

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté de Médecine

Ecole Doctorale Sciences Techniques Santé

Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire

N°

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biochimie et Biologie Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

Barbara AKLA

Née le 18 janvier 1977 à LILLE (Nord)

Le 14 Novembre 2003

Etude de deux stratégies de thérapie génique : le système
hsv1-tk/GCV et l'endostatine, sur un modèle animal de cancer
du sein humain

Directeur de Thèse : Monsieur le Professeur Michel RIGAUD

Jury

M. le Professeur Michel RIGAUD

M. le Professeur Dominique BÉLPOMME

M. le Professeur Yves-Jean BIGNON

Mme le Professeur Nicole TUBIANA-MATHIEU

M. le Professeur Jean-Claude VANDROUX

Directeur de Thèse

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Remerciements

A Monsieur le Professeur RIGAUD

Professeur des Universités de Biochimie et Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine de Limoges

Chef de service de Biochimie et Génétique Moléculaire, Chimie des explorations fonctionnelles, CHRU Limoges

Directeur de thèse

Je tiens à vous remercier pour m'avoir accueillie au sein de votre équipe de recherche. Votre soutien, votre disponibilité et vos conseils m'ont été d'une aide précieuse et m'ont permis de réaliser mon travail de thèse dans les meilleures conditions.

A Monsieur le Professeur BELPOMME

Professeur des Universités de Cancérologie, Université Paris V

Praticien Hospitalier de Cancérologie, Hôpital Européen Pompidou, Paris

Président de l'ARTAC

C'est un honneur pour moi que vous ayez accepté de juger mon travail et d'en être rapporteur.

Je vous remercie pour vos conseils et vos suggestions qui m'ont ouvert à d'autres perspectives.

Veillez accepter ici le témoignage de mon respect le plus sincère.

A Monsieur le Professeur BIGNON

Professeur des Universités de Biologie Cellulaire, Faculté des Sciences, Clermont-Ferrand
Chef de service de l'Unité d'Oncogénétique, Centre Jean Perin, Clermont-Ferrand

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger mon travail de thèse et d'en être rapporteur. Je vous suis reconnaissante pour le temps que vous avez consacré à la lecture de mon manuscrit et pour vos conseils qui m'ont été précieux. Je tiens à vous faire part ici de mes sincères respects et de toute ma reconnaissance.

A Madame le Professeur TUBIANA-MATHIEU

Professeur des Universités
Chef de Service d'Oncologie Médicale, CHRU, Limoges

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de participer à ce jury et d'en être l'examineur. Veuillez trouver ici le témoignage de ma respectueuse et sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur VANDROUX

Professeur des Universités de Biophysique et Traitement de l'Image, Faculté de Médecine de Limoges
Chef de Service de Médecine Nucléaire
CHRU de Limoges
Doyen de la Faculté de Médecine de Limoges

Je vous remercie d'avoir accepté de siéger dans ce jury et je vous suis reconnaissante de m'avoir permis de collaborer avec votre équipe.

Croyez à mon profond respect.

A Monsieur le Professeur STURTZ

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

Je tiens ici à vous remercier pour vos conseils et votre disponibilité. Votre soutien pendant cette dernière année m'a été précieux et m'a aidé dans l'accomplissement de ce travail.

A Madame le Maître de Conférences CHABLE-RABINOVITCH

Maître de Conférences des Universités,

Praticien Hospitalier de Biochimie, Faculté de Médecine, Limoges

Au cours de ces années passées au laboratoire, j'ai pu apprécier votre soutien et vos conseils. Je vous remercie pour votre gentillesse, pour l'aide scientifique et technique que vous m'avez apporté pendant quatre ans.

A Madame le Maître de Conférences COOK-MOREAU

Maître de Conférences des Universités d'Immunologie, Faculté de Médecine, Limoges

Je vous remercie d'avoir été aussi présente pour moi au cours de ces quatre années passées au laboratoire. Votre soutien aussi bien au niveau professionnel qu'au niveau personnel a été pour moi d'une grande importance.

A Monsieur le Docteur MONTEIL

Praticien Hospitalier de Médecine Nucléaire, CHRU, Limoges

Merci pour ton aide, ta disponibilité et pour les connaissances que tu as partagé avec moi. Tes conseils et nos discussions scientifiques m'ont été d'une grande utilité pour l'aboutissement de ce travail.

A Monsieur le Professeur PARAF

Praticien Hospitalier

Ta disponibilité et tes compétences ont été d'une aide précieuse dans la réalisation d'une partie de mon travail. Je te remercie pour ton aide.

A Monsieur le Docteur FIORENZA

Praticien Hospitalier de Chirurgie Orthopédique, CHRU, Limoges

Merci pour ta bonne humeur et ta disponibilité. Travailler avec toi a été un plaisir et bien souvent un moment de détente.

A Monsieur le Docteur GENET

Praticien Hospitalier d'Oncologie Médicale, CHRU, Limoges

Merci pour votre disponibilité et pour le temps que vous avez consacré à la lecture de mon manuscrit. Votre point de vue de praticien m'a beaucoup aidé au cours de ma rédaction.

A Mademoiselle Karine FAUCHER

Docteur de l'Université de Limoges

Assistante Hospitalo-Universitaire, CHRU, Limoges

Merci à toi d'avoir toujours été présente pour moi au cours de ces années au laboratoire. Nos discussions aussi bien d'ordre professionnel que d'ordre privé ont toujours été d'un grand soutien pour moi. Ton amitié et ta bonne humeur communicative font partie des raisons de ma réussite. Merci d'être telle que tu es. Je te souhaite tout le bonheur que tu mérites.

A Mademoiselle Guislaine BARRIERE

Docteur de l'Université de Limoges

Assistante Universitaire, Faculté de Médecine, Limoges

Merci pour ton aide, ta gentillesse et ta disponibilité. Tes relectures et tes conseils concernant mon manuscrit m'ont été d'un grand secours.

Je te souhaite un avenir à la hauteur de tes qualités.

A Mademoiselle Aurélie DUTOUR

Merci pour ta bonne humeur et ta gentillesse. J'espère que ton avenir sera à la hauteur de tes espérances.

A Monsieur Dany LECLERS

Merci pour ta bonne humeur et ta disponibilité. Je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse, et beaucoup de réussite.

A Hélène DZUGAN, Annette LABROUSSE, Marie-Hélène Pradeau et Stéphane CHARRET

Merci pour votre présence, votre gentillesse et votre écoute à mon égard pendant toutes ces années.

Je vous souhaite à tous beaucoup de bonheur et de réussite autant au niveau professionnel que personnel.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont, un moment ou à un autre travaillé au sein de cette équipe.

Résumé en français

Le cancer du sein est la première cause de mortalité par tumeur maligne chez la femme. Les thérapeutiques conventionnelles (radiothérapie, chimiothérapie et hormonothérapie) ont gagné en efficacité ces dernières années. Cependant même si les réponses aux traitements sont relativement bonnes pour les cancers dépistés et traités très tôt, le pronostic reste mauvais pour des cancers de stade avancé. Ceci est dû bien souvent à la présence de métastases. Le processus métastatique est lié à la néo-angiogenèse tumorale. Elle permet la formation de nouveaux vaisseaux sanguins nécessaires à l'irrigation de la tumeur au cours de sa croissance. Dans le cadre de la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques, visant le cancer du sein, nous nous sommes intéressés à deux stratégies de thérapie génique : l'une spécifique de l'angiogenèse, qui utilise l'endostatine un facteur anti-angiogénique endogène, l'autre utilisant le principe de transfert de gène de sensibilité avec le système hsv1-tk/GCV. La thymidine kinase est introduite dans les cellules d'adénocarcinome mammaire humain grâce à un plasmide recombinant contenant l'ADNc de l'hsv1-tk. Le plasmide recombinant est apporté aux cellules sous forme de liposomes cationiques, appelés lipoplexes. L'apport de GCV à de telles cellules a montré une faible efficacité du système hsv1-tk/GCV sur la lignée cellulaire étudiée. Les études *in vivo* ont été réalisées sur un modèle animal d'adénocarcinome mammaire humain, utilisant la même lignée cellulaire que celle décrite *in vitro*. Les injections par voie intraveineuse, de lipoplexes endostatine, ou de lipoplexes hsv1-tk suivi d'injections intrapéritonéales de GCV, ont donné des résultats similaires en terme de diminution des volumes tumoraux. Bien que cette régression tumorale ne soit pas totalement imputable à l'effet des gènes utilisés, nous avons observé diminution de l'ordre de 65% des volumes tumoraux des animaux traités par rapport aux animaux témoins.

Abstract

Studie of two gene therapy strategies : hsv1-tk/GCV system and endostatin, in an animal model of human breast cancer

Breast cancer is the first cause of mortality due to malignant tumors in women. Conventional therapy (radiotherapy, chemotherapy and hormonotherapy) have increased in effectiveness over the last years. However, even if responses to treatment are relatively effective for cancers detected and treated in the early stages, the prognosis remains poor for advanced stage cancers. This is often due to the presence of metastases. The metastatic process is linked to tumoral neoangiogenesis which creates new blood vessels necessary for tumor irrigation during its growth. In the field of developing new therapeutic strategies for breast cancer, we investigated two gene therapy methods : one specific for angiogenesis using an endogenous antiangiogenic molecule endostatin; the other using the principle of gene sensitivity with hsv1-tk/GCV system. Thymidine kinase was introduced into human mammary adenocarcinoma cells using a recombinant plasmid containing hsv1-tk cDNA. The recombinant plasmid was introduced into cells using cationic liposomes called lipoplexes. The addition of GCV to the cells was weakly effective with the system hsv1-tk/GCV for the cell line studied. *In vivo* studies were performed in an animal model of human mammary adenocarcinoma, using the same cell line as *in vitro*. Intravenous injections of endostatin lipoplexes or hsv1-tk lipoplexes followed by intraperitoneal GCV injections resulted in similar decreases in tumor volume. Even if tumor regression was not only due to the effect of genes used, a regression of around 65% of the volume compared to untreated animals.

Key words: breast cancer, gene therapy, hsv1-tk, GCV, endostatin.

LISTE DES ABBREVIATIONS

AAV : « adenoassociated virus » ; virus associé aux adénovirus
ABC : « ATP-binding cassette » ; cassette de liaison à l'ATP
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
AJCC : « American Joint Committee on cancer »
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messenger
ATP : adénosine triphosphate
BET : bromure d'éthidium
b-FGF : « basic-fibroblast growth factor » ; facteur de croissance des fibroblastes basique
BRCA : « breast cancer »
BSA : « bovin serum albumin » ; albumine sérique bovine
CD : cytosine désaminase
CDET : « coincidence detection emission tomography »
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CysA : cyclosporine A
dCTP : désoxycytosine triphosphate
DEPC : diéthylpyrocarbonate
dGTP : désoxyguanosine triphosphate
DITRISEC : « di-trinucleotide sticky end cloning »
DMEM : « Dulbecco's modified Eagle medium »
DMSO : diméthylsulfoxyde
dNTP : désoxynucléotide triphosphate
DO : densité optique
EDTA : « ethylen diamine tetraacetic acid » ; acide éthylène diamine tétraacétique
EGF : « epithelial growth factor » ; facteur de croissance épithélial
EGFR : « epithelial growth factor receptor » ; récepteur du facteur de croissance épithélial
ELISA : « enzym linked immunosorbent assay »
EMML :

ERE : « estrogen responsive element » ; élément de réponse aux œstrogènes
FC : fluorocytosine
FDG : fluoro-2-déoxyglucose
FU : fluorouracile
GCV : ganciclovir
GSH : glutathion réduit
HSV : « herpes simplex virus »
IGF : « insulin growth factor » ; facteur de croissance à insuline
IL : interleukine
ILGFR-1 : « type 1 insulin-like growth factor receptor »
INF- γ : interféron- γ
I.P : intrapéritonéal
I.V : intraveineux
LTR : « long terminal repeat »
LB : Luria Broth
MAD : « myc-associated protein D »
MAX : « myc-associated protein X »
MDR : «multi-drug resistance »; multi drogue resistance
MIBI : méthoxyisobutylisonitrile
MMLV: « Moloney murine leukemia virus »
MMP : matrix metalloproteinase
MRP : « multi drug resistance protein »
MTT : methyl thiazol tetrazolium
MTX : méthotrèxate
NBF : « nucleotide binding folds »; motifs de liaison aux nucléotides
NSCLC : « non-small cell lung cancer » ; cancer du poumon non à petites cellules
OMS : organisation mondiale de la santé
Pb : paire de base
PBS : « phosphate buffer saline »
PCR : « polymerase chain reaction », réaction de polymérisation en chaîne
PET : « positron emission tomography » ; tomographie par émission de positron
pRb: protéine du retinoblastoma
Rb: rétinoblastome

