., Gao, D., Tseng, A., Maser, R.S., Zhai, B., Wan, L., Gutierrez, A., Lau, A.W., et al. (2011). SCF(FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction. *Nature* 471, 104–109.
- Iurlaro, R., and Muñoz-Pinedo, C. (2016). Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *FEBS J.* 283, 2640–2652.
- Jackson, R.S., Placzek, W., Fernandez, A., Ziaee, S., Chu, C.-Y., Wei, J., Stebbins, J., Kitada, S., Fritz, G., Reed, J.C., et al. (2012). Sabutoclax, a Mcl-1 antagonist, inhibits tumorigenesis in transgenic mouse and human xenograft models of prostate cancer. *Neoplasia N. Y.* N 14, 656–665.
- Jamil, S., Sobouti, R., Hojabrpour, P., Raj, M., Kast, J., and Duronio, V. (2005). A proteolytic fragment of Mcl-1 exhibits nuclear localization and regulates cell growth by interaction with Cdk1. *Biochem. J.* 387, 659–667.
- Jansen, B., and Zangemeister-Wittke, U. (2002). Antisense therapy for cancer—the time of truth. *Lancet Oncol.* 3, 672–683.
- Jebahi, A., Villedieu, M., Pétigny-Lechartier, C., Brotin, E., Louis, M.-H., Abeilard, E., Giffard, F., Guercio, M., Briand, M., Gauduchon, P., et al. (2014). PI3K/mTOR dual inhibitor NVP-BEZ235 decreases Mcl-1 expression and sensitizes ovarian carcinoma cells to Bcl-xL-targeting strategies, provided that Bim expression is induced. *Cancer Lett.* 348, 38–49.
- Jeffers, J.R., Parganas, E., Lee, Y., Yang, C., Wang, J., Brennan, J., MacLean, K.H., Han, J., Chittenden, T., Ihle, J.N., et al. (2003). Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* 4, 321–328.
- Jin, H.-O., Hong, S.-E., Woo, S.-H., Lee, J.-H., Choe, T.-B., Kim, E.-K., Noh, W.-C., Lee, J.-K., Hong, S.-I., Kim, J.-I., et al. (2012). Silencing of Twist1 sensitizes NSCLC cells to cisplatin via AMPK-activated mTOR inhibition. *Cell Death Dis.* 3, e319.
- Johnson, L.M., Mortenson, D.E., Yun, H.G., Horne, W.S., Ketas, T.J., Lu, M., Moore, J.P., and Gellman, S.H. (2012). Enhancement of α -helix mimicry by an α/β -peptide foldamer via incorporation of a dense ionic side-chain array. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 7317–7320.

- Jourdan, M., De Vos, J., Mechti, N., and Klein, B. (2000). Regulation of Bcl-2-family proteins in myeloma cells by three myeloma survival factors: interleukin-6, interferon-alpha and insulin-like growth factor 1. *Cell Death Differ.* 7, 1244–1252.
- Juin, P., Geneste, O., Gautier, F., Depil, S., and Campone, M. (2013). Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* 13, 455–465.
- Karnezis, A.N., Cho, K.R., Gilks, C.B., Pearce, C.L., and Huntsman, D.G. (2016). The disparate origins of ovarian cancers: pathogenesis and prevention strategies. *Nat. Rev. Cancer*.
- Kataoka, T., Schröter, M., Hahne, M., Schneider, P., Irmeler, M., Thome, M., Froelich, C.J., and Tschopp, J. (1998). FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 161, 3936–3942.
- Katsumata, N., Yasuda, M., Takahashi, F., Isonishi, S., Jobo, T., Aoki, D., Tsuda, H., Sugiyama, T., Kodama, S., Kimura, E., et al. (2009). Dose-dense paclitaxel once a week in combination with carboplatin every 3 weeks for advanced ovarian cancer: a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* 374, 1331–1338.
- Katsumata, N., Yasuda, M., Isonishi, S., Takahashi, F., Michimae, H., Kimura, E., Aoki, D., Jobo, T., Kodama, S., Terauchi, F., et al. (2013). Long-term results of dose-dense paclitaxel and carboplatin versus conventional paclitaxel and carboplatin for treatment of advanced epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer (JGOG 3016): a randomised, controlled, open-label trial. *Lancet Oncol.* 14, 1020–1026.
- Kavallaris, M. (2010). Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat. Rev. Cancer* 10, 194–204.
- Kawakami, H., Huang, S., Pal, K., Dutta, S.K., Mukhopadhyay, D., and Sinicrope, F.A. (2016). Mutant BRAF Upregulates MCL-1 to Confer Apoptosis Resistance that Is Reversed by MCL-1 Antagonism and Cobimetinib in Colorectal Cancer. *Mol. Cancer Ther.* 15, 3015–3027.
- Kehoe, S., Hook, J., Nankivell, M., Jayson, G.C., Kitchener, H., Lopes, T., Luesley, D., Perren, T., Bannoo, S., Mascarenhas, M., et al. (2015). Primary chemotherapy versus primary surgery for newly diagnosed advanced ovarian cancer (CHORUS): an open-label, randomised, controlled, non-inferiority trial. *The Lancet* 386, 249–257.
- Kerr, J.F., Gobé, G.C., Winterford, C.M., and Harmon, B.V. (1995). Anatomical methods in cell death. *Methods Cell Biol.* 46, 1–27.
- Khaw, S.L., Huang, D.C.S., and Roberts, A.W. (2011). Overcoming blocks in apoptosis with BH3-mimetic therapy in haematological malignancies. *Pathology (Phila.)* 43, 525–535.
- Kim, J.-H., and Bae, J. (2013). MCL-1ES induces MCL-1L-dependent BAX- and BAK-independent mitochondrial apoptosis. *PloS One* 8, e79626.
- Kim, J.-Y., Ahn, H.-J., Ryu, J.-H., Suk, K., and Park, J.-H. (2004). BH3-only Protein Noxa Is a Mediator of Hypoxic Cell Death Induced by Hypoxia-inducible Factor 1 α . *J. Exp. Med.* 199, 113.
- Kim, K.W., Moretti, L., Mitchell, L.R., Jung, D.K., and Lu, B. (2009). Combined Bcl-2/Mammalian Target of Rapamycin Inhibition Leads to Enhanced Radiosensitization via Induction of Apoptosis and Autophagy in Non-Small Cell Lung Tumor Xenograft Model. *Clin. Cancer Res.* 15, 6096–6105.
- Kole, R., Krainer, A.R., and Altman, S. (2012). RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 125–140.

- Konopleva, M., Contractor, R., Tsao, T., Samudio, I., Ruvolo, P.P., Kitada, S., Deng, X., Zhai, D., Shi, Y.-X., Sneed, T., et al. (2006). Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 10, 375–388.
- Konopleva, M., Milella, M., Ruvolo, P., Watts, J.C., Ricciardi, M.R., Korchin, B., McQueen, T., Bornmann, W., Tsao, T., Bergamo, P., et al. (2012). MEK inhibition enhances ABT-737-induced leukemia cell apoptosis via prevention of ERK-activated MCL-1 induction and modulation of MCL-1/BIM complex. *Leukemia* 26, 778–787.
- Kotschy, A., Szlavik, Z., Murray, J., Davidson, J., Maragno, A.L., Le Toumelin-Braizat, G., Chanrion, M., Kelly, G.L., Gong, J.-N., Moujalled, D.M., et al. (2016). The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature* 538, 477–482.
- Krajewska, M., Krajewski, S., Epstein, J.I., Shabaik, A., Sauvageot, J., Song, K., Kitada, S., and Reed, J.C. (1996). Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am. J. Pathol.* 148, 1567–1576.
- Krajewski, S., Bodrug, S., Gascoyne, R., Berean, K., Krajewska, M., and Reed, J.C. (1994). Immunohistochemical analysis of Mcl-1 and Bcl-2 proteins in normal and neoplastic lymph nodes. *Am. J. Pathol.* 145, 515–525.
- Krajewski, S., Bodrug, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Gascoyne, R., Berean, K., and Reed, J.C. (1995). Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo. *Am. J. Pathol.* 146, 1309–1319.
- Kritzer, J.A. (2012). The secret of MIM: a novel, MCL-1-specific small molecule. *Chem. Biol.* 19, 1082–1083.
- Kumar, S. (2006). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 14, 32–43.
- Kurman, R.J., and Shih, I.-M. (2011). Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer—Shifting the paradigm. *Hum. Pathol.* 42, 918–931.
- Kurman, R.J., and Shih, I.-M. (2016). The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *Am. J. Pathol.* 186, 733–747.
- Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J.E., Bonzon, C., Sullivan, B.A., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (2005). BH3 Domains of BH3-Only Proteins Differentially Regulate Bax-Mediated Mitochondrial Membrane Permeabilization Both Directly and Indirectly. *Mol. Cell* 17, 525–535.
- LaBelle, J.L., Katz, S.G., Bird, G.H., Gavathiotis, E., Stewart, M.L., Lawrence, C., Fisher, J.K., Godes, M., Pitter, K., Kung, A.L., et al. (2012). A stapled BIM peptide overcomes apoptotic resistance in hematologic cancers. *J. Clin. Invest.* 122, 2018–2031.
- Laplane, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274–293.
- Ledermann, J.A., and Kristeleit, R.S. (2010). Optimal treatment for relapsing ovarian cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 21 Suppl 7, vii218-222.
- Ledermann, J., Harter, P., Gourley, C., Friedlander, M., Vergote, I., Rustin, G., Scott, C., Meier, W., Shapira-Frommer, R., Safra, T., et al. (2012). Olaparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive Relapsed Ovarian Cancer. *N. Engl. J. Med.* 366, 1382–1392.

- Lee, E.F., Czabotar, P.E., Smith, B.J., Deshayes, K., Zobel, K., Colman, P.M., and Fairlie, W.D. (2007). Crystal structure of ABT-737 complexed with Bcl-xL: implications for selectivity of antagonists of the Bcl-2 family. *Cell Death Differ.* 14, 1711–1713.
- Lee, E.F., Dewson, G., Evangelista, M., Pettikiriarachchi, A., Gold, G.J., Zhu, H., Colman, P.M., and Fairlie, W.D. (2014a). The Functional Differences between Pro-survival and Pro-apoptotic B Cell Lymphoma 2 (Bcl-2) Proteins Depend on Structural Differences in Their Bcl-2 Homology 3 (BH3) Domains. *J. Biol. Chem.* 289, 36001.
- Lee, J.H., Zhang, Q., Jo, S., Chai, S.C., Oh, M., Im, W., Lu, H., and Lim, H.-S. (2011). Novel pyrrolopyrimidine-based α -helix mimetics: cell-permeable inhibitors of protein–protein interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 676–679.
- Lee, S., Braun, C.R., Bird, G.H., and Walensky, L.D. (2014b). Photoreactive stapled peptides to identify and characterize BCL-2 family interaction sites by mass spectrometry. *Methods Enzymol.* 544, 25–48.
- Leshchiner, E.S., Braun, C.R., Bird, G.H., and Walensky, L.D. (2013). Direct activation of full-length proapoptotic BAK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E986.
- Lessene, G., Czabotar, P.E., and Colman, P.M. (2008). BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 989–1000.
- Lessene, G., Czabotar, P.E., Sleebs, B.E., Zobel, K., Lowes, K.N., Adams, J.M., Baell, J.B., Colman, P.M., Deshayes, K., Fairbrother, W.J., et al. (2013). Structure-guided design of a selective BCL-XL inhibitor. *Nat. Chem. Biol.* 9, 390–397.
- Leuenroth, S.J., Grutkoski, P.S., Ayala, A., and Simms, H.H. (2000). The loss of Mcl-1 expression in human polymorphonuclear leukocytes promotes apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* 68, 158–166.
- Levanon, K., Crum, C., and Drapkin, R. (2008). New insights into the pathogenesis of serous ovarian cancer and its clinical impact. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 5284–5293.
- Levenson, J.D., Phillips, D.C., Mitten, M.J., Boghaert, E.R., Diaz, D., Tahir, S.K., Belmont, L.D., Nimmer, P., Xiao, Y., Ma, X.M., et al. (2015). Exploiting selective BCL-2 family inhibitors to dissect cell survival dependencies and define improved strategies for cancer therapy. *Sci. Transl. Med.* 7, 279ra40–279ra40.
- Levine, B., and Klionsky, D.J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell* 6, 463–477.
- Lheureux, S., Lecerf, C., Briand, M., Louis, M.-H., Dutoit, S., Jebahi, A., Giffard, F., Fournier, C.B., Batalla, A., Poulain, L., et al. (2013). (18)F-FDG Is a Surrogate Marker of Therapy Response and Tumor Recovery after Drug Withdrawal during Treatment with a Dual PI3K/mTOR Inhibitor in a Preclinical Model of Cisplatin-Resistant Ovarian Cancer. *Transl. Oncol.* 6, 586–595.
- Lheureux, S., N'Diaye, M., Blanc-Fournier, C., Dugué, A.E., Clarisse, B., Dutoit, S., Giffard, F., Abeilard, E., Briand, M., Labiche, A., et al. (2015). Identification of predictive factors of response to the BH3-mimetic molecule ABT-737: an ex vivo experiment in human serous ovarian carcinoma. *Int. J. Cancer* 136, E340–350.
- Li, M.L., and Greenberg, R.A. (2012). Links between genome integrity and BRCA1 tumor suppression. *Trends Biochem. Sci.* 37, 418–424.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* 94, 491–501.

- Li, J., Lee, B., and Lee, A.S. (2006). Endoplasmic Reticulum Stress-induced Apoptosis MULTIPLE PATHWAYS AND ACTIVATION OF p53-UP-REGULATED MODULATOR OF APOPTOSIS (PUMA) AND NOXA BY p53. *J. Biol. Chem.* 281, 7260–7270.
- Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., et al. (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol. Cell* 6, 1389–1399.
- Liu, J.R., Fletcher, B., Page, C., Hu, C., Nunez, G., and Baker, V. (1998). Bcl-xL is expressed in ovarian carcinoma and modulates chemotherapy-induced apoptosis. *Gynecol. Oncol.* 70, 398–403.
- Liu, X., Dai, S., Zhu, Y., Marrack, P., and Kappler, J.W. (2003). The Structure of a Bcl-xL/Bim Fragment Complex: Implications for Bim Function. *Immunity* 19, 341–352.
- Liu, X., Lv, Z., Zou, J., Liu, X., Ma, J., Wang, J., Sa, N., Jing, P., and Xu, W. (2016). Afatinib down-regulates MCL-1 expression through the PERK-eIF2 α -ATF4 axis and leads to apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Am. J. Cancer Res.* 6, 1708.
- Liu, Y., Zhang, Z., Song, T., Liang, F., Xie, M., and Sheng, H. (2013). Resistance to BH3 mimetic S1 in SCLC cells that up-regulate and phosphorylate Bcl-2 through ERK1/2. *Br. J. Pharmacol.* 169, 1612–1623.
- Liu, Y., Haste, N.M., Thienphrapa, W., Li, J., Nizet, V., Hensler, M., and Li, R. (2014). Marinopyrrole Derivatives as Potential Antibiotic Agents against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (III). *Mar. Drugs* 12, 2458.
- Liu, Z., Sun, C., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., Betz, S.F., Oost, T., Herrmann, J., Wu, J.C., and Fesik, S.W. (2000). Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature* 408, 1004–1008.
- Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S.W.G., Bouchier-Hayes, L., Temirov, J., McCormick, L.L., Dillon, C.P., and Green, D.R. (2011). A Unified Model of Mammalian BCL-2 Protein Family Interactions at the Mitochondria. *Mol. Cell* 44, 517–531.
- Lopez, J., and Tait, S.W.G. (2015). Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br. J. Cancer* 112, 957–962.
- LoRusso, P.M. (2016). Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Solid Tumors. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*
- Luciano, F., Jacquet, A., Colosetti, P., Herrant, M., Cagnol, S., Pages, G., and Auberger, P. (2003). Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene* 22, 6785–6793.
- Luna-Vargas, M.P.A., and Chipuk, J.E. (2016). Physiological and Pharmacological Control of BAK, BAX, and Beyond. *Trends Cell Biol.* 26, 906–917.
- Lutter, M., Fang, M., Luo, X., Nishijima, M., Xie, X., and Wang, X. (2000). Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat. Cell Biol.* 2, 754–761.
- Mabuchi, S., Kuroda, H., Takahashi, R., and Sasano, T. (2015). The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 137, 173–179.