RE : récepteur aux œstrogènes
RNase : ribonucléase
RP : récepteur à la progestérone
RPM : rotation par minute
RPMI : « Roswell Park Memorial Institut »
RT : « reverse transcription », transcription inverse
SAI : sans autre indication
SVF : sérum de veau fœtal
TAE : tris-acétate-EDTA
TC : technetium
TGF- α : « tumor growth factor- α » ; facteur de croissance de tumeur- α
TGF- β : « tumor growth factor- β » ; facteur de croissance de tumeur- β
TMD : « transmembrane domain » ; domaine transmembranaire
TNF- α : « tumor necrosis factor- α » ; facteur nécrosant de tumeur- α
TNM : tumeur-ganglion-métastase
TK : thymidine kinase
UICC : Union internationale contre le cancer
UTR : « untranslated region »
UV : ultra violet
VEGF : « vascular endothelial growth factor » ; facteur de croissance endothelial vasculaire

Table des matières

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| INTRODUCTION..... | 20 |
| Première partie NOTIONS BIBLIOGRAPHIQUES | 23 |
| I. Cancer du sein..... | 24 |
| I.1. Développement du sein normal et mécanismes de déclenchement tumoral..... | 24 |
| I.2. Epidémiologie - Facteurs de risque - Classifications..... | 36 |
| I.3. Stratégies thérapeutiques | 43 |
| I.4. Cancer du sein et chimiorésistance | 45 |
| II. Thérapie génique | 53 |
| II.1. Vecteurs de la thérapie génique..... | 53 |
| II.2. Différentes stratégies de la thérapie génique..... | 58 |
| II.3. Thérapie génique et essais cliniques..... | 64 |
| Deuxième partie MATERIELS ET METHODES | 68 |
| I. Construction du plasmide pcDNA-tk | 69 |
| I.1. Amplification du gène de la thymidine kinase à partir du plasmide pLJ-tk | 69 |
| I.2. Clonage DiTrisec du gène tk dans le plasmide pcDNA3.1+ | 70 |
| I.3. Amplification du plasmide pcDNA-tk..... | 74 |
| I.4. Synthèse des lipoplexes | 75 |
| I.5. Quantification des acides nucléiques | 76 |
| I.6. Electrophorèse sur gel d'agarose | 76 |
| II. Culture cellulaire..... | 77 |
| II.1. Culture des différentes lignées cellulaires | 77 |
| II.2. Courbes de croissances et de cytotoxicité | 78 |
| II.3. Accumulation du 18-FDG et du ^{99m} Tc-MIBI par les cellules MDA-MB-231 | 80 |
| III. Détermination du statut MDR | 81 |
| III.1. Extraction des ARN totaux | 81 |
| III.2. Transcription inverse..... | 81 |
| III.2. Réactions de PCR..... | 82 |
| IV. Mise au point d'un modèle animal de tumeur mammaire | 83 |
| IV.1. Animaux..... | 83 |
| IV.2. Imagerie médicale | 84 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------|------------|
| IV.3. Etudes anatomopathologiques..... | 85 |
| V. Protocoles de traitement des animaux..... | 86 |
| V.1. Protocole hsv1-tk/ganciclovir..... | 86 |
| V.2. Protocole endostatine | 86 |
| V.3 Etudes statistiques | 87 |
| Troisième partie RESULTATS..... | 89 |
| I. Construction du plasmide pcDNA-tk | 90 |
| I.1. Amplification du gène hsv1-tk..... | 90 |
| I.2. Vérification de la construction plasmidique | 90 |
| II. Etude des cellules MDA-MB-231..... | 94 |
| II.1. Aspect morphologique..... | 94 |
| II.2. Courbe de croissance | 94 |
| II.3. Cytotoxicité du GCV | 97 |
| II.4. Etude du système hsv1-tk/GCV | 97 |
| II.5. Cinétique d'accumulation du 18(F)-FDG et du ^{99m} Tc-MIBI | 103 |
| II.6. Détermination du statut MDR | 103 |
| III. Modèle animal..... | 106 |
| III.1. Evolution des volumes tumoraux et du poids des animaux | 106 |
| III.2. Etudes anatomopathologiques..... | 106 |
| III.3. Imagerie médicale | 110 |
| IV. Efficacité des protocoles thérapeutiques | 112 |
| IV.1. Système hsv1-tk/GCV..... | 112 |
| IV.2. Endostatine..... | 117 |
| Quatrième partie DISCUSSION..... | 121 |
| I. But de l'étude – Rappel des résultats..... | 122 |
| II. Système de vectorisation..... | 124 |
| III. Méthodes d'évaluation de l'activité anticancéreuse..... | 127 |
| III.1. Modèle animal..... | 127 |
| III.2. Techniques d'imageries médicales..... | 130 |
| IV. Efficacité des stratégies anticancéreuses | 133 |
| IV.1. Etudes <i>in vitro</i> | 133 |

| | |
|-----------------------------------------|------------|
| IV.2. Etudes <i>in vivo</i> | 135 |
| V. Perspectives | 141 |
| CONCLUSION..... | 144 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 147 |
| LISTE DES TABLEAUX | 166 |
| LISTE DES FIGURES..... | 168 |
| ANNEXE | 171 |

A mes parents

A Guillaume

A ma famille

A mes amis.

INTRODUCTION

Le cancer du sein est la première cause de mortalité par tumeur maligne chez la femme. Les grandes avancées en terme de compréhension des mécanismes de prolifération tumorale ont permis la mise en place de traitements très efficaces. Cependant, le stade de développement de la maladie est très important dans la prise en charge thérapeutique. Diagnostiqué et traité précocement, le cancer du sein a un très bon pronostic en terme de survie, en revanche, plus la maladie est à un stade avancé, plus elle est difficile à éradiquer. Comme dans beaucoup de processus de cancérisation, l'échappement thérapeutique qui caractérise les stades très avancés de la maladie, intervient avec l'apparition des métastases. Ce processus métastatique est possible grâce à la néo-angiogenèse. Ce terme définit l'apparition de nouveaux vaisseaux sanguins, qui irriguent la tumeur et permettent aux cellules cancéreuses de passer dans la circulation sanguine et de coloniser d'autres organes tels que les poumons. L'apparition de ces néo-vaisseaux sanguins est possible grâce à la mobilisation des cellules néo-endothéliales, composant principal des nouveaux capillaires sanguins. L'inhibition de la prolifération de ces cellules néo-endothéliales, à l'aide notamment de l'endostatine, est à l'heure actuelle une cible possible de la thérapie génique.

Un des facteurs limitant de la thérapie génique, est le choix du système de vectorisation. L'apparition de vecteurs non viraux, tels que les liposomes cationiques, semble être une alternative au système de transfert de gène classiquement utilisés. En effet, l'origine synthétique des liposomes cationiques, et leur capacité à compacter des ADN de grande taille, en fait de très bons vecteurs pour le transfert de gène, en terme de sécurité et de quantité d'ADN transféré. De plus un ciblage possible des cellules néo-endothéliales grâce aux liposomes, accroît leur intérêt dans le cas d'études sur les stratégies antiangiogéniques.

Dans ce contexte, nous avons testé l'efficacité de l'endostatine, vectorisée par les liposomes cationiques, en parallèle d'une étude par le système de gène suicide.

Un rappel bibliographique, permettra de définir plus en détail les mécanismes connus de la cancérisation de la glande mammaire et les thérapeutiques actuellement utilisées dans ce cadre. D'autre part, les stratégies de transfert de gènes applicables au cancer du sein seront aussi étudiées. Le but de notre étude a été d'évaluer l'efficacité anticancéreuse de l'endostatine, en comparaison d'une autre stratégie anticancéreuse : le gène suicide thymidine kinase du virus de l'herpès associée au ganciclovir (hsv1-tk/GCV). Cette étude permettra aussi de juger de l'efficacité des liposomes cationiques dans ces deux types de thérapies.

Après avoir défini les matériels et méthodes utilisés au cours de cette étude, nous étudierons l'efficacité du système hsv1-tk/GCV, *in vitro* sur une lignée cellulaire humaine

d'adénocarcinome mammaire. La réalisation des études *in vivo*, aussi bien du système hsv1-tk/GCV que de l'endostatine a nécessité la mise au point d'un modèle animal, utilisant la même lignée cellulaire que celle précédemment étudiée lors des expérimentations *in vitro*. Nous comparerons ensuite l'efficacité des deux stratégies envisagées sur ce nouveau modèle animal. Nous discuterons enfin les différents points abordés au cours de cette étude ainsi que les perspectives de travail envisageables.

Première partie

NOTIONS BIBLIOGRAPHIQUES

I. Cancer du sein

I.1. Développement du sein normal et mécanismes de déclenchement tumoral

I.1.a. Sein normal : architecture et développement

Le sein est une glande exocrine qui se développe au cours de la vie de la femme (figure B1). La glande mammaire est constituée de 2 compartiments cellulaires : le compartiment mésenchymateux, perfusé par les vaisseaux sanguins et les nerfs, et le compartiment épithélial qui s'articule autour d'un réseau de canaux galactophores et de lobules renfermant les alvéoles. Ces deux compartiments sont séparés par une membrane basale de collagène de type IV, de laminine et de glycosaminoglycanes (Rudland *et al.*, 1995). Une coopération permanente existe entre ces deux compartiments au cours du développement de la glande mammaire. Cette architecture se construit tout au long de la vie, du stade fœtal à la ménopause, sous l'influence des hormones sexuelles (oestrogènes et progestérone) et d'un certain nombre de facteurs de croissance (figure B2).

Au cours de la vie foetale, et plus particulièrement lors du troisième trimestre de la grossesse, les oestrogènes et la progestérone produites par la mère, provoquent une canalisation de l'épithélium mammaire, une différenciation du parenchyme mammaire et la formation des canaux galactophores, ainsi que le développement du réseau lobulo-alvéolaire. Après la naissance, la glande reste dans cet état rudimentaire. A la puberté, les premières modifications ovariennes apparaissent, avec la mise en place des cycles menstruels. La glande mammaire est alors soumise à une alternance d'exposition aux oestrogènes (1^{ère} moitié du cycle) et à la progestérone (2^{ème} moitié du cycle). Durant la phase folliculaire, la production d'oestrogènes est associée à une prolifération de l'épithélium canalaire avec une augmentation des mitoses, de la synthèse d'ARN et de la production protéique. Pendant la seconde moitié du cycle, la phase lutéale, l'augmentation de la progestérone provoque la dilatation des canaux et une différenciation des cellules épithéliales en cellules sécrétoires (Anderson *et al.*,

1982, Ferguson and Anderson, 1981). On observe une élongation des canaux existants, ce qui contribue à la formation de lobules de type 1, qui constituent la structure la plus rudimentaire de la glande avec en moyenne 11 alvéoles par lobule (figure B2). Avec la maturation sexuelle, les lobules évoluent vers des lobules de type 2, caractérisés par une augmentation du nombre d'alvéoles. En l'absence de grossesse, la glande reste dans cet état. Au cours de la grossesse les ramifications terminales des canaux se multiplient et de nombreuses alvéoles se développent (jusqu'à 80 alvéoles par lobule), sous l'influence notamment des hormones œstrogènes/progestérone et de facteurs de croissance tels que TGF- α (Tumor Growth Factor- α). On parle alors de lobules de type 3. En fin de grossesse et pendant la lactation, les lobules évoluent encore jusqu'aux lobules de type 4, car les alvéoles ont pour rôle de produire du lait, qui est acheminé jusqu'au mamelon par les canaux galactophores. Les alvéoles régressent lors du sevrage et la glande revient à son état initial. Le déclin des fonctions ovariennes à la ménopause, provoque une régression des structures de la glande mammaire ; les canaux galactophores sont maintenus, mais les alvéoles restantes ainsi que les lobules continuent de régresser avec l'âge (lobules de type 1) (Briskin, 2002, Nguyen *et al.*, 1995, Polyak, 2001, Russo and Russo, 1998) (figure B2).

L'effet des œstrogènes est médié par les récepteurs aux œstrogènes (RE), qui sont des protéines nucléaires de 66 kDa. Cependant les RE ne sont retrouvés que sur 6 à 7% des cellules épithéliales du sein normal, et plus particulièrement au niveau des lobules. L'expression des RE au niveau des cellules épithéliales varie en fonction du cycle menstruel (Balakrishnan *et al.*, 1987). L'action des œstrogènes se fait donc à la fois de manière directe par l'action sur les cellules épithéliales et indirecte par l'action sur les cellules mésenchymateuses qui sécrètent des facteurs de croissance (EGF, TGF- α , IGF, FGF et TGF- β). L'EGF et le TGF- α , agissent via le récepteur EGFR et sont des régulateurs de la prolifération et de la différenciation normale de l'épithélium mammaire, en revanche, le TGF- β est un facteur inhibiteur de la croissance cellulaire.

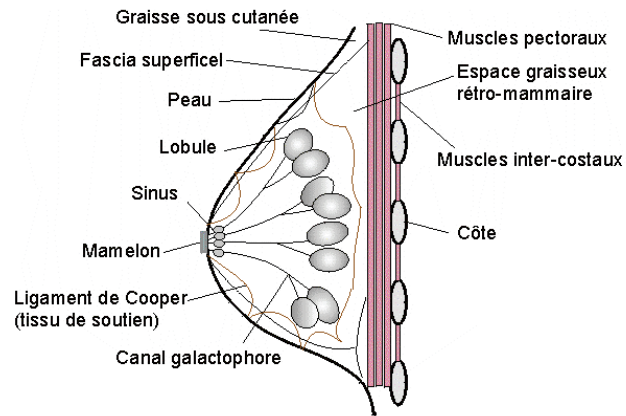


Figure B1 : Coupe du sein.

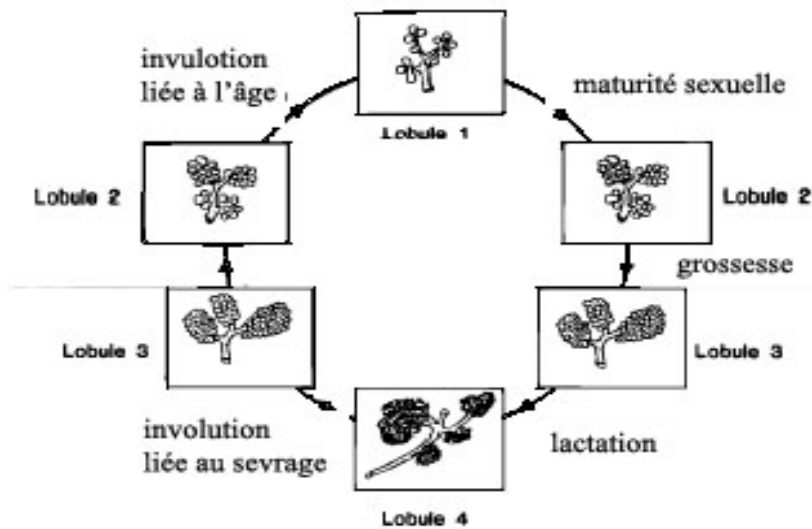


Figure B2 : Evolution de l'architecture de la glande mammaire.

L'architecture évolue en fonction de l'âge et du stade de la vie reproductive, depuis la puberté jusqu'à l'accouchement (Russo and Russo, 1998)

I.1.b. Mécanismes de déclenchement tumoral

Comme nous venons de le voir, la glande mammaire est un organe en évolution permanente sous l'influence des hormones et des facteurs de croissance. Ceci en fait un organe à part du point de vue du nombre de cellules en croissance et en différenciation, mais le rend plus susceptible aux transformations cancéreuses (Olsson, 2000). Comme tout mécanisme tumoral, la carcinogenèse mammaire résulte de l'acquisition par les cellules d'un certain nombre de caractéristiques : une autonomie vis-à-vis des signaux de croissance cellulaire, une insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance cellulaire, une évvasion du système de mort cellulaire programmée (apoptose), un potentiel de réplication illimité et une invasion tissulaire (potentiel métastatique) (Polyak, 2001). Ces caractéristiques sont acquises par les cellules tout au long du développement tumoral.

La première étape de cancérisation est une phase d'initiation. Elle se caractérise par une accumulation de mutations qui ont pour conséquence une surexpression des facteurs pro-oncogéniques. Les cellules sont génétiquement anormales mais toujours contrôlées par l'environnement cellulaire via les jonctions serrées (gap-junction). Lorsque les cellules entrent dans la seconde étape dite de promotion, elles acquièrent leur indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance grâce aux pro-oncogènes, et perdent leur capacité de communication intercellulaire (figure B3). Cette acquisition d'indépendance peut se faire de plusieurs manières :

- soit la cellule est capable de synthétiser elle-même un certain nombre de facteurs : on parle alors de contrôle autocrine notamment avec une augmentation de la synthèse et une surexpression d'« Insuline Growth Factor » (IGF), d'« Epithelial Growth Factor » (EGF) ou encore TGF- α ,

- soit il y a une surexpression des récepteurs transducteurs de signaux comme par exemple c-erb B2, le récepteur de l'EGF (Eccles, 2001, Hynes and Lane, 2001),

- soit la cellule surexprime des facteurs de transcription, par exemple le pro-oncogène c-myc. Dans la cellule normale, il forme un dimère avec la protéine Max et induit la prolifération cellulaire. Ce stimulus est régulé dans les conditions physiologiques par le complexe Mad-Max. En cas de surexpression de c-myc, le complexe Myc-Max est favorisé au

dépend de Mad-Max ce qui entraîne une prolifération cellulaire non régulée (Eccles, 2001, Hynes and Lane, 2001).

Les mécanismes de cancérisation sont aussi provoqués par la perte d'un certain nombre de contrôles sur la croissance cellulaire, avec notamment des pertes de fonctionnalité des anti-oncogènes. Deux anti-oncogènes majeurs interviennent dans la régulation du cycle cellulaire : la protéine du rétinoblastome (pRb) et le produit du gène p53 (figure B4). La protéine pRb peut, en fonction de son état de phosphorylation, bloquer le cycle cellulaire (hypophosphorylée) ou contrôler sa progression (hyperphosphorylée). Le stade hypophosphorylé est notamment maintenu par le TGF- β (« Tumor Growth Factor- β »), qui bloque en même temps l'expression de c-myc. Une mutation ou une perte de fonctionnalité de TGF- β ou de son récepteur provoque de manière concomitante la phosphorylation de pRb donc une avancée des cellules dans le cycle cellulaire, et l'expression de c-myc, favorisant la prolifération cellulaire. Le gène p53 contrôle lui aussi l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages causés à l'ADN, soit pour permettre sa réparation soit, si celle-ci est impossible, pour entraîner l'apoptose. En présence de p53 muté, l'ADN n'est plus réparé, il en résulte une instabilité génomique associée à une accumulation de mutations provoquant une croissance incontrôlée (Wazer and Band, 1999).

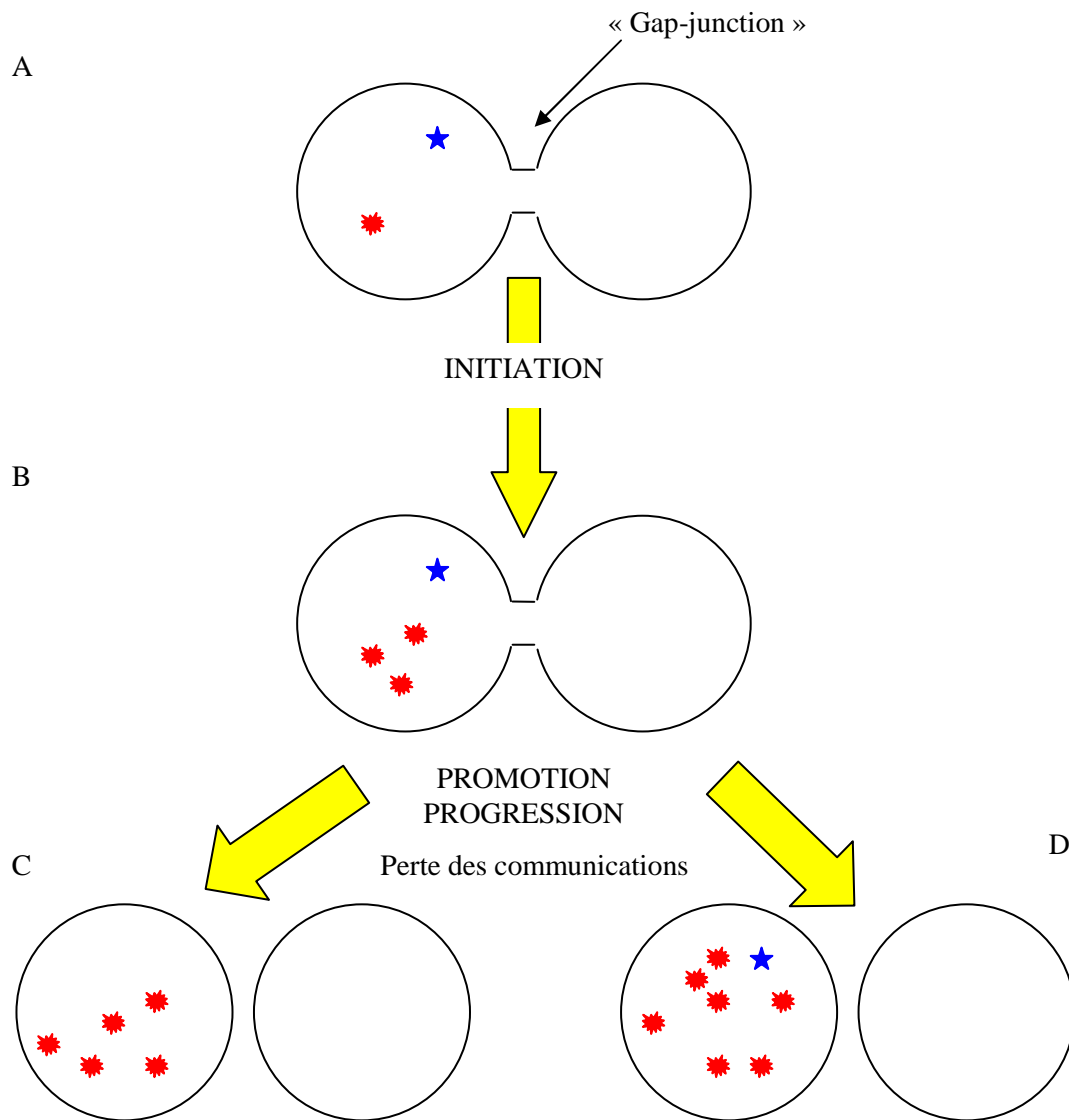


Figure B3 : Initiation, promotion et progression d'une cellule tumorale : rôle de l'équilibre entre pro et anti-oncogènes.

Pro-oncogène : , Anti-oncogène : .

A : équilibre entre pro et anti-oncogènes la croissance cellulaire est normale.

B : phase d'initiation avec un déséquilibre entre pro et anti-oncogènes. La croissance est toujours normale.

C : perte des anti-oncogènes et des communications intercellulaires. La croissance devient incontrôlée.

D : suractivation des pro-oncogènes et perte des communications intercellulaires. La croissance devient incontrôlée.