- Mahner, S., Trillsch, F., Chi, D., Harter, P., Pfisterer, J., Hilpert, F., Burges, A., Weissenbacher, T., and du Bois, A. (2016). Neoadjuvant chemotherapy in ovarian cancer revisited. *Ann. Oncol.* 27, i30–i32.
- Maiuri, M.C., Criollo, A., Tasdemir, E., Vicencio, J.M., Tajeddine, N., Hickman, J.A., Geneste, O., and Kroemer, G. (2007). BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy* 3, 374–376.
- Maj, E., Papiernik, D., and Wietrzyk, J. (2016). Antiangiogenic cancer treatment: The great discovery and greater complexity (Review). *Int. J. Oncol.* 49, 1773.
- Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* 129, 1261.
- Mano, Y., Kikuchi, Y., Yamamoto, K., Kita, T., Hirata, J., Tode, T., Ishii, K., and Nagata, I. (1999). Bcl-2 as a predictor of chemosensitivity and prognosis in primary epithelial ovarian cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 35, 1214–1219.
- Markman, M., Reichman, B., Hakes, T., Curtin, J., Jones, W., Lewis, J.L., Barakat, R., Rubin, S., Mychalczak, B., and Saigo, P. (1993). Intraperitoneal chemotherapy in the management of ovarian cancer. *Cancer* 71, 1565–1570.
- Markman, M., Liu, P.Y., Wilczynski, S., Monk, B., Copeland, L.J., Alvarez, R.D., Jiang, C., Alberts, D., Southwest Oncology Group, and Gynecologic Oncology Group (2003). Phase III randomized trial of 12 versus 3 months of maintenance paclitaxel in patients with advanced ovarian cancer after complete response to platinum and paclitaxel-based chemotherapy: a Southwest Oncology Group and Gynecologic Oncology Group trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 21, 2460–2465.
- Marone, M., Scambia, G., Mozzetti, S., Ferrandina, G., Iacovella, S., De Pasqua, A., Benedetti-Panici, P., and Mancuso, S. (1998). bcl-2, bax, bcl-XL, and bcl-XS expression in normal and neoplastic ovarian tissues. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 4, 517–524.
- Marquez, R.T. (2005). Patterns of Gene Expression in Different Histotypes of Epithelial Ovarian Cancer Correlate with Those in Normal Fallopian Tube, Endometrium, and Colon. *Clin. Cancer Res.* 11, 6116–6126.
- Martinou, J.C. (1999). Apoptosis. Key to the mitochondrial gate. *Nature* 399, 411–412.
- Mason, K.D., Carpinelli, M.R., Fletcher, J.I., Collinge, J.E., Hilton, A.A., Ellis, S., Kelly, P.N., Ekert, P.G., Metcalf, D., Roberts, A.W., et al. (2007). Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell* 128, 1173–1186.
- McDonnell, J.M., Fushman, D., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., and Cowburn, D. (1999). Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell* 96, 625–634.
- Mei, Y., Du, W., Yang, Y., and Wu, M. (2005). Puma(*)Mcl-1 interaction is not sufficient to prevent rapid degradation of Mcl-1. *Oncogene* 24, 7224–7237.
- Meng, Y., Tang, W., Dai, Y., Wu, X., Liu, M., Ji, Q., Ji, M., Pienta, K., Lawrence, T., and Xu, L. (2008). Natural BH3 mimetic (-)-gossypol chemosensitizes human prostate cancer via Bcl-xL inhibition accompanied by increase of Puma and Noxa. *Mol. Cancer Ther.* 7, 2192–2202.
- Mérino, D., Giam, M., Hughes, P.D., Siggs, O.M., Heger, K., O'Reilly, L.A., Adams, J.M., Strasser, A., Lee, E.F., Fairlie, W.D., et al. (2009). The role of BH3-only protein Bim extends beyond inhibiting Bcl-2-like prosurvival proteins. *J. Cell Biol.* 186, 355–362.

- Merino, D., Whittle, J.R., Vaillant, F., Serrano, A., Gong, J.-N., Giner, G., Maragno, A.L., Chanrion, M., Schneider, E., Pal, B., et al. (2017). Synergistic action of the MCL-1 inhibitor S63845 with current therapies in preclinical models of triple-negative and HER2-amplified breast cancer. *Sci. Transl. Med.* 9, eaam7049.
- Micheau, O., Shirley, S., and Dufour, F. (2013). Death receptors as targets in cancer. *Br. J. Pharmacol.* 169, 1723–1744.
- Michels, J., O'Neill, J.W., Dallman, C.L., Mouzakiti, A., Habens, F., Brimmell, M., Zhang, K.Y., Craig, R.W., Marcusson, E.G., Johnson, P.W., et al. (2004). Mcl-1 is required for Akata6 B-lymphoma cell survival and is converted to a cell death molecule by efficient caspase-mediated cleavage. *Oncogene* 23, 4818–4827.
- Mikhailov, V., Mikhailova, M., Degenhardt, K., Venkatachalam, M.A., White, E., and Saikumar, P. (2003). Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* 278, 5367–5376.
- Milani, M., Byrne, D.P., Greaves, G., Butterworth, M., Cohen, G.M., Evers, P.A., and Varadarajan, S. (2017). DRP-1 is required for BH3 mimetic-mediated mitochondrial fragmentation and apoptosis. *Cell Death Dis.* 8, e2552.
- Millimaggi, D., Mari, M., D'Ascenzo, S., Giusti, I., Pavan, A., and Dolo, V. (2009). Vasculogenic mimicry of human ovarian cancer cells: role of CD147. *Int. J. Oncol.* 35, 1423–1428.
- Mojsa, B., Lassot, I., and Desagher, S. (2014). Mcl-1 Ubiquitination: Unique Regulation of an Essential Survival Protein. *Cells* 3, 418–437.
- Moldoveanu, T., Liu, Q., Tocilj, A., Watson, M., Shore, G., and Gehring, K. (2006). The X-ray structure of a BAK homodimer reveals an inhibitory zinc binding site. *Mol. Cell* 24, 677–688.
- Monk, B.J., Herzog, T.J., Kaye, S.B., Krasner, C.N., Vermorken, J.B., Muggia, F.M., Pujade-Lauraine, E., Lisysanskaya, A.S., Makhson, A.N., Rolski, J., et al. (2010). Trabectedin Plus Pegylated Liposomal Doxorubicin in Recurrent Ovarian Cancer. *J. Clin. Oncol.* 28, 3107–3114.
- Morrison, J.C., Blanco, L.Z., Vang, R., and Ronnett, B.M. (2015). Incidental serous tubal intraepithelial carcinoma and early invasive serous carcinoma in the nonprophylactic setting: analysis of a case series. *Am. J. Surg. Pathol.* 39, 442–453.
- Mott, J.L., Kobayashi, S., Bronk, S.F., and Gores, G.J. (2007). mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene* 26, 6133–6140.
- Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.-L., et al. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, 335–341.
- Müllauer, L., Gruber, P., Seibinger, D., Buch, J., Wohlfart, S., and Chott, A. (2001). Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 488, 211–231.
- Mutch, D.G., and Prat, J. (2014). 2014 FIGO staging for ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer. *Gynecol. Oncol.* 133, 401–404.
- Nagane, M., Levitzki, A., Gazit, A., Cavenee, W.K., and Huang, H.J. (1998). Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 5724–5729.

Nagata, S., Hanayama, R., and Kawane, K. (2010). Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells. *Cell* 140, 619–630.

Nishioka, C., Ikezoe, T., Yang, J., and Yokoyama, A. (2010). Inhibition of MEK/ERK signaling induces apoptosis of acute myelogenous leukemia cells via inhibition of eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 and down-regulation of Mcl-1. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 15, 795–804.

Norbury, C.J., and Hickson, I.D. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 367–401.

O'Brien, S.M., Claxton, D.F., Crump, M., Faderl, S., Kipps, T., Keating, M.J., Viallet, J., and Cheson, B.D. (2009). Phase I study of obatoclax mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 113, 299–305.

Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053–1058.