Cellule normale du sein

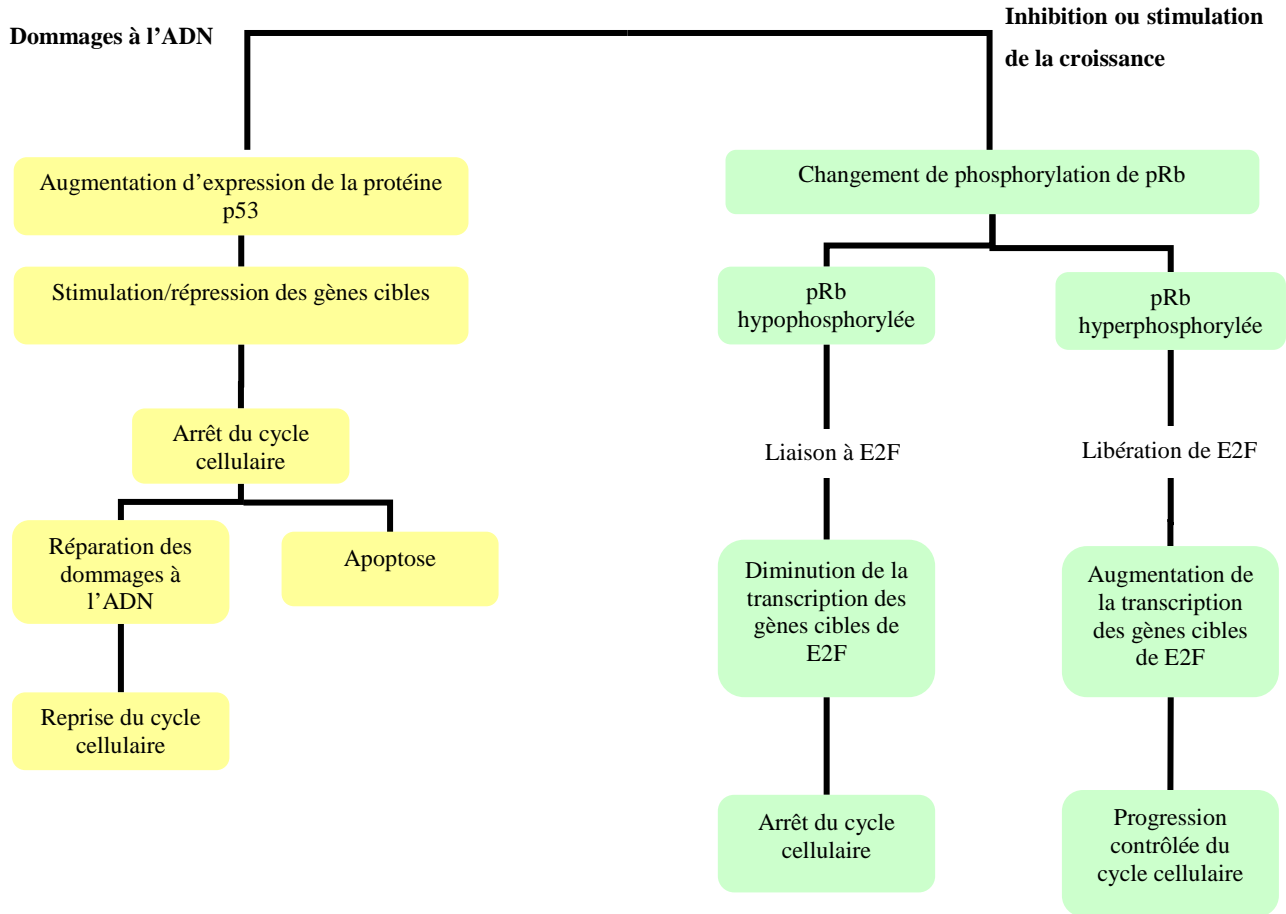


Figure B4 : Représentation schématique du rôle des protéines p53 et pRb, codées par les anti-oncogènes *p53* et *Rb*, dans la régulation de croissance des cellules normales du sein. (Wazer and Band, 1999).

La régulation de la croissance tumorale par les œstrogènes se fait de la même manière que pour le développement normal du sein. Les œstrogènes pénètrent par voie passive dans la cellule et se fixent à leur récepteur (RE- α) cellulaire (cytoplasmique ou nucléaire). Il s'en suit une modification de la conformation du récepteur avec dimérisation. Le dimère se fixe alors à l'ADN sur une séquence spécifique ERE (« estrogen-responsive element »). Cette séquence spécifique se situe au niveau de la région promotrice des gènes régulés par l'œstrogène (Murphy and Watson, 2002). Ceci entraîne soit une induction du cycle cellulaire (contrôle direct), soit la production d'enzymes et de peptides nécessaires à la synthèse d'acides nucléiques : c-myc, ou encore la thymidine kinase ou la thymidilate synthase (contrôle indirect) (Nguyen *et al.*, 1995).

Dans certains cas (5 à 10% des cancers du sein) tous ces mécanismes sont favorisés par la présence des mutations oncogéniques héréditaires qui touchent préférentiellement les gènes suppresseurs de tumeurs ou anti-oncogènes tels que : BRCA1, BRCA2 ou p53. On parle alors de cancers du sein héréditaires par opposition aux cancers du sein sporadiques. Le gène BRCA1 muté est retrouvé dans 40 à 45% des cas de cancers du sein héréditaires, et une telle mutation n'est quasiment jamais observée dans les cas de cancers sporadiques (Rosen *et al.*, 2003). Un grand nombre de fonctions sont attribuées au gène BRCA1, notamment sa capacité à maintenir l'intégrité du génome, à contrôler le cycle cellulaire, ainsi que l'apoptose. Il joue à la fois le rôle de « Gatekeeper » par sa capacité à contrôler les divisions cellulaires, ainsi que la mort des cellules, et le rôle de « Caretaker » en maintenant l'intégrité du génome (Kubista *et al.*, 2002). Parmi toutes ses fonctions, le gène BRCA1 a celle d'interagir avec le proto-oncogène c-myc, et d'inhiber ainsi la transformation cellulaire induite par c-myc. BRCA1 bloque aussi l'activité transcriptionnelle du récepteur à l'œstrogène RE- α en interagissant directement avec la partie N-terminale de ce dernier. BRCA1 se lie directement à p53. Cette liaison provoque une augmentation de l'activité de p53 (Rosen *et al.*, 2003). Enfin, BRCA1 a une influence sur le cycle cellulaire en provoquant la déphosphorylation de pRb et en inhibant la progression du cycle cellulaire en phase S (Pavelic and Gall-Troselj, 2001). Le gène BRCA1 est donc un maillon essentiel dans le maintien de l'activité normale d'une cellule, c'est pourquoi les personnes qui possèdent une mutation héréditaire de ce gène présentent 50 à 80% de risque de développer un cancer du sein par la perte de l'allèle non muté du gène (Kubista *et al.*, 2002).

I.1.c. Progression tumorale et l'échappement thérapeutique

Lorsque la tumeur atteint 1 à 3 mm³, elle a besoin d'apports en oxygène et en nutriments pour poursuivre sa croissance, dans le cas contraire elle entre en nécrose (Folkman, 1995, Folkman, 1995). Pour échapper à la nécrose, elle met en place un processus de néo-vascularisation appelé néo-angiogenèse. Il s'agit d'un processus naturel qui a surtout lieu lors du développement embryonnaire. La formation de nouveaux vaisseaux apparaît aussi au cours du cycle menstruel (irrigation de l'utérus) et dans les phénomènes de cicatrisation (Lloyd *et al.*, 2003). L'angiogenèse physiologique est régulée par un équilibre entre des facteurs pro-angiogéniques tel que le « vascular endothelial growth factor » (VEGF) et des facteurs anti-angiogéniques tels que l'angiostatine et l'endostatine (tableau B1). L'angiogenèse tumorale répond à trois grands principes d'activation mis en jeu par les cellules tumorales en hypoxie : la libération directe de facteurs pro-angiogéniques, la dégradation des composants de la membrane basale, provoquant la libération de facteurs de croissance et pro-angiogéniques, ce qui entraîne l'activation de macrophages l'amplification du phénomène (Miller, 2002).

Les facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF, agissent sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins pré-existants, qui sont des cellules à faible potentiel de division. Ils provoquent leur entrée en cycle cellulaire et une augmentation de leur pouvoir mitotique. Elles rompent la membrane basale des vaisseaux sanguins, et s'organisent en capillaires. Ces derniers migrent vers la source émettrice des facteurs pro-angiogéniques : la tumeur. Les cellules mésenchymateuses se différencient en péricytes, et les capillaires forment alors les nouveaux vaisseaux fonctionnels. Ce nouveau réseau de vaisseaux permet à la tumeur de se développer et de mettre en place les processus d'invasion métastatique. Les cellules tumorales en plein développement provoquent une rupture de la membrane basale tumorale et migrent dans les vaisseaux sanguins (figure B5) (Andre *et al.*, 1998, Boudreau and Myers, 2003). Une fois dans la circulation, elles essaient dans d'autres organes comme les poumons ou les os. La dissémination métastatique d'un cancer mammaire se fait aussi via le système lymphatique, grâce au processus de lymphangiogenèse. La lymphangiogenèse est un processus physiologique impliqué dans la synthèse de néo-vaisseaux lymphatiques. Comme pour l'angiogenèse, la lymphangiogenèse est détournée par les cellules tumorales afin de favoriser leur développement. Lorsque les cellules tumorales envahissent les vaisseaux lymphatiques, on observe un envahissement ganglionnaire. Une fois le processus métastatique

enclenché, et les métastases à distance présentes, la maladie atteint un stade critique, avec généralement une perte d'efficacité de la chimiothérapie (phénomène de chimiorésistance) et de l'hormonothérapie (perte des récepteurs hormonaux à la surface des cellules). La maladie entre en stade final dit d'échappement thérapeutique.

| Facteurs pro-angiogéniques | Facteurs anti-angiogéniques |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Angiogénine Angiopoïétine-1 «Epidermal growth factor» (EGF) «Fibroblast growth factor» (FGF) basique et acide «Hepatocyte growth factor» (HGF) Interleukine-8 (IL-8) «Placenta growth factor» «Platelet-derived growth factor» (PDGF) «Secreted protein acidic and rich in cystein» (SPARC) «Transforming growth factor» (TGF) α et β^* «Tumor necrosis factor» (TNF) α «Vascular endothelial growth factor» (VEGF) VEGF-B, VEGF-C et VEGF-D | Angiostatine Angiopoïétine-2 Endostatine Facteur 4 plaquettaire Fragments de la prolactine «Fragments de la « matrix metalloprotease 2 » (MMP2) «Tissular inhibitor of matrix metalloprotease» (TIMP) Interférons (INF) α et β Protamine «Transforming growth factor» (TGF) β^* Trombospondine-1 |

Tableau B1 : Facteurs endogènes régulant l'angiogenèse tumorale.

* Le rôle du TGF- β est complexe puisqu' *in vitro* il inhibe la croissance des cellules endothéliales et *in vivo* il induit l'angiogenèse (Andre *et al.*, 1998, Boudreau and Myers, 2003).

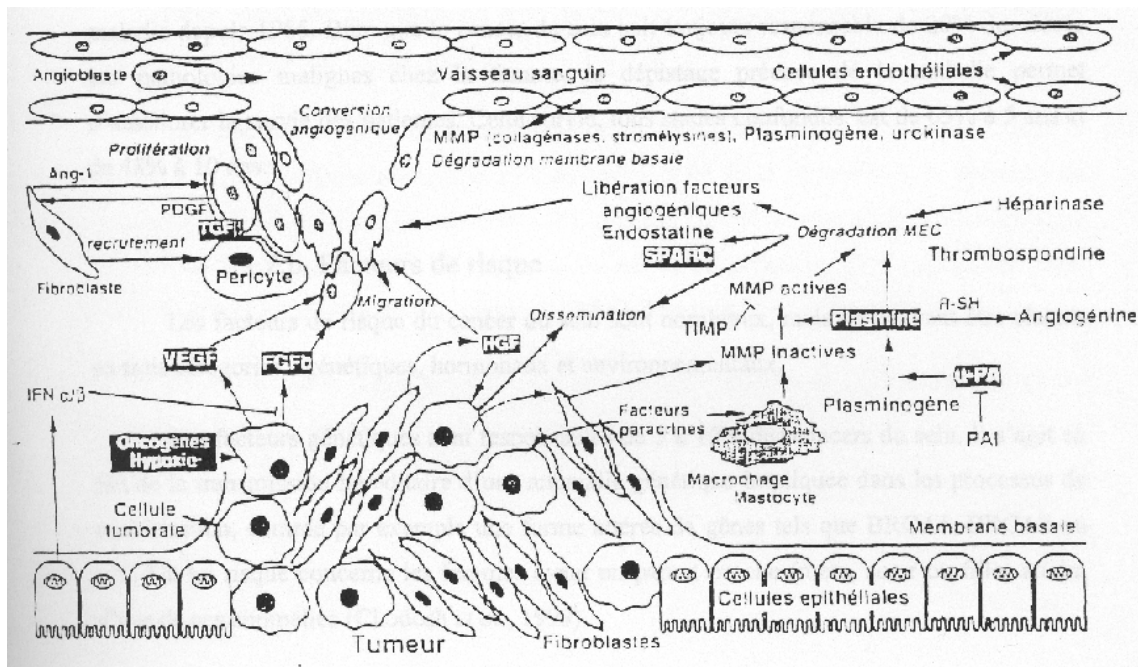


Figure B5 : Mécanisme de l'angiogenèse tumorale et interaction des différents facteurs impliqués dans le développement de néo-vaisseaux (Andre *et al.*, 1998, Boudreau and Myers, 2003).

I.2. Epidémiologie - Facteurs de risque - Classifications

I.2.a. Incidence et mortalité

Avec 41 845 nouveaux cas et 11 637 décès en France en l'an 2000, le cancer du sein reste la première cause de mortalité par cancer chez la femme. Cette tendance se généralise à tous les pays occidentaux industrialisés, le Japon et l'Asie étant pour l'instant moins touchés.

Le cancer du sein représente 35% des nouveaux cas de cancer chez la femme et son incidence ne cesse d'augmenter : elle est passée entre 1985 et 1995 de 64 à 82 pour 100 000 femmes. Cette augmentation de l'incidence est en partie due à une généralisation du dépistage du cancer du sein, et va de paire avec une stabilisation du nombre de décès causés par cette maladie depuis 1985. Bien que le cancer du sein soit toujours responsable de 20% des décès par pathologies malignes chez la femme, le dépistage précoce de la maladie permet d'améliorer la survie des patientes. Cette survie, tous stades confondus, est de 65% à 5 ans et de 48% à 10 ans.

I.2.b. Facteurs de risque

Les facteurs de risque du cancer du sein sont nombreux, mais ils peuvent être classés en trois catégories : génétiques, hormonaux et environnementaux.

Les facteurs génétiques sont responsables de 5 à 10% des cancers du sein. Il s'agit en fait de la transmission héréditaire d'une anomalie génétique impliquée dans les processus de cancérisation, comme par exemple une forme altérée de gènes tels que BRCA1, BRCA2 ou p53. Un tel risque concerne les femmes ayant un parent proche (mère, sœur ou fille) atteint d'une de ces anomalies (Chodosh *et al.*, 1999).

Les hormones endogènes sont très impliquées dans le développement de la glande mammaire et de ce fait jouent un rôle important en tant que facteurs de risque du cancer du sein. L'apparition précoce des règles (avant 12 ans), une ménopause tardive (après 55 ans) et l'absence de grossesse menée à terme avant 30 ans sont autant de facteurs favorisant l'apparition d'une tumeur mammaire. En revanche, une grossesse menée à terme avant 20 ans ainsi que l'allaitement diminue considérablement les risques. Le risque élevé est en relation

avec une surexposition aux oestrogènes endogènes (Chodosh *et al.*, 1999, Keen and Davidson, 2003).

Les variations d'incidence existantes d'un pays à l'autre amènent à parler de risques environnementaux. Les hypothèses concernant le rôle d'une alimentation trop riche en graisses animales comme facteur de risque n'ont pas encore été démontrées à ce jour. En revanche, d'autres facteurs environnementaux sont reconnus comme impliqués dans l'apparition de cancers du sein. Notamment, on retrouve l'exposition à de fortes radiations (cas des femmes de Nagasaki et Hiroshima).

I.2.c. Classifications

Deux types de classification sont le plus couramment utilisés : la classification clinique et la classification histologique.

La classification TNM est la classification clinique de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) la plus utilisée. Elle se base sur la taille de la tumeur (T), la présence de ganglions (N) et la présence de métastases (M) (tableau B2). Une autre classification clinique qui elle est plutôt utilisée par les anglo-saxons est la classification de l'« American Joint Committee on Cancer » (AJCC) qui regroupe les différents stades (tableau B3).

La classification histologique utilisée actuellement est celle de l'OMS. Elle classe les tumeurs en fonction de leur nature anatomopathologique (tableau B4).

| T | Tumeur primitive |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TX | Détermination de la tumeur primitive impossible |
| T0 | Pas de signe de la tumeur primitive |
| Tis | Carcinome <i>in situ</i> |
| T1 | Tumeur \leq 2cm dans sa plus grande dimension T1a \geq 0,5 cm T1b $>$ 0,5 cm et \geq 1 cm T1c $>$ 1 cm et \geq 2 cm |
| T2 | Tumeur $>$ 2 cm et \leq 5 cm dans sa plus grande dimension |
| T3 | Tumeur $>$ 5 cm dans sa plus grande taille |
| T4 | Tumeur de toute taille avec extension directe à la paroi thoracique ou à la peau T4a extension à la paroi thoracique T4b œdème ou ulcération cutanée du sein T4c à la fois 4a et 4b T4d carcinome inflammatoire |
| N | Adénopathies régionales |
| NX | Appréciation impossible de l'atteinte ganglionnaire |
| N0 | Absence de signes d'invasion ganglionnaire régional |
| N1 | Ganglions axillaires cliniquement suspects homolatéraux mobiles |
| N2 | Ganglions axillaires homolatéraux fixés entre eux ou à d'autres structures |
| N3 | Ganglions mammaires internes homolatéraux |
| M | Métastases à distance |
| MX | Détermination impossible de l'extension métastatique |
| M0 | Absence de métastases à distance |
| M1 | Présence de métastases à distance |

Tableau B2 : Classification TNM de l'UICC.

| Stade | Statut de la tumeur | Statut des nodules | Statut des métastases |
|------------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| Stade 0 | Tis | N0 | M0 |
| Stade I | T1 | N0 | M0 |
| Stade IIA | T0 | N1 | M0 |
| | T1 | N1 | M0 |
| Stade IIB | T2 | N0 | M0 |
| | T2 | N1 | M0 |
| | T3 | N0 | M0 |
| Stade IIIA | T0 | N2 | M0 |
| | T1 | N2 | M0 |
| | T2 | N2 | M0 |
| | T3 | N1 et N2 | M0 |
| Stade IIIB | T4 | Tout N | M0 |
| | Tout T | N3 | M0 |
| Stade IV | Tout T | Tout N | M1 |

Tableau B3 : Classification de l'AJCC.

| Tumeurs épithéliales malignes |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Carcinomes non infiltrants (<i>in situ</i>)</p> <p>Carcinome intracanaulaire <i>sans autre indication</i> (SAI) Carcinome lobulaire <i>in situ</i></p> <p>Carcinomes infiltrants</p> <p>Carcinome canalaire infiltrant sans forme commune (SAI) Carcinome canalaire infiltrant avec composante intracanaulaire prédominante Carcinome lobulaire infiltrant Carcinome mucineux Carcinome médullaire Carcinome papillaire Carcinome tubuleux Carcinome adénoïde kystique Carcinome sécrétant Carcinome apocrine Carcinomes métaplasiques Carcinome riche en glycogène Carcinome à cellules en bague à chatons Carcinome à cellules riches en lipides Carcinome à différenciation neuro-endocrine Maladie de Paget du mamelon</p> |
| Tumeurs malignes mixtes épithéliales et conjonctives |
| <p>Sarcome phyllode Carcinosarcome</p> |
| Autres tumeurs malignes |
| <p>Mélanome Angiosarcome Autres sarcomes (<i>sans autre indication</i>) lymphomes</p> |
| Métastases intramammaires |

Tableau B4 : Classification histologique de l’OMS.

Les tumeurs épithéliales malignes ou carcinomes représentent la presque totalité des tumeurs malignes du sein.

I.2.d. Facteurs pronostiques et survie

Un grand nombre de facteurs interviennent dans l'établissement d'un pronostic de survie. Le premier de ces facteurs est le sexe. En effet bien que les hommes ne représentent que 1% des cas de cancer du sein, le pronostic leur est plus défavorable (65% de survie à 5 ans et 41% à 10 ans contre respectivement 72% et 53% chez la femme pour les formes M0 sans métastase).

L'âge joue un rôle très important : pour des stades M0 sans métastase, la survie à 5 et 10 ans est respectivement de 67% et 52% pour une patiente de moins de 35 ans, de 79% et 63% pour une patiente de 35 à 65 ans ; pour les femmes de plus de 75 ans la survie passe à 51% et 25%.

La taille de la tumeur est en relation avec l'évolution de la maladie, qui est d'autant plus sévère que la taille de la tumeur est plus volumineuse. Le taux de survie à 10 ans est de 65% si la tumeur est de 2 cm ou moins, alors qu'il n'est plus que de 40% pour une taille comprise entre 5 et 7 cm.

Les formes d'emblée métastatiques ont un très mauvais pronostic à 5 et 10 ans, respectivement 15% et 5%.

Toutes ces données cliniques, associées à la classification TNM permettent d'apporter des éléments importants pour établir un pronostic en relation avec les stades de l'UICC (tableau B5).

Enfin la présence des récepteurs hormonaux, indicatrice de la sensibilité des cellules tumorales à l'hormonothérapie, a aussi valeur de facteur pronostique : la survie à 5 ans pour les stades M0 est de 80% en présence de récepteurs aux oestrogènes et de 72% en leur absence. Pour les récepteurs à la progestérone, la survie à 5 ans est de 81% en leur présence et de 73% en leur absence.

Le grade histologique est aussi un facteur pronostic important. Il s'agit du grade SBR (Scarff, Bloom, et Richardson). Il est basé sur la différenciation glandulaire, le pléïomorphisme nucléaire et le nombre de mitoses par champ. Le taux de survie à 5 ans est de 90% pour un grade I, 80% pour un grade II et 70% pour un grade III.

| Stades de l'AJCC | Pourcentage de survie à 5 ans |
|------------------|-------------------------------|
| Stade I | 90% |
| Stade II | 80% |
| Stade IIIA | 60% |
| Stade IIIB | 38% |
| Stade IV | 25% |

Tableau B5 : Survie à 5 ans en fonction du regroupement des stades de l'UICC (stades de l'AJCC)

I.3. Stratégies thérapeutiques

I.3.a. Chirurgie

La chirurgie est la technique la plus ancienne dans les cas de cancer du sein. La chirurgie radicale décrite par Halsted consiste à retirer en continuité la glande mammaire, les muscles pectoraux et les ganglions lymphatiques. Cette technique lourde et traumatisante a quasiment disparu au profit d'une mastectomie moins large avec la conservation des muscles pectoraux et un curage axillaire (ganglionnaire) moins étendu.

Pour les tumeurs de petites tailles, la mastectomie est remplacée par la tumorectomie associée à un curage axillaire et à de la radiothérapie. Le curage axillaire est à l'heure actuelle facilité par la technique du ganglion sentinelle, qui permet de ne retirer que le premier ganglion de relais et non plus toute la chaîne. Cette méthode est dite de chirurgie conservatrice.

Il existe des cancers du sein dits opérables d'emblée. Pour les autres cas, la chirurgie est précédée d'une cure de chimiothérapie ou d'hormonothérapie, voire d'une combinaison de ces différents traitements.

I.3.b. Radiothérapie

Dans les services de radiothérapie, les irradiations pour radiothérapie du sein représentent 20 à 30% des irradiations. La radiothérapie post-opératoire est réalisée 3 à 4 semaines après l'intervention chirurgicale, après une bonne cicatrisation. Le traitement est en général de 5 à 6 semaines, avec une exposition totale de 9 à 10 gray par semaine à raison de 4 à 5 séances de 1,8 à 2,5 gray.

Si la radiothérapie est accompagnée d'une chimiothérapie, l'irradiation est réalisée au milieu de traitement ou après la chimiothérapie. La radiothérapie pré-opératoire ou seule n'est pas utilisée.

I.3.c. Chimiothérapie

Les médicaments utilisés en chimiothérapie ont pour cible l'ADN ou les protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN. Ils peuvent être classés en 4 familles selon leur mode d'action :

✓ Les antimétoprotiques, avec les alcaloïdes de pervenche. Ce sont des dérivés hémisynthétiques de la pervenche de Madagascar. Ils inhibent la polymérisation de la tubuline, ce qui induit l'apoptose. La molécule la plus utilisée dans les protocoles thérapeutiques du cancer du sein est la vinorelbine. Les taxanes (paclitaxel ou docetaxel) sont aussi des antimétoprotiques. Ils bloquent les cellules en métaphase en inhibant la dépolymérisation de la tubuline. Les molécules utilisées, paclitaxel et docetaxel, sont des dérivées d'extraits d'If.

✓ Les agents alkylants sont des molécules de synthèse, qui après activation hépatique ou tissulaire se lient de manière covalente à l'ADN, ce qui provoque une inhibition de la progression de l'ADN polymérase. Dans le cas du cancer du sein, c'est le cyclophosphamide qui est utilisé.

✓ Les antimétabolites perturbent la synthèse de l'ADN en bloquant les enzymes nécessaires à la synthèse des nucléotides. Les plus utilisés dans le cancer du sein sont le 5-fluorouracile (5-FU) et le méthotrèxate (MTX).

✓ Les inhibiteurs de la topoisomérase II inhibent la religation des 2 brins d'ADN après le relâchement des contraintes de torsion nécessaire au processus de réplication. Il s'agit de la famille des anthracyclines avec principalement l'adriamycine et l'épirubicine.