Oh, K.J., Singh, P., Lee, K., Foss, K., Lee, S., Park, M., Lee, S., Aluvila, S., Park, M., Singh, P., et al. (2010). Conformational Changes in BAK, a Pore-forming Proapoptotic Bcl-2 Family Member, upon Membrane Insertion and Direct Evidence for the Existence of BH3-BH3 Contact Interface in BAK Homo-oligomers. *J. Biol. Chem.* 285, 28924.

Okamoto, T., Zobel, K., Fedorova, A., Quan, C., Yang, H., Fairbrother, W.J., Huang, D.C.S., Smith, B.J., Deshayes, K., and Czabotar, P.E. (2013). Stabilizing the pro-apoptotic BimBH3 helix (BimSAHB) does not necessarily enhance affinity or biological activity. *ACS Chem. Biol.* 8, 297–302.

Olie, R.A., Hall, J., Natt, F., Stahel, R.A., and Zangemeister-Wittke, U. (2002). Analysis of ribosyl-modified, mixed backbone analogs of a bcl-2/bcl-xL antisense oligonucleotide. *Biochim. Biophys. Acta* 1576, 101–109.

Oliver, C.L., Bauer, J.A., Wolter, K.G., Ubell, M.L., Narayan, A., O'Connell, K.M., Fisher, S.G., Wang, S., Wu, X., Ji, M., et al. (2004). In vitro effects of the BH3 mimetic, (-)-gossypol, on head and neck squamous cell carcinoma cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10, 7757–7763.

Oltersdorf, T., Elmore, S.W., Shoemaker, A.R., Armstrong, R.C., Augeri, D.J., Belli, B.A., Bruncko, M., Deckwerth, T.L., Dinges, J., Hajduk, P.J., et al. (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 435, 677–681.

Opferman, J.T., Iwasaki, H., Ong, C.C., Suh, H., Mizuno, S., Akashi, K., and Korsmeyer, S.J. (2005). Obligate Role of Anti-Apoptotic MCL-1 in the Survival of Hematopoietic Stem Cells. *Science* 307, 1101–1104.

Osaki, S., Tazawa, H., Hasei, J., Yamakawa, Y., Omori, T., Sugiu, K., Komatsubara, T., Fujiwara, T., Sasaki, T., Kunisada, T., et al. (2016). Ablation of MCL1 expression by virally induced microRNA-29 reverses chemoresistance in human osteosarcomas. *Sci. Rep.* 6, 28953.

Oza, A.M., Cibula, D., Benzaquen, A.O., Poole, C., Mathijssen, R.H.J., Sonke, G.S., Colombo, N., Špaček, J., Vuylsteke, P., Hirte, H., et al. (2015). Olaparib combined with chemotherapy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 16, 87–97.

Ozols, R.F., Bundy, B.N., Greer, B.E., Fowler, J.M., Clarke-Pearson, D., Burger, R.A., Mannel, R.S., DeGeest, K., Hartenbach, E.M., Baergen, R., et al. (2003). Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 21, 3194–3200.

Paik, P.K., Rudin, C.M., Brown, A., Rizvi, N.A., Takebe, N., Travis, W., James, L., Ginsberg, M.S., Juergens, R., Markus, S., et al. (2010). A phase I study of obatoclox mesylate, a Bcl-2 antagonist, plus topotecan in solid tumor malignancies. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 66, 1079–1085.

Pandey, M.K., Gowda, K., Doi, K., Sharma, A.K., Wang, H.-G., and Amin, S. (2013). Proteasomal degradation of Mcl-1 by maritoclox induces apoptosis and enhances the efficacy of ABT-737 in melanoma cells. *PloS One* 8, e78570.

Papa, A., Caruso, D., Strudel, M., Tomao, S., and Tomao, F. (2016). Update on Poly-ADP-ribose polymerase inhibition for ovarian cancer treatment. *J. Transl. Med.* 14.

Parikh, A., Gopalakrishnan, S., Freise, K.J., Verdugo, M.E., Menon, R.M., Mensing, S., and Salem, A.H. (2017). Exposure-response evaluations of venetoclax efficacy and safety in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 1–9.

Pecorelli, S., Favalli, G., Gadducci, A., Katsaros, D., Panici, P.B., Carpi, A., Scambia, G., Ballardini, M., Nanni, O., Conte, P., et al. (2009). Phase III trial of observation versus six courses of paclitaxel in patients with advanced epithelial ovarian cancer in complete response after six courses of paclitaxel/platinum-based chemotherapy: final results of the After-6 protocol 1. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 4642–4648.

Peperzak, V., Vikström, I., Walker, J., Glaser, S.P., LePage, M., Coquery, C.M., Erickson, L.D., Fairfax, K., Mackay, F., Strasser, A., et al. (2013). Mcl-1 is essential for the survival of plasma cells. *Nat. Immunol.* 14, 290–297.

Perciavalle, R.M., Stewart, D.P., Koss, B., Lynch, J., Milasta, S., Bathina, M., Temirov, J., Cleland, M.M., Pelletier, S., Schuetz, J.D., et al. (2012). Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration. *Nat. Cell Biol.* 14, 575–583.

Pérez-Galán, P., Roué, G., López-Guerra, M., Nguyen, M., Villamor, N., Montserrat, E., Shore, G.C., Campo, E., and Colomer, D. (2008). BCL-2 phosphorylation modulates sensitivity to the BH3 mimetic GX15-070 (Obatoclox) and reduces its synergistic interaction with bortezomib in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 22, 1712–1720.

Perren, T.J., Swart, A.M., Pfisterer, J., Ledermann, J.A., Pujade-Lauraine, E., Kristensen, G., Carey, M.S., Beale, P., Cervantes, A., Kurzeder, C., et al. (2011). A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 365, 2484–2496.

Pervin, S., Tran, A., Tran, L., Urman, R., Braga, M., Chaudhuri, G., and Singh, R. (2011). Reduced association of anti-apoptotic protein Mcl-1 with E3 ligase Mule increases the stability of Mcl-1 in breast cancer cells. *Br. J. Cancer* 105, 428.

Peterson-Kaufman, K.J., Haase, H.S., Boersma, M.D., Lee, E.F., Fairlie, W.D., and Gellman, S.H. (2015). Residue-Based Preorganization of BH3-Derived α/β -Peptides: Modulating Affinity, Selectivity and Proteolytic Susceptibility in α -Helix Mimics. *ACS Chem. Biol.* 10, 1667–1675.

Pétigny-Lechartier, C., Duboc, C., Jebahi, A., Louis, M.-H., Abeillard, E., Denoyelle, C., Gauduchon, P., Poulain, L., and Villedieu, M. (2017). The mTORC1/2 Inhibitor AZD8055 Strengthens the Efficiency of the MEK Inhibitor Trametinib to Reduce the Mcl-1/[Bim and Puma] ratio and to Sensitize Ovarian Carcinoma Cells to ABT-737. *Mol. Cancer Ther.* 16, 102–115.

Petros, A.M., Nettesheim, D.G., Wang, Y., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., Mack, J., Swift, K., Matayoshi, E.D., Zhang, H., Thompson, C.B., et al. (2000). Rationale for Bcl-xL/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 9, 2528.