Ces différentes molécules peuvent être administrées seules ou en combinaison. Les principales combinaisons sont :

- ✓ CMF (cyclophosphamide-méthotrèxate-5FU),
- ✓ AC (adriamycine-cyclophosphamide),
- ✓ FEC (5FU-épirubicine-cyclophosphamide),
- ✓ AVCMF (adriamycine-vincristine- cyclophosphamide-méthotrèxate-5FU).

I.3.d. Hormonothérapie

L'efficacité de l'hormonothérapie dépend de la présence ou non à la surface des cellules tumorales de récepteurs aux oestrogènes et à la progestérone. L'absence de tels récepteurs est responsable de l'absence de réponse aux molécules administrées.

Il existe 3 types d'hormonothérapie :

✓ L'hormonothérapie compétitive avec les anti-œstrogènes. Ils bloquent l'action des oestrogènes en se fixant aux récepteurs oestrogéniques des cellules tumorales. La molécule la plus largement utilisée à l'heure actuelle est le tamoxifène.

✓ L'hormonothérapie additive avec la prise de progestatifs de synthèse. A forte dose, ils se comportent comme des anti-œstrogènes.

✓ L'hormonothérapie inhibitrice avec les anti-aromatases. Elle consiste en une surrénalectomie chimique, qui se traduit par une inhibition de l'activité aromatase responsable la conversion des stéroïdes surrénaliens en œstrogènes.

I.3.e. Nouvelles stratégies thérapeutiques

De nouvelles voies de traitements se développent en essayant d'apporter une spécificité en fonction des caractéristiques de la tumeur. C'est par exemple le cas des antagonistes des récepteurs de facteurs de croissance. Le plus étudié actuellement est le trastuzumab, qui est un anticorps dirigé contre la protéine c-erbB-2 (Sledge, 2001, Smith, 2002).

I.4. Cancer du sein et chimiorésistance

La limite des traitements de chimiothérapie est l'apparition de résistances aux médicaments administrés avec des phénomènes de « cross resistance » (apparition de résistance à des molécules jamais administrées). Les mécanismes impliqués dans la résistance aux médicaments, peuvent être classés en 2 catégories : les mécanismes pharmacologiques et les mécanismes cellulaires. La composante pharmacologique concerne essentiellement le métabolisme du médicament, son mode d'administration et la dose administrée. Les facteurs cellulaires sont les plus importants dans les mécanismes de résistance. Ils sont classés en 5

grandes catégories : la modification de l'accumulation des drogues dans la cellule et l'augmentation de l'efflux des drogues en dehors des cellules (résistance liée aux transporteurs membranaires, phénomène de « Multi Drug Resistance »), la modification de l'activation/inactivation des drogues (résistance métabolique liée à des mutations de la glutathion S-transférase), la modification de l'affinité des drogues pour leurs cibles (résistance liée par exemple à une sous expression ou une mutation génétique d'enzymes telles que les topoisomérases I et II), la modification des processus de réparation de l'ADN et la modification de la capacité de la cellule à exécuter l'apoptose (résistance liée à une mutation de p53 ou à une surexpression de bcl-2) (Giaccone *et al.*, 1995, Krishna and Mayer, 2000, Leonessa and Clarke, 2003).

I.4.a. Définition de la « Multi-Drug-Resistance »

La « Multi-Drug-Resistance » (MDR) est un mécanisme lié aux transporteurs membranaires. Ils sont codés par les gènes de la famille ABC (« ATP Binding Cassette »). Ces gènes représentent la plus importante famille de gènes codant pour des protéines transmembranaires qui fixent l'ATP et utilisent son énergie pour excréter un grand nombre de molécules hors des cellules. Il y a alors diminution de l'accumulation de la molécule active dans la cellule, et ainsi perte de son action au sein de cette dernière. Ces protéines transmembranaires sont caractérisées par une architecture commune. Elles sont constituées de 2 domaines NBF (« nucleotide binding folds ») de liaisons à l'ATP et de 2 domaines TMD (« transmembrane domaine ») transmembranaires. Les TMD sont formés de 6 à 11 régions en hélices- α transmembranaires qui déterminent la spécificité au substrat, et les NBF possèdent 3 domaines conservés : les domaines Walker A et B et un motif de signature C (figure B6). Ce domaine C est spécifique des transporteurs ABC et les distingue des autres protéines liant l'ATP. La protéine peut se présenter sous forme de dimère avec 2 NBF et 2 TMD, ou sous forme de monomère avec 1 NBF et 1 TMD. Ces formes monomériques peuvent s'associer et donner des homo ou des hétérodimères (Dean *et al.*, 2001, Simon and Schindler, 1994, Sparreboom *et al.*, 2003). Les gènes ABC sont classés en 7 familles de ABCA à ABCG, ce qui représente 48 gènes. Parmi ces gènes, 7 sont impliqués dans les mécanismes de MDR (tableau B7). Nous ne décrivons ici que les 2 protéines les plus étudiées.

Le gène *ABCB1* ou *MDR1*, localisé sur le chromosome 7 (7q21.1) chez l'homme, code pour la protéine P-gp qui est actuellement la plus étudiée des protéines de la MDR. Un gène homologue a aussi été identifié chez la souris. C'est une protéine de 170 kDa composée de 2 sous unités identiques (2 NBF et 2 TMD), les TMD possédant chacun 6 hélices- α (figure B7) (Bosch and Croop, 1996, Bradshaw and Arceci, 1998).

Les substrats de la P-gp sont répertoriés dans le tableau B8. Ces substrats traversent passivement la bicouche lipidique et pénètrent dans la cellule. Ils sont alors reconnus spécifiquement par les TMD de la P-gp et sont expulsés activement hors de la cellule grâce à l'énergie fournie par l'ATP (Stavrovskaya, 2000).

Le gène *ABCC1* ou *MRP1*, localisé sur le chromosome 16 (16p13.1) chez l'homme, code pour la protéine MRP1 de 190 kDa. Les protéines P-gp et MRP1 ne présentent que 15% d'homologie (Keppler *et al.*, 1998) (figure B8). Elles diffèrent par leurs substrats (tableau B9) mais surtout par leur mécanisme d'action. En effet, la plupart des substrats de MRP1 sont excrétés sous forme de conjugués sulfate et glucuronate tels que les leucotriènes C₄, médiateurs de l'inflammation. Les drogues anticancéreuses qui sont transportées par MRP1 ne le sont pas sous forme conjuguée, mais plutôt par un mécanisme de co-transport avec le glutathion réduit (GSH) (Leslie *et al.*, 2001).

Toutes les protéines de la MDR semblent aussi très impliquées dans des phénomènes physiologiques normaux de par leur localisation tissulaire initiale (Sikic *et al.*, 1997), qui suggère leur rôle dans la régulation de l'absorption, de la distribution et de l'excrétion des toxines à l'extérieur des cellules (Leonessa and Clarke, 2003). De plus, la P-gp semble être un composant essentiel de la barrière hémato-encéphalique (de Boer *et al.*, 2003).

I.4.b. Rôle de la MDR dans les traitements du cancer du sein

Les protéines P-gp et MRP1 sont détectées dans les cancers du sein non traités respectivement dans 41% et 49% des cas. Le traitement de tels cancers par une molécule reconnue pour être substrat de la P-gp par exemple, fait passer le taux d'expression de cette dernière à 56% des cas. Ce phénomène constitue un obstacle majeur en matière d'efficacité de chimiothérapie (Leonessa and Clarke, 2003).

Aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre le taux d'expression des protéines de la MDR et d'autres facteurs tels que la taille et le grade de la tumeur, l'expression des récepteurs aux hormones stéroïdes (RE et RP) et le statut métastatique. En revanche, le taux d'expression peut être mis en relation avec le taux de réponse à une chimiothérapie. Le traceur radioactif ^{99m}Tc -MIBI (Maddahi *et al.*, 1991, Wackers *et al.*, 1989) à l'origine utilisé pour l'évaluation de la perfusion myocardique, est, à l'heure actuelle utilisé dans les scintigraphies de certains cancers et notamment celui du sein (Prats *et al.*, 1999, Rodrigues *et al.*, 2000). Mais le ^{99m}Tc -MIBI est aussi un substrat pour la P-gp et la MRP1 (Berghammer *et al.*, 1999, Kao *et al.*, 2001, Sun *et al.*, 2000). L'absence d'accumulation du traceur au sein de la tumeur ou la perte de cette capacité d'accumulation au cours d'un traitement de chimiothérapie pourrait être un bon indicateur du statut MDR de la tumeur et/ou de ses métastases, et permettre d'envisager d'autres stratégies thérapeutiques chez la patiente. En effet, de nombreuses études cliniques ont montré une corrélation inverse entre l'accumulation du MIBI par la tumeur et le taux d'expression des protéines P-gp et MRP1 dans le cancer du sein (Del Vecchio *et al.*, 1997, Fuster *et al.*, 2002, Liang *et al.*, 2002).

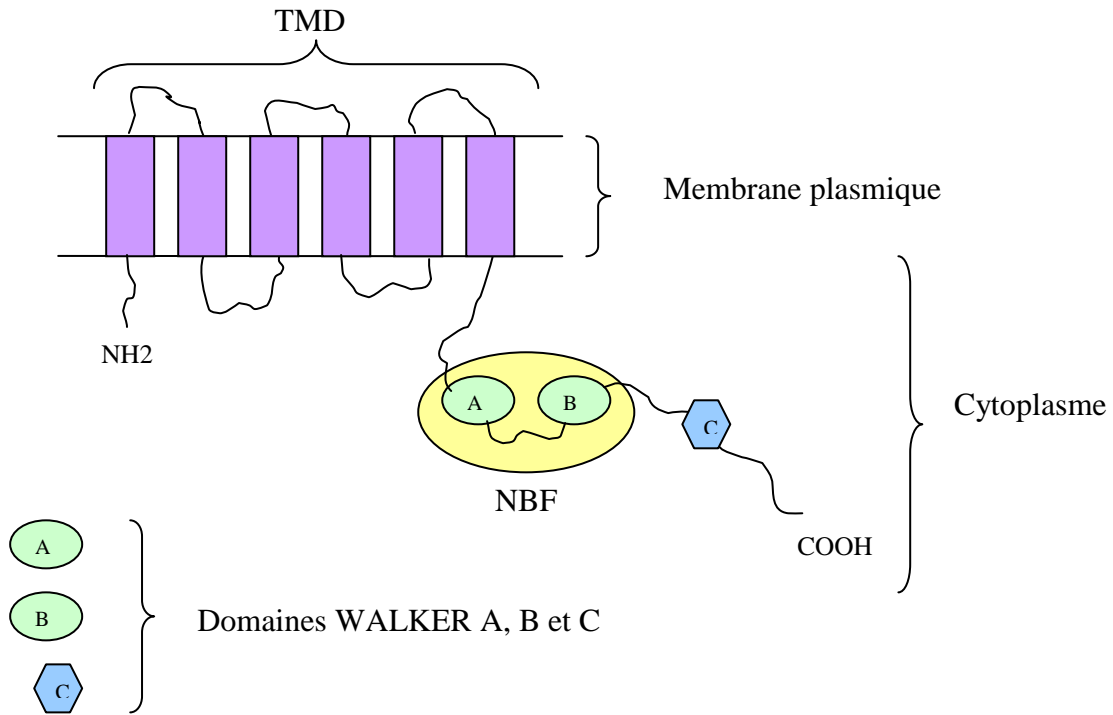


Figure B6 : Schéma d'une sous-unité basique d'une protéine ABC avec le domaine TMD (« transmembrane domain ») et le domaine NBF (« nucleotide binding folds »). (Leonessa and Clarke, 2003).