- Petros, A.M., Medek, A., Nettesheim, D.G., Kim, D.H., Yoon, H.S., Swift, K., Matayoshi, E.D., Oltersdorf, T., and Fesik, S.W. (2001). Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3012.
- Petros, A.M., Olejniczak, E.T., and Fesik, S.W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1644, 83–94.
- Petros, A.M., Swann, S.L., Song, D., Swinger, K., Park, C., Zhang, H., Wendt, M.D., Kunzer, A.R., Souers, A.J., and Sun, C. (2014). Fragment-based discovery of potent inhibitors of the anti-apoptotic MCL-1 protein. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 1484–1488.
- Piek, J.M.J., Verheijen, R.H.M., Kenemans, P., Massuger, L.F., Bulten, H., and van Diest, P.J. (2003). BRCA1/2-related ovarian cancers are of tubal origin: a hypothesis. *Gynecol. Oncol.* 90, 491.
- Pignata, S., Scambia, G., Katsaros, D., Gallo, C., Pujade-Lauraine, E., De Placido, S., Bologna, A., Weber, B., Raspagliesi, F., Panici, P.B., et al. (2014). Carboplatin plus paclitaxel once a week versus every 3 weeks in patients with advanced ovarian cancer (MITO-7): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 15, 396–405.
- Pihán, P., Carreras-Sureda, A., and Hetz, C. (2017). BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise. *Cell Death Differ.* 24, 1478–1487.
- Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E., and Rizzuto, R. (2008). Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca^{2+} transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* 27, 6407–6418.
- Plancoulaine, B., Laurinaviciene, A., Herlin, P., Besusparis, J., Meskauskas, R., Baltrusaityte, I., Iqbal, Y., and Laurinavicius, A. (2015). A methodology for comprehensive breast cancer Ki67 labeling index with intra-tumor heterogeneity appraisal based on hexagonal tiling of digital image analysis data. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.*
- Poulain, L., Lincet, H., Duigou, F., Deslandes, E., Sichel, F., Gauduchon, P., and Staedel, C. (1998). Acquisition of chemoresistance in a human ovarian carcinoma cell is linked to a defect in cell cycle control. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 78, 454–463.
- Poveda, A.M., Selle, F., Hilpert, F., Reuss, A., Savarese, A., Vergote, I., Witteveen, P., Bamias, A., Scotto, N., Mitchell, L., et al. (2015). Bevacizumab Combined With Weekly Paclitaxel, Pegylated Liposomal Doxorubicin, or Topotecan in Platinum-Resistant Recurrent Ovarian Cancer: Analysis by Chemotherapy Cohort of the Randomized Phase III AURELIA Trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 33, 3836–3838.
- Prat, J. (2012). Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch.* 460, 237–249.
- Prat, J. (2014). Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 124, 1–5.
- Proskuryakov, S.Y. a, Konoplyannikov, A.G., and Gabai, V.L. (2003). Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp. Cell Res.* 283, 1–16.
- Pujade-Lauraine, E., Hilpert, F., Weber, B., Reuss, A., Poveda, A., Kristensen, G., Sorio, R., Vergote, I., Witteveen, P., Bamias, A., et al. (2014). Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: The AURELIA open-label randomized phase III trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 32, 1302–1308.

- Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M., and Strasser, A. (1999). The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol. Cell* 3, 287–296.
- Puthier, D., Bataille, R., and Amiot, M. (1999). IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK / STAT rather than ras / MAP kinase pathway. *Eur. J. Immunol.* 29, 3945–3950.
- Qi, B., and Hardwick, J.M. (2007). A Bcl-xL timer sets platelet life span. *Cell* 128, 1035–1036.
- Quentmeier, H., Drexler, H.G., Hauer, V., MacLeod, R.A.F., Pommerenke, C., Uphoff, C.C., Zaborski, M., Berglund, M., Enblad, G., and Amini, R.-M. (2016). Diffuse Large B Cell Lymphoma Cell Line U-2946: Model for MCL1 Inhibitor Testing. *PLoS ONE* 11.
- Rahmani, M., Aust, M.M., Attkisson, E., Williams, D.C., Ferreira-Gonzalez, A., and Grant, S. (2013). Dual inhibition of Bcl-2 and Bcl-xL strikingly enhances PI3K inhibition-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells through a GSK3- and Bim-dependent mechanism. *Cancer Res.* 73, 1340–1351.
- Rajan, S., Choi, M., Baek, K., and Yoon, H.S. (2015). Bh3 induced conformational changes in Bcl-XL revealed by crystal structure and comparative analysis. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 83, 1262–1272.
- Rao, Y., Shi, H., Ji, M., and Chen, C. (2013). MiR-106a targets Mcl-1 to suppress cisplatin resistance of ovarian cancer A2780 cells. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci. Hua Zhong Ke Ji Xue Xue Bao Yi Xue Ying Wen Ban Huazhong Keji Daxue Xuebao Yixue Yingdewen Ban* 33, 567–572.
- Ready, N., Karaseva, N.A., Orlov, S.V., Luft, A.V., Popovych, O., Holmlund, J.T., Wood, B.A., and Leopold, L. (2011). Double-blind, placebo-controlled, randomized phase 2 study of the proapoptotic agent AT-101 plus docetaxel, in second-line non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 6, 781–785.
- Reed, J.C. (2006). Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ.* 13, 1378–1386.
- Renault, T.T., Floros, K.V., Elkholi, R., Corrigan, K.-A., Kushnareva, Y., Wieder, S.Y., Lindtner, C., Serasinghe, M.N., Ascioia, J.J., Buettner, C., et al. (2015). Outer mitochondrial membrane shape engages BAX α 9 to initiate mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Mol. Cell* 57, 69–82.
- Romero, I., and Bast, R.C. (2012). Minireview: Human Ovarian Cancer: Biology, Current Management, and Paths to Personalizing Therapy. *Endocrinology* 153, 1593–1602.
- Roy, M.J., Vom, A., Czabotar, P.E., and Lessene, G. (2014). Cell death and the mitochondria: therapeutic targeting of the BCL-2 family-driven pathway. *Br. J. Pharmacol.* 171, 1973–1987.
- Safa, A.R. (2013). Roles of c-FLIP in Apoptosis, Necroptosis, and Autophagy. *J. Carcinog. Mutagen. Suppl* 6.
- Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Eberstadt, M., Yoon, H.S., Shuker, S.B., Chang, B.S., Minn, A.J., et al. (1997). Structure of Bcl-xL-Bak Peptide Complex: Recognition Between Regulators of Apoptosis. *Science* 275, 983–986.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274, 1541–1548.

- Schaffer, S.W., Croft, C.B., and Solodushko, V. (2000). Cardioprotective effect of chronic hyperglycemia: effect on hypoxia-induced apoptosis and necrosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278, H1948-1954.
- Schilling, U., Friedrich, E.A., Sinn, H., Schrenk, H.H., Clorius, J.H., and Maier-Borst, W. (1992). Design of compounds having enhanced tumour uptake, using serum albumin as a carrier--Part II. In vivo studies. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B* 19, 685–695.
- Schmid, B.C., and Oehler, M.K. (2015). Improvements in progression-free and overall survival due to the use of anti-angiogenic agents in gynecologic cancers. *Curr. Treat. Options Oncol.* 16, 318.
- Schwickart, M., Huang, X., Lill, J.R., Liu, J., Ferrando, R., French, D.M., Maecker, H., O'Rourke, K., Bazan, F., Eastham-Anderson, J., et al. (2010). Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature* 463, 103–107.
- Seymour, J.F., Ma, S., Brander, D.M., Choi, M.Y., Barrientos, J., Davids, M.S., Anderson, M.A., Beaven, A.W., Rosen, S.T., Tam, C.S., et al. (2017). Venetoclax plus rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia: a phase 1b study. *Lancet Oncol.* 18, 230–240.
- Shafi, O. (2016). Inverse relationship between Alzheimer's disease and cancer, and other factors contributing to Alzheimer's disease: a systematic review. *BMC Neurol.* 16, 236.
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., and Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.* 22, 526.
- Shamas-Din, A., Brahmabhatt, H., Leber, B., and Andrews, D.W. (2011). BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 508–520.
- Shamas-Din, A., Bindner, S., Zhu, W., Zaltsman, Y., Campbell, C., Gross, A., Leber, B., Andrews, D.W., and Fradin, C. (2013). tBid undergoes multiple conformational changes at the membrane required for Bax activation. *J. Biol. Chem.* 288, 22111–22127.
- Shao, L., Yu, S., Ji, W., Li, H., and Gao, Y. (2017). The Contribution of Necroptosis in Neurodegenerative Diseases. *Neurochem. Res.* 1–10.
- Sheridan, C., Delivani, P., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Bax- or Bak-Induced Mitochondrial Fission Can Be Uncoupled from Cytochrome c Release. *Mol. Cell* 31, 570–585.
- Shigemasa, K., Katoh, O., Shiroyama, Y., Mihara, S., Mukai, K., Nagai, N., and Ohama, K. (2002). Increased MCL-1 expression is associated with poor prognosis in ovarian carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* 93, 542–550.
- Shih, I.-M., and Kurman, R.J. (2004). Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am. J. Pathol.* 164, 1511–1518.
- Shoemaker, A.R., Mitten, M.J., Adickes, J., Ackler, S., Refici, M., Ferguson, D., Oleksijew, A., O'Connor, J.M., Wang, B., Frost, D.J., et al. (2008). Activity of the Bcl-2 family inhibitor ABT-263 in a panel of small cell lung cancer xenograft models. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 3268–3277.
- Shoshan-Barmatz, V., Ben-Hail, D., Admoni, L., Krelin, Y., and Tripathi, S.S. (2015). The mitochondrial voltage-dependent anion channel 1 in tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1848, 2547–2575.
- Simonin, K., Brotin, E., Dufort, S., Dutoit, S., Goux, D., N'Diaye, M., Denoyelle, C., Gauduchon, P., and Poulain, L. (2009). Mcl-1 is an important determinant of the apoptotic response to the BH3-

mimetic molecule HA14-1 in cisplatin-resistant ovarian carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.* 8, 3162–3170.