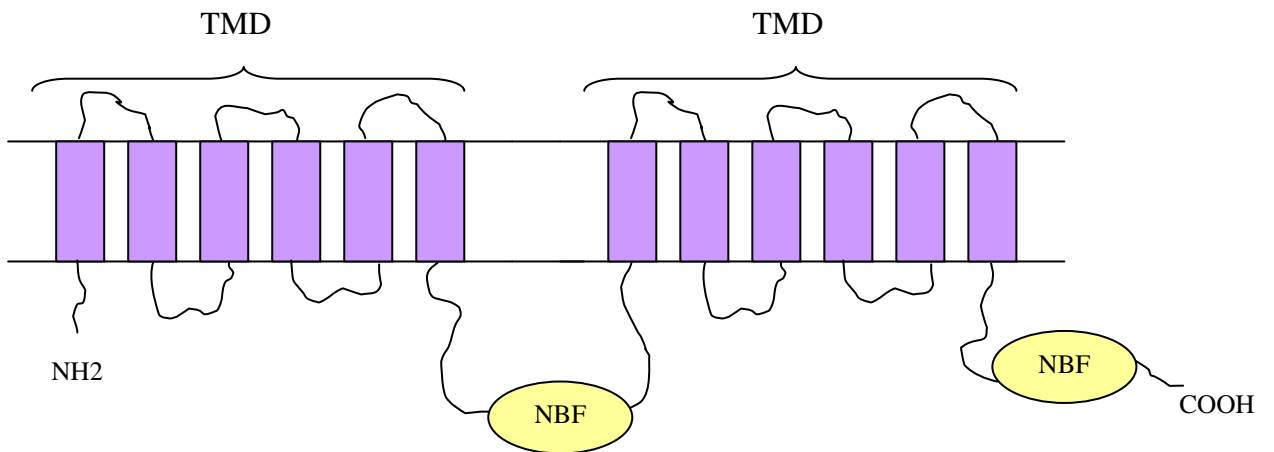


Figure B7 : Schéma de la protéine P-gp comportant 2 sous-unités TMD (« transmembrane domain »)-NBF (« nucleotide binding folds »). (Leonessa and Clarke, 2003).

| Gène selon la nomenclature des protéines ABC | Nom | Localisation chromosomique |
|-----------------------------------------------------|------------|-----------------------------------|
| ABCB1 | MDR1 | 17q21.1 |
| ABCC1 | MRP1 | 16p13.1 |
| ABCC2 | MRP2 | 10q24 |
| ABCC3 | MRP3 | 17q21.3 |
| ABCC4 | MRP4 | 13q32 |
| ABCC5 | MRP5 | 3q27 |
| ABCG2 | BCRP | 4q22 |

Tableau B7 : Gènes de la famille ABC impliqués dans les phénomènes de « multi drug resistance ».

(Dean *et al.*, 2001).

| Substrats | Inhibiteurs |
|------------------------|----------------|
| Daunorubicine | Biricodare |
| Docetaxel | Cyclosporine A |
| Doxorubicine | Valspodar |
| Irinotecan | Verapamil |
| Mitoxantrone | |
| Paclitaxel | |
| Topotecan | |
| Vinblastine | |
| Vincristine | |
| Rhodamine 123 | |
| ^{99m} Tc-MIBI | |

Tableau B8 : Substrats et inhibiteurs de la protéine P-gp.
(Sparreboom *et al.*, 2003).

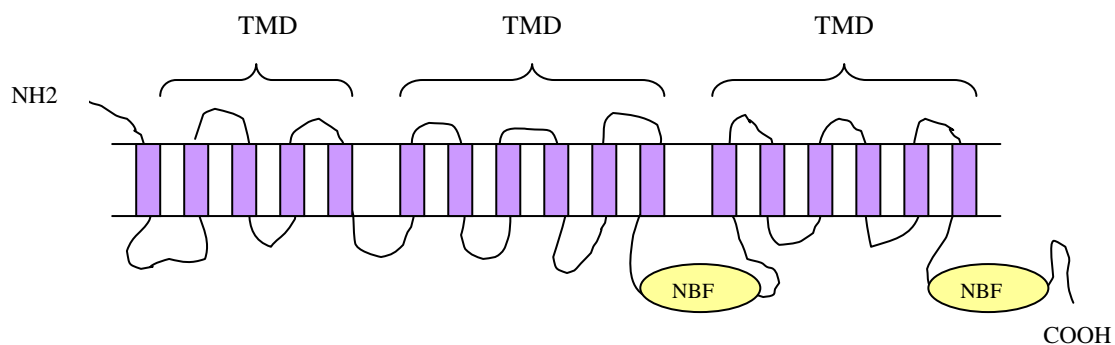


Figure B8 : Schéma de la protéine MRP1, composée de 2 sous unités TMD-NBF et d'un troisième domaine TMD constitué de 4 hélices- α . (Leslie *et al.*, 2001).

| Substrats | Inhibiteurs |
|-------------------------|----------------|
| Chlorambucil | Biricodare |
| Daunorubicine | Cyclosporine A |
| Doxorubicine | Clotrimazole |
| Méthotrexate | |
| Melphalan | |
| Vincristine | |
| ^{99m}Tc -MIBI | |

Tableau B9 : Substrats et inhibiteurs de la protéine MRP1. (Sparreboom *et al.*, 2003).

II. Thérapie génique

Le terme de thérapie génique regroupe les différentes techniques de transfert d'acides nucléiques (ADN ou ARN), dans le but de traiter ou de prévenir un certain nombre de maladies. Dans un premier temps, le but de la thérapie génique est de traiter les désordres génétiques sévères ainsi que les maladies acquises comme les cancers. Cependant la thérapie génique n'a pas pour but d'être une alternative aux thérapeutiques conventionnelles, mais plutôt de les compléter voir de les potentialiser. Une des étapes importantes de la thérapie génique, et bien souvent la plus limitante du système, est le choix du vecteur qui permettra le transfert du gène d'intérêt aux cellules cibles. Ce vecteur doit être inoffensif pour l'hôte, mais doit permettre une bonne efficacité de transfection.

II.1. Vecteurs de la thérapie génique

II.1.a. Vecteurs viraux

II.1.a.1. Adénovirus

Les adénovirus sont des virus à ADN bicaténaire à la fois très contagieux et très peu pathogènes pour l'homme. Le matériel génétique est contenu dans une structure protéique, la capsid. La fixation de cette capsid aux cellules cibles est rendue possible par la présence de longues fibres protéiques qui interagissent avec le récepteur membranaire de la cellule. L'internalisation du virus résulte de l'interaction de protéines de la capsid avec des intégrines de type α -V, permettant l'endocytose des particules dans la cellule. L'ADN est libéré à proximité du noyau, lors de la destruction de l'endosome suite à la diminution du pH interne. L'ADN pénètre dans le nucléoplasme par les pores nucléaires. Les adénovirus utilisés en thérapie génique sont rendus déficients pour la réplication par délétion du gène E1 indispensable à celle-ci. Ainsi délévés, les virus ne peuvent se propager que dans des cellules exprimant le gène E1 comme notamment les cellules de la lignée 293. Une telle lignée permet la production de virus recombinants incapables de se propager en dehors des cibles qu'ils atteignent. Les adénovirus peuvent ainsi infecter un grand nombre de types cellulaires, qu'il

s'agisse de cellules quiescentes ou mitotiques. L'ADN s'intègre très rarement dans le génome de la cellule hôte, ce qui limite les risques d'activation de proto-oncogène ou d'inactivation d'anti-oncogène. Cependant un inconvénient majeur subsiste : administrés *in vivo*, les adénovirus possèdent un fort pouvoir antigénique qui provoque une réponse immunitaire importante. De nombreuses équipes ont mis au point des adénovirus défectifs pour d'autres gènes tels que E4 et ont généré les cellules productrices associées (Krougliak and Graham, 1995, Wang and Finer, 1996). Ces adénovirus de seconde génération possèdent un pouvoir antigénique *in vivo* diminué, mais la durée d'expression du gène d'intérêt est elle aussi diminuée. Ceci est probablement dû à la perte d'une séquence nécessaire à la régulation du gène d'intérêt. L'efficacité du transfert peut aussi être augmentée en modifiant les fibres protéiques interagissant avec les récepteurs cellulaires afin que le virus puisse cibler d'autres composants de la membrane cellulaire (Wickham *et al.*, 1995, Wickham *et al.*, 1996).

II.1.a.2. Rétrovirus

La plupart des vecteurs rétroviraux utilisés sont basés sur le virus de la leucémie murine de Moloney (« Moloney murine leukemia virus », MMLV), qui est le rétrovirus le plus étudié (Guild *et al.*, 1988). Le gène du MMLV code pour trois polyprotéines gag, pol et env, qui sont les facteurs trans nécessaires à la réplication virale. Les éléments cis nécessaires à la réplication et à l'encapsulation des particules virales se situent dans les régions 5' et 3' LTR : promoteur, séquence de polyadénylation, séquence d'encapsulation dite séquence de « packaging » (séquence psi).

Le cycle rétroviral débute par la fixation des particules virales sur des récepteurs présents à la surface des cellules cibles. L'enveloppe virale fusionne avec la membrane cellulaire, libérant dans le cytoplasme l'ARN et la transcriptase inverse nécessaire à la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire. Le brin d'ARN est alors détruit et le second brin d'ADN synthétisé. A l'occasion de la division cellulaire et de la disparition de la membrane nucléaire, la séquence d'ADN virale est intégrée dans le génome de manière aléatoire.

Pour pouvoir être utilisés comme vecteurs de la thérapie génique, les rétrovirus sont délétés pour des gènes situés entre les séquences LTR : les gènes *gag*, *pol* et *env*, nécessaires à la réplication et sont remplacés par la séquence du gène d'intérêt. La séquence psi, nécessaire pour l'encapsidation des particules virales n'est, elle, pas modifiée. Ainsi modifiés, les virus

sont incapables de se répliquer, mais peuvent toujours produire des particules rétrovirales. On parle alors de rétrovirus défectifs pour la réplication, et les particules produites sont des particules rétrovirales défectives. Afin de pouvoir répliquer le gène d'intérêt, les virus nécessitent une lignée cellulaire particulière contenant les gènes *gag*, *pol* et *env*. On parle de cellules d'encapsidation (« packaging cell line »)

II.1.a.3. Virus associés aux adénovirus (« Adenoassociated virus » AAV)

Les AAV sont des virus défectifs à ADN monocaténaire de la famille des parovirus. Pour leur propagation, ils nécessitent la présence de virus helper tel qu'un adénovirus ou un virus herpes. Les plasmides codant pour l'AAV et pour l'adénovirus sont cotransfectés dans les cellules en culture. Le surnageant est ensuite recueilli. Il contient l'AAV qui est ensuite séparé de l'adénovirus par des moyens physiques (chauffage à 56°C et ultracentrifugation). Les AAV peuvent s'intégrer de manière stable et efficace dans le génome des cellules infectées. Ils ont la particularité de s'intégrer de manière spécifique dans le génome (région 19q13.3), ce qui diminue le risque d'activation de proto-oncogène. Cependant, la préparation des AAV est lourde puisqu'elle nécessite la présence d'un adénovirus helper qu'il faut par la suite éliminer par différentes phases de purification. Enfin, une très grande quantité d'AAV est nécessaire pour la réalisation d'essais *in vivo* (Samulski, 1993).

II.1.b. Vecteurs non viraux

Bien que les systèmes viraux présentent un certain nombre d'avantages, ils ne sont pas à l'heure actuelle sans risque. Ces dernières années, de nombreuses techniques de transfert non virales de gènes ont été mises au point. Elles essaient de combiner les avantages de vecteurs viraux tout en palliant à leurs défauts.

II.1.b.1. ADN nu

Dans ce système, l'ADN est injecté directement dans le tissu sous forme plasmidique. L'injection se fait à l'aide d'un fusil à gènes, qui permet de bombarder l'épiderme de microparticules recouvertes d'ADN. L'ADN atteint le noyau, où il reste sous forme épisomale et permet ainsi une expression transitoire de la protéine d'intérêt (Davis *et al.*, 1993). Cependant les cellules musculaires semblent être les seules à pouvoir être transfectées par

cette technique et à pouvoir exprimer le gène transfecté (Wolff *et al.*, 1990). Cette technique ne semble pas suffisante pour corriger les anomalies génétiques mais pourrait s'avérer efficace lors d'une procédure de vaccination, puisqu'un faible taux d'expression du transgène est suffisant pour déclencher une réponse immunitaire (Zhu *et al.*, 1993).

II.1.b.2. Electroporation

Elle permet d'introduire des gènes dans les cellules sous l'influence d'une brève décharge électrique. L'application d'impulsions électriques à des cellules en culture provoque l'ouverture transitoire des pores de la membrane cellulaire. Des molécules d'ADN linéaires ou superenroulées, peuvent pénétrer dans la cellule et s'intégrer dans le génome avec un taux élevé de transfections stables (Mathiesen, 1999, Mir and Orłowski, 1999). Ce n'est que très récemment que l'électroporation a été utilisée pour améliorer l'efficacité de transfert d'ADN nu *in vivo*. L'électroporation permet de transfecter de l'ADN dans tous les tissus, son efficacité est indépendante du cycle cellulaire. De plus cette technique ne nécessite pas le clonage du gène d'intérêt dans un plasmide viral (Fattori *et al.*, 2002).