Simonin, K., N'Diaye, M., Lheureux, S., Loussouarn, C., Dutoit, S., Briand, M., Giffard, F., Brotin, E., Blanc-Fournier, C., and Poulain, L. (2013). Platinum compounds sensitize ovarian carcinoma cells to ABT-737 by modulation of the Mcl-1/Noxa axis. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 18, 492–508.

Smith, B.J., Lee, E.F., Checco, J.W., Evangelista, M., Gellman, S.H., and Fairlie, W.D. (2013). Structure-guided rational design of α/β -peptide foldamers with high affinity for BCL-2 family prosurvival proteins. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 14, 1564–1572.

Smoot, R.L., Blechacz, B.R.A., Werneburg, N.W., Bronk, S.F., Sinicrope, F.A., Sirica, A.E., and Gores, G.J. (2010). A Bax-mediated mechanism for obatoclax-induced apoptosis of cholangiocarcinoma cells. *Cancer Res.* 70, 1960–1969.

Song, L., Coppola, D., Livingston, S., Cress, D., and Haura, E.B. (2005). Mcl-1 regulates survival and sensitivity to diverse apoptotic stimuli in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* 4, 267–276.

Song, T., Chang, X., Zhang, Z., Liu, Y., and Shen, X. (2012). S1, a Novel Pan-BH3 Mimetic, Induces Apoptosis in Mcl-1-Overexpressing Cells Through Bak. *J. Pharmacol. Sci.* 119, 330–340.

Song, T., Xue, Z., Zhang, Z., Shen, X., and Li, X. (2013). Pan-BH3 Mimetic S1 Exhibits Broad-Spectrum Antitumour Effects by Cooperation between Bax and Bak. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 113, 145–151.

Song, T., Chai, G., Liu, Y., Yu, X., Wang, Z., and Zhang, Z. (2016). Bcl-2 phosphorylation confers resistance on chronic lymphocytic leukaemia cells to the BH3 mimetics ABT-737, ABT-263 and ABT-199 by impeding direct binding. *Br. J. Pharmacol.* 173, 471–483.

Souers, A.J., Levenson, J.D., Boghaert, E.R., Ackler, S.L., Catron, N.D., Chen, J., Dayton, B.D., Ding, H., Enschede, S.H., Fairbrother, W.J., et al. (2013). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* 19, 202–208.

Sparreboom, A., Scripture, C.D., Trieu, V., Williams, P.J., De, T., Yang, A., Beals, B., Figg, W.D., Hawkins, M., and Desai, N. (2005). Comparative preclinical and clinical pharmacokinetics of a cremophor-free, nanoparticle albumin-bound paclitaxel (ABI-007) and paclitaxel formulated in Cremophor (Taxol). *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 4136–4143.

Stamelos, V.A., Robinson, E., Redman, C.W., and Richardson, A. (2013). Navitoclax augments the activity of carboplatin and paclitaxel combinations in ovarian cancer cells. *Gynecol. Oncol.* 128, 377–382.

Stehle, G., Sinn, H., Wunder, A., Schrenk, H.H., Stewart, J.C., Hartung, G., Maier-Borst, W., and Heene, D.L. (1997). Plasma protein (albumin) catabolism by the tumor itself--implications for tumor metabolism and the genesis of cachexia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 26, 77–100.

Stewart, M.L., Fire, E., Keating, A.E., and Walensky, L.D. (2010). The MCL-1 BH3 helix is an exclusive MCL-1 inhibitor and apoptosis sensitizer. *Nat. Chem. Biol.* 6, 595–601.

Sundararajan, R., Cuconati, A., Nelson, D., and White, E. (2001). Tumor necrosis factor- α induces Bax-Bak interaction and apoptosis, which is inhibited by adenovirus E1B 19K. *J. Biol. Chem.* 276, 45120–45127.

- Susnow, N., Zeng, L., Margineantu, D., and Hockenbery, D.M. (2009). Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress. *Semin. Cancer Biol.* *19*, 42–49.
- Suzuki, M., Youle, R.J., and Tjandra, N. (2000). Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* *103*, 645–654.
- Tahir, S.K., Smith, M.L., Hessler, P., Rapp, L.R., Idler, K.B., Park, C.H., Levenson, J.D., and Lam, L.T. (2017). Potential mechanisms of resistance to venetoclax and strategies to circumvent it. *BMC Cancer* *17*.
- Takekuma, M., Wong, K.K., and Coleman, R.L. (2016). A long-term surviving patient with recurrent low-grade serous ovarian carcinoma treated with the MEK1/2 inhibitor, selumetinib. *Gynecol. Oncol. Res. Pract.* *3*, 5.
- Tao, Z.-F., Hasvold, L., Wang, L., Wang, X., Petros, A.M., Park, C.H., Boghaert, E.R., Catron, N.D., Chen, J., Colman, P.M., et al. (2014). Discovery of a Potent and Selective BCL-XL Inhibitor with in Vivo Activity. *ACS Med. Chem. Lett.* *5*, 1088–1093.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 231–241.
- Thallinger, C., Wolschek, M.F., Maierhofer, H., Skvara, H., Pehamberger, H., Monia, B.P., Jansen, B., Wacheck, V., and Selzer, E. (2004). Mcl-1 is a novel therapeutic target for human sarcoma: synergistic inhibition of human sarcoma xenotransplants by a combination of mcl-1 antisense oligonucleotides with low-dose cyclophosphamide. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *10*, 4185–4191.
- Thomas, L.W., Lam, C., and Edwards, S.W. (2010). Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett.* *584*, 2981–2989.
- Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* *267*, 1456–1462.
- Thorpe, L.M., Yuzugullu, H., and Zhao, J.J. (2015). PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation, and therapeutic targeting. *Nat. Rev. Cancer* *15*, 7.
- Tolcher, A.W., LoRusso, P., Arzt, J., Busman, T.A., Lian, G., Rudersdorf, N.S., Vanderwal, C.A., Kirschbrown, W., Holen, K.D., and Rosen, L.S. (2015). Safety, efficacy, and pharmacokinetics of navitoclax (ABT-263) in combination with erlotinib in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *76*, 1025–1032.
- Trudel, S., Li, Z.H., Rauw, J., Tiedemann, R.E., Wen, X.Y., and Stewart, A.K. (2007). Preclinical studies of the pan-Bcl inhibitor obatoclax (GX015-070) in multiple myeloma. *Blood* *109*, 5430–5438.
- Tse, C., Shoemaker, A.R., Adickes, J., Anderson, M.G., Chen, J., Jin, S., Johnson, E.F., Marsh, K.C., Mitten, M.J., Nimmer, P., et al. (2008). ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res.* *68*, 3421–3428.
- Tsujimoto, Y. (1997). [Regulation of cell death by Bcl-2 family]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* *42*, 1644–1648.
- Varadarajan, S., Vogler, M., Butterworth, M., Dinsdale, D., Walensky, L.D., and Cohen, G.M. (2013). Evaluation and critical assessment of putative MCL-1 inhibitors. *Cell Death Differ.* *20*, 1475–1484.
- Varadarajan, S., Poornima, P., Milani, M., Gowda, K., Amin, S., Wang, H.-G., and Cohen, G.M. (2015). Maritoclax and dinaciclib inhibit MCL-1 activity and induce apoptosis in both a MCL-1-dependent and -independent manner. *Oncotarget* *6*, 12668.

- Veis, D.J., Sentman, C.L., Bach, E.A., and Korsmeyer, S.J. (1993). Expression of the Bcl-2 protein in murine and human thymocytes and in peripheral T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *151*, 2546–2554.
- Vergote, I., Tropé, C.G., Amant, F., Kristensen, G.B., Ehlen, T., Johnson, N., Verheijen, R.H.M., van der Burg, M.E.L., Lacave, A.J., Panici, P.B., et al. (2010). Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIC or IV ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* *363*, 943–953.
- Verma, S., Zhao, L.J., and Chinnadurai, G. (2001). Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BIK: mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis. *J. Biol. Chem.* *276*, 4671–4676.
- Vervliet, T., Parys, J.B., and Bultynck, G. (2016). Bcl-2 proteins and calcium signaling: complexity beneath the surface. *Oncogene* *35*, 5079–5092.
- Vikstrom, I., Carotta, S., Lüthje, K., Peperzak, V., Jost, P.J., Glaser, S., Busslinger, M., Bouillet, P., Strasser, A., Nutt, S.L., et al. (2010). Mcl-1 is essential for germinal center formation and B cell memory. *Science* *330*, 1095–1099.
- Villedieu, M., Louis, M.-H., Dutoit, S., Brotin, E., Lincet, H., Duigou, F., Staedel, C., Gauduchon, P., and Poulain, L. (2007). Absence of Bcl-xL down-regulation in response to cisplatin is associated with chemoresistance in ovarian carcinoma cells. *Gynecol. Oncol.* *105*, 31–44.
- Villoutreix, B.O., Blom, A.M., Webb, J., and Dahlbäck, B. (1999). The complement regulator C4b-binding protein analyzed by molecular modeling, bioinformatics and computer-aided experimental design. *Immunopharmacology* *42*, 121–134.
- Vlahovic, G., Karantza, V., Wang, D., Cosgrove, D., Rudersdorf, N., Yang, J., Xiong, H., Busman, T., and Mabry, M. (2014). A phase I safety and pharmacokinetic study of ABT-263 in combination with carboplatin/paclitaxel in the treatment of patients with solid tumors. *Invest. New Drugs* *32*, 976–984.
- Walensky, L.D., Kung, A.L., Escher, I., Malia, T.J., Barbuto, S., Wright, R.D., Wagner, G., Verdine, G.L., and Korsmeyer, S.J. (2004). Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science* *305*, 1466–1470.
- Wang, G., Nikolovska-Coleska, Z., Yang, C.-Y., Wang, R., Tang, G., Guo, J., Shangary, S., Qiu, S., Gao, W., Yang, D., et al. (2006). Structure-based design of potent small-molecule inhibitors of anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *J. Med. Chem.* *49*, 6139–6142.
- Wang, J.M., Chao, J.R., Chen, W., Kuo, M.L., Yen, J.J., and Yang-Yen, H.F. (1999). The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 6195–6206.
- Wang, J.-M., Lai, M.-Z., and Yang-Yen, H.-F. (2003). Interleukin-3 stimulation of mcl-1 gene transcription involves activation of the PU.1 transcription factor through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 1896–1909.
- Warny, M., Keates, A.C., Keates, S., Castagliuolo, I., Zacks, J.K., Aboudola, S., Qamar, A., Pothoulakis, C., LaMont, J.T., and Kelly, C.P. (2000). p38 MAP kinase activation by *Clostridium difficile* toxin A mediates monocyte necrosis, IL-8 production, and enteritis. *J. Clin. Invest.* *105*, 1147–1156.
- Warr, M.R., Acoca, S., Liu, Z., Germain, M., Watson, M., Blanchette, M., Wing, S.S., and Shore, G.C. (2005). BH3-ligand regulates access of MCL-1 to its E3 ligase. *FEBS Lett.* *579*, 5603–5608.

- Watson, E.C., Whitehead, L., Adams, R.H., Dewson, G., and Coultas, L. (2016). Endothelial cell survival during angiogenesis requires the pro-survival protein MCL1. *Cell Death Differ.* 23, 1371–1379.
- Webber, K., and Friedlander, M. (2016). Chemotherapy for epithelial ovarian, fallopian tube and primary peritoneal cancer. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*
- Wei, J., Kitada, S., Stebbins, J.L., Placzek, W., Zhai, D., Wu, B., Rega, M.F., Zhang, Z., Cellitti, J., Yang, L., et al. (2010). Synthesis and biological evaluation of Apogossypolone derivatives as pan-active inhibitors of antiapoptotic B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) family proteins. *J. Med. Chem.* 53, 8000–8011.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727–730.
- Weng, C., Li, Y., Xu, D., Shi, Y., and Tang, H. (2005). Specific Cleavage of Mcl-1 by Caspase-3 in Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL)-induced Apoptosis in Jurkat Leukemia T Cells. *J. Biol. Chem.* 280, 10491–10500.
- Wertz, I.E., Kusam, S., Lam, C., Okamoto, T., Sandoval, W., Anderson, D.J., Helgason, E., Ernst, J.A., Eby, M., Liu, J., et al. (2011). Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature* 471, 110–114.
- Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P.E., and Kluck, R.M. (2011). Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1813, 521–531.
- Willems, L., Chapuis, N., Puissant, A., Maciel, T.T., Green, A.S., Jacque, N., Vignon, C., Park, S., Guichard, S., Herault, O., et al. (2012). The dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor AZD8055 has anti-tumor activity in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 26, 1195–1202.
- Williams, M.M., and Cook, R.S. (2015). Bcl-2 family proteins in breast development and cancer: could Mcl-1 targeting overcome therapeutic resistance? *Oncotarget* 6, 3519–3530.
- Willimott, S., and Wagner, S.D. (2010). Post-transcriptional and post-translational regulation of Bcl2. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 1571–1575.
- Willis, S.N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I., Adams, J.M., and Huang, D.C.S. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.* 19, 1294–1305.
- Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., et al. (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315, 856–859.
- Witham, J., Valenti, M.R., De-Haven-Brandon, A.K., Vidot, S., Eccles, S.A., Kaye, S.B., and Richardson, A. (2007). The Bcl-2/Bcl-XL family inhibitor ABT-737 sensitizes ovarian cancer cells to carboplatin. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 7191–7198.
- Wong, M., Tan, N., Zha, J., Peale, F.V., Yue, P., Fairbrother, W.J., and Belmont, L.D. (2012). Navitoclax (ABT-263) Reduces Bcl-xL-Mediated Chemoresistance in Ovarian Cancer Models. *Mol. Cancer Ther.* 11, 1026–1035.
- Xiao, Y., Nimmer, P., Sheppard, G.S., Bruncko, M., Hessler, P., Lu, X., Roberts-Rapp, L., Pappano, W.N., Elmore, S.W., Souers, A.J., et al. (2015). MCL-1 Is a Key Determinant of Breast Cancer Cell

Survival: Validation of MCL-1 Dependency Utilizing a Highly Selective Small Molecule Inhibitor. *Mol. Cancer Ther.* 14, 1837–1847.

Xu, L., Zhu, J., Hu, X., Zhu, H., Kim, H.T., LaBaer, J., Goldberg, A., and Yuan, J. (2007). c-IAP1 cooperates with Myc by acting as a ubiquitin ligase for Mad1. *Mol. Cell* 28, 914–922.

Yang, J.-Y., Zong, C.S., Xia, W., Yamaguchi, H., Ding, Q., Xie, X., Lang, J.-Y., Lai, C.-C., Chang, C.-J., Huang, W.-C., et al. (2008). ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nat. Cell Biol.* 10, 138–148.

Zang, C., Eucker, J., Liu, H., Müller, A., Possinger, K., and Scholz, C.W. (2013). Concurrent inhibition of PI3-kinase and mTOR induces cell death in diffuse large B cell lymphomas, a mechanism involving down regulation of Mcl-1. *Cancer Lett.* 339, 288–297.

Zeitlin, B.D., Joo, E., Dong, Z., Warner, K., Wang, G., Nikolovska-Coleska, Z., Wang, S., and Nör, J.E. (2006). Antiangiogenic Effect of TW37, a Small-Molecule Inhibitor of Bcl-2. *Cancer Res.* 66, 8698–8706.

Zha, H., Aimé-Sempé, C., Sato, T., and Reed, J.C. (1996). Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J. Biol. Chem.* 271, 7440–7444.

Zhai, D., Jin, C., Satterthwait, A.C., and Reed, J.C. (2006). Comparison of chemical inhibitors of antiapoptotic Bcl-2-family proteins. *Cell Death Differ.* 13, 1419–1421.

Zhang, L., Ming, L., and Yu, J. (2007). BH3 mimetics to improve cancer therapy; mechanisms and examples. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* 10, 207–217.

Zhang, X.-Q., Huang, X.-F., Hu, X.-B., Zhan, Y.-H., An, Q.-X., Yang, S.-M., Xia, A.-J., Yi, J., Chen, R., Mu, S.-J., et al. (2010). Apogossypolone, a novel inhibitor of antiapoptotic Bcl-2 family proteins, induces autophagy of PC-3 and LNCaP prostate cancer cells in vitro. *Asian J. Androl.* 12, 697.

Zhang, Z., Lapolla, S.M., Annis, M.G., Truscott, M., Roberts, G.J., Miao, Y., Shao, Y., Tan, C., Peng, J., Johnson, A.E., et al. (2004). Bcl-2 homodimerization involves two distinct binding surfaces, a topographic arrangement that provides an effective mechanism for Bcl-2 to capture activated Bax. *J. Biol. Chem.* 279, 43920–43928.

Zhang, Z., Song, T., Zhang, T., Gao, J., Wu, G., An, L., and Du, G. (2011). A novel BH3 mimetic S1 potently induces Bax/Bak-dependent apoptosis by targeting both Bcl-2 and Mcl-1. *Int. J. Cancer* 128, 1724–1735.

Zhang, Z., Liu, Y., Song, T., Xue, Z., Shen, X., Liang, F., Zhao, Y., Li, Z., and Sheng, H. (2013). An antiapoptotic Bcl-2 family protein index predicts the response of leukaemic cells to the pan-Bcl-2 inhibitor S1. *Br. J. Cancer* 108, 1870.

Zhao, B., Sensintaffar, J., Bian, Z., Belmar, J., Lee, T., Olejniczak, E.T., and Fesik, S.W. (2017). Structure of a Myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) inhibitor bound to drug site 3 of Human Serum Albumin. *Bioorg. Med. Chem.* 25, 3087–3092.

Zhou, H., Li, X.M., Meinkoth, J., and Pittman, R.N. (2000). Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J. Cell Biol.* 151, 483–494.

Résumé

Les cancers de l'ovaire demeurant particulièrement meurtriers du fait de leur capacité à développer une résistance aux chimiothérapies conventionnelles, il est donc indispensable de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques susceptibles de surmonter la chimiorésistance pour améliorer leur prise en charge. Les travaux antérieurs de l'Unité ont démontré que les protéines anti-apoptotiques Bcl-x_L et Mcl-1 coopèrent pour protéger les cellules cancéreuses ovariennes contre l'apoptose et que leur inhibition concomitante conduit à la mort des cellules chimiorésistantes. A ce jour, seuls les inhibiteurs de Bcl-x_L/Bcl-2 ont démontré une efficacité en clinique, en particulier l'ABT-263 (Navitoclax). En revanche, l'inhibition de Mcl-1 reste problématique dans un contexte clinique. La recherche d'outils pharmacologiques conduisant à l'inhibition ou à l'inactivation de Mcl-1, utilisables en clinique, reste donc un enjeu majeur, d'autant que cette protéine est désormais désignée comme une cible thérapeutique prioritaire dans de nombreuses localisations tumorales. C'est dans ce contexte que mon projet de thèse s'est inscrit, l'objectif étant d'identifier et d'évaluer de nouveaux inhibiteurs pharmacologiques de Mcl-1 synthétisés par des équipes de chimistes. Dans cette optique, mon projet de thèse s'est scindé en deux parties : Dans une première étude, je me suis attachée à cribler *in vitro* des molécules appartenant à différentes familles chimiques (Oligopyridines dérivées du Pyridoclax, « Lead » de la première génération des oligopyridines précédemment identifiées par notre équipe, ou analogues de MIM1) dans le but d'identifier de nouveaux inhibiteurs de Mcl-1 plus actifs que les molécules dont ils dérivent. Ce travail a permis d'identifier la MR31367, une molécule issue du Pyridoclax qui présente une activité pro-apoptotique plus forte que ce dernier sur plusieurs lignées tumorales ovariennes chimiorésistantes. Nous avons également pu mettre en évidence sur ces mêmes modèles que plusieurs molécules issues de MIM1 exhibaient une activité pro-apoptotique amplifiée. Cette étude nous a également permis de mettre en évidence une relation structure activité permettant de classer ces molécules en inhibiteurs spécifiques de Mcl-1 et « dual-inhibiteur » de Mcl-1 et Bcl-x_L. Dans une seconde étude, mon travail a consisté en l'évaluation préclinique du sel de Pyridoclax. Nous avons étudié l'effet de différentes doses de Pyridoclax administré par différentes voies d'administration, en agent seul ou en combinaison avec l'ABT-263 sur différents modèles tumoraux établis à partir des lignées chimiorésistantes de cancers ovariens. Nous avons ainsi pu mettre en évidence un effet anti-tumoral du Pyridoclax (20 mg/kg/j) administré par voie IV en agent seul sur des 2 modèles des 3 modèles de xénogreffes, et cela sans toxicité avérée. Ces résultats prometteurs ouvrent des perspectives intéressantes quant à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de Mcl-1 pour le traitement des cancers de l'ovaire.

Abstract

Ovarian cancer is the most leading cause of death from gynecologic malignancies because of its late diagnosis and its ability to develop chemoresistance to conventional therapies. It is now essential to develop new therapeutic strategies to overcome this chemoresistance and improve patient care. Our laboratory has demonstrated the overexpression of the Bcl-2 anti-apoptotic proteins Bcl-x_L and Mcl-1 and their cooperation to protect ovarian cancer cells from apoptosis. Currently, the clinically relevant pharmacologic inhibition of Bcl-x_L is available using ABT-263 (Navitoclax). However, selective direct Mcl-1 inhibition remained a challenge. This protein is one of the most important anti-apoptotic member which is expressed in multiple cancer types and is at the origin of the acquired resistance to chemotherapy and Bcl-2 family inhibitors (Navitoclax, Venetoclax). Thus, Mcl-1 inhibition represents a major challenge for the clinical success of the Bcl-2 family inhibitors. In this context, I was interested in identifying and evaluating new Mcl-1 inhibitors designed and synthesized by different chemistry research teams. My project was focused on two aspects. In the first part, we have evaluated the cytotoxic effect of different molecules derived from 2 Mcl-1 inhibitors, the Pyridoclax from the oligopyridine family and MIM1. The screening of 8 Noxa-mimetic molecules derived from Pyridoclax allowed us to identify MR31367, one of the most potent oligopyridine molecules that shows a stronger anti-apoptotic activity than Pyridoclax (15μM) and sensitizes different chemoresistant ovarian cancer cell lines (IGROV1-R10, SKOV-3 and A2780) to anti-Bcl-x_L strategies (ABT-737, siRNA). Furthermore, we have evaluated the pro-apoptotic activity of 14 MIM1 derivative molecules using the same cellular model. This study has demonstrated that most of these derivatives have greater pro-apoptotic activity than MIM1. We have also established the structure-activity relationship leading to classify these molecules as "Mcl-1 inhibitors" or as "dual inhibitors" of Mcl-1 and Bcl-x_L. The second part of my project was focused on the preclinical evaluation of Pyridoclax hydrochlorid. We have analyzed the antitumor activity of Pyridoclax hydrochlorid in several subcutaneous xenografts derived from human ovarian cancer cell lines (IGROV1-R10, SKOV-3 and A2780). Different routes of Pyridoclax hydrochlorid administration were tested (oral, IV and IT) and its antitumor effect was analyzed at different doses as single agent or in combination with ABT-263 (100mg/kg). This study highlighted an effective antitumor activity of 20mg/kg of Pyridoclax hydrochlorid administered intravenously as single agent in two of three xenograft models without any side effects. This results open up interesting perspectives for the clinical use of Mcl-1 inhibitors to improve the clinical management of ovarian cancer.