II.1.b.3. Liposomes

Ce type de transfert repose sur l'encapsulation de la molécule d'ADN à l'intérieur d'une vésicule constituée d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides. Cette vésicule lipidique, appelée liposome, renferme un compartiment aqueux. Les liposomes peuvent contenir dans ce dernier ou dans leurs membranes lipidiques différentes molécules telles que des agents pharmacologiques (Gabizon *et al.*, 1994, Lee *et al.*, 1995, Mayer *et al.*, 1989), des protéines, des acides nucléiques. Contrairement aux vecteurs viraux, ce système permet le transfert d'ADN sans que ce dernier soit limité en taille. Cependant afin de favoriser l'internalisation dans la cellule cible, les liposomes sont utilisés en présence d'un agent fusiogène, le polyéthylène glycol. Le glycérol peut être aussi employé et a pour fonction d'augmenter, d'induire ou de favoriser l'endocytose des liposomes par la cellule hôte. Cependant, cette technique ne permet d'obtenir qu'une expression transitoire du transgène, l'ADN restant sous une forme épisomale dans la cellule hôte.

Les liposomes cationiques

Ces vecteurs s'inspirent fortement des systèmes viraux puisque le principe repose sur une condensation de l'ADN (chargé négativement par les groupements phosphates) avec une molécule chargée positivement pour former des particules sub-micrométriques. Les vecteurs lipidiques sont constitués de trois domaines :

- une tête cationique permettant la liaison à l'ADN,
- une ou plusieurs chaînes hydrophobes,
- un « espaceur » séparant ces deux éléments.

Le prototype du lipide cationique utilisé lors du transfert de gène est le bromure de dioléoxyloxy-propyl-triméthylammonium (DOTMA), un ammonium quaternaire amphiphile. La chaîne hydrophobe est en général constituée par un phospholipide neutre, la dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE). La formation d'un complexe « ADN/DOTMA/DOPE » permet d'obtenir un lipoplexe capable de transférer un grand nombre de cellules en culture. L'excès de charges électrostatiques réparties à la surface du lipide cationique lui permet de se fixer aux membranes des cellules par interaction ionique, la cellule possédant une charge globale négative. Cependant, l'efficacité du transfert dépend de plusieurs paramètres dont le type de lipide utilisé, la présence d'éléments permettant la condensation de l'ADN, le rapport ADN/lipide, le type cellulaire. Un des arguments principaux en faveur du développement des lipoplexes comme vecteur de transfert en thérapie génique, par rapport aux vecteurs viraux, repose sur leur efficacité et leur sécurité d'utilisation. Cependant, les études récentes réalisées par (Dow *et al.*, 1999) démontrent que l'injection par voie intraveineuse de lipoplexes induit des effets immunologiques. Il semblerait que cet effet soit concomitant à la présence d'ADN plasmidique dans le lipoplexe puisque aucune réponse immunologique n'est observée lors de l'utilisation d'un liposome « vide ».

Les polyplexes

Ces composés sont formés de l'association, par des interactions électrostatiques, de l'ADN avec une molécule comme la polylysine, la protamine, ou le polyéthylèneimine (PEI). L'ADN ainsi compacté est protégé des nucléases endogènes, et sa fixation cellulaire est augmentée soit par endocytose soit par phagocytose (Ogris and Wagner, 2002). Les liposomes endocytés se retrouvent à l'intérieur de vésicules intracellulaires. La fusion de liposomes cytoplasmiques avec les vésicules contenant l'ADN aboutit à la formation d'endosomes. A l'intérieur des endosomes, une partie des molécules d'ADN sont dégradées par l'action des nucléases liposomales.

Les expérimentations réalisées sur des modèles animaux, aussi bien avec les liposomes cationiques qu'avec les polyplexes, montrent l'efficacité de transfert de ces vecteurs puisque l'injection des complexes dans la circulation sanguine se traduit par une localisation du transgène au niveau des cellules endothéliales, des leucocytes et macrophages intravasculaires. De nombreux complexes se retrouvent dans les cellules endothéliales des capillaires pulmonaires et dans certains organes comme de foie, les reins et même les tumeurs (McLean *et al.*, 1997).

D'autres études sont réalisées afin d'améliorer le ciblage de ces complexes : en effet différentes molécules peuvent être greffées sur les polymères cationiques (PEI ou polylysine), comme la transferrine ou des anticorps CD3, qui permettent un ciblage spécifique via des récepteurs cellulaires particuliers (Kircheis *et al.*, 1997). Une sélectivité cellulaire peut être obtenue en associant les liposomes à des anticorps monoclonaux (Ahmad *et al.*, 1993, Straubinger *et al.*, 1988) ou à des protéines spécifiques (transferrine) (Kursa *et al.*, 2003).

II.2. Différentes stratégies de la thérapie génique

Les stratégies que nous allons décrire ici concernent uniquement la thérapie génique appliquée au cancer et ne constituent pas une liste exhaustive de toutes les techniques de thérapie génique envisageables à ce jour.

II.2.a. Immunothérapie génique

La transformation de cellules normales en cellules tumorales devrait faire de ces dernières des cibles préférentielles pour le système immunitaire. Or les tumeurs mettent en place des mécanismes pour échapper aux acteurs de l'immunité. Le but de l'immunothérapie génique est d'amplifier une réponse immune antitumorale et de détourner les mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire. Pour cela deux cibles sont envisageables : soit le transfert de gènes directement aux cellules tumorales, soit le transfert de gènes aux cellules présentatrices d'antigènes (notamment les cellules dendritiques).

Le transfert de gènes de cytokines tels que ceux codant pour les interleukines (IL-2, IL-4, IL-7 ou IL-12) ainsi que pour le TNF- α ou pour l'interféron- γ (INF- γ), aux cellules tumorales a pour but d'augmenter l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I à leur surface. Ceci permet une augmentation de la présentation des antigènes tumoraux aux lymphocytes T (L_T) cytotoxiques. Cela a aussi pour effet de recruter et d'activer les effecteurs du système immunitaire, qui en retour produisent des cytokines. Il y a alors présentation des antigènes tumoraux et augmentation de la réponse immunitaire. L'utilisation concomitante de molécules co-stimulatrices du système immunitaire telle que la molécule B7 provoque une activation des cellules T et la reconnaissance des antigènes tumoraux. Le transfert du gène FasL aux cellules tumorales provoque leur apoptose. La réaction inflammatoire qui en découle induit alors un effet antitumoral sur les cellules non transfectées par le gène FasL. L'autre intérêt de cette méthode est la capacité des cellules présentatrices d'antigènes (les cellules dendritiques) à intégrer les antigènes tumoraux issus des vésicules apoptotiques. Elles peuvent donc présenter ces antigènes aux L_T cytotoxiques et stimuler le système immunitaire. C'est sur ce même principe que les cellules dendritiques peuvent être directement transfectées par les gènes codant pour les antigènes tumoraux (Ribas *et al.*, 2000, Strong, 2000, Xu *et al.*, 2000).

II.2.b. Corrections des anomalies génétiques

La correction des anomalies génétiques peut se faire de deux manières : soit par inhibition et/ou ablation d'une fonction oncogénique soit par la restauration et/ou l'augmentation des fonctions des gènes suppresseurs de tumeurs.

Comme nous l'avons vu précédemment, la surexpression des oncogènes ainsi que la modification de leur expression par mutation ou par amplification génique provoque le déclenchement de processus de cancérisation. Plusieurs stratégies sont envisagées pour inhiber ou pour abolir ces fonctions oncogéniques. Des molécules antisens sont utilisées pour séquestrer les ARNm des oncogènes. L'utilisation d'ADN antisens de c-myc a permis l'inhibition de la croissance de lymphome (McManaway *et al.*, 1990). L'utilisation d'ARN antisens de k-ras a permis la réduction du potentiel tumoral de cellules de cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) *in vitro* et *in vivo* (Georges *et al.*, 1993, Mukhopadhyay *et al.*, 1991). Chez le rat, la croissance et l'invasion du cancer de la prostate ont été supprimées par l'ARN antisens de l'ILGFR-1 (« type 1 insulin-like growth factor receptor) (Zhou *et al.*, 1995). Enfin dans le cas du cancer du sein, Arteaga et son équipe ont inhibé la croissance de la tumeur et augmenté la survie des animaux traités de la même manière (Arteaga and Holt, 1996). Mais comme pour toute approche de thérapie génique, l'utilisation de molécules antisens en clinique pose le problème de leur administration. En effet pour être efficace un tel système devrait être délivré à toutes les cellules cancéreuses pour pouvoir inhiber l'oncogène cible dans chacune d'entre elles.

Une autre approche est l'utilisation de protéines mutantes. Ce processus est intéressant pour bloquer les récepteurs à tyrosine kinase amplifiés ou surexprimés dans certains cancers notamment dans le cancer du sein. Il s'agit d'intervenir sur la dimérisation du récepteur qui est nécessaire à la transduction du signal, par transfection dans une cellule d'un domaine cytoplasmique du récepteur EGF. L'hétérodimère qui en résulte est incapable de lier l'EGF. Il en résulte l'absence de transduction du signal (Kashles *et al.*, 1991). Enfin, une autre approche consiste en la modification de la localisation subcellulaire des récepteurs aux facteurs de croissance. La transfection des cellules humaines de cancer ovarien par un gène codant pour un anticorps anti ErbB2 permet une régulation négative des ErbB2 à la surface des cellules en corrélation avec une inhibition de la croissance des cellules *in vitro* et *in vivo* (Deshane *et al.*, 1994, Deshane *et al.*, 1995).

L'apparition des mécanismes de cancérisation est liée à un déséquilibre entre les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Ces derniers sont donc une cible potentielle de la thérapie génique. La transfection rétrovirale *in vitro* du gène p53 dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses humaines (poumons, foie, sein) a montré la restauration du

phénotype suppresseur par inhibition de la croissance des tumeurs (Casey *et al.*, 1991, Fujiwara *et al.*, 1993, Runnebaum and Kreienberg, 1995, Wang *et al.*, 1993). La transfection du gène Rb par rétrovirus (Casey *et al.*, 1991, Fujiwara *et al.*, 1993, Runnebaum and Kreienberg, 1995, Wang *et al.*, 1993) ou par adénovirus (Xu *et al.*, 1996) permet une inhibition de la tumorigénicité et une régression de tumeurs établies chez des souris « nude ». Enfin, et de manière plus spécifique au cancer du sein, la transfection rétrovirale du gène BRCA1 dans des cellules MCF7 ensuite implantées chez des souris « nude », inhibe le développement de la tumeur (Holt *et al.*, 1996).

II.2.c. Stratégies antiangiogéniques : exemple de l'endostatine

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'angiogenèse est le processus permettant la formation de néo-vaisseaux sanguins. L'angiogenèse est régulée par un équilibre entre facteurs pro-angiogéniques et facteurs anti-angiogéniques (tableau B1). Les stratégies anti-angiogéniques peuvent cibler les deux types de facteurs.

Il est possible de bloquer les facteurs pro-angiogéniques comme par exemple le VEGF, en utilisant des anticorps dirigés soit directement contre le VEGF soit contre son récepteur. La technique des ARN antisens est aussi utilisée. Ces trois méthodes ont montré *in vivo* chez l'animal des effets antitumoraux (Asano *et al.*, 1995, Kim *et al.*, 1993, Warren *et al.*, 1995).

Le fait que certaines tumeurs puissent inhiber l'apparition de leurs métastases, et que ces dernières se développent après la résection de la tumeur montre que les tumeurs peuvent réguler elles-mêmes leur angiogenèse en libérant des facteurs anti-angiogéniques (O'Reilly *et al.*, 1994). C'est le cas de l'endostatine. Cette protéine de 20 kDa a été mise en évidence à partir de surnageant de cellules d'hémangioendothéliome (EOMA) capables d'inhiber l'angiogenèse et la croissance tumorale (O'Reilly *et al.*, 1997). Cette protéine correspond aux 184 acides aminés de la région C-terminale du collagène XVIII. Elle est issue du clivage protéolytique du collagène XVIII par une enzyme, la cathepsin L, à la fois produite par les cellules endothéliales et par les cellules tumorales (Sorensen and Read, 2002). Des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'efficacité de l'endostatine. *In vitro*, l'endostatine a un effet inhibiteur sur les cellules endothéliales, mais n'a aucun effet sur la croissance des cellules tumorales (Boehm *et al.*, 1997, O'Reilly *et al.*, 1997). L'endostatine inhibe aussi la migration

des cellules endothéliales humaines de cordon ombilical en réponse au VEGF (Yamaguchi *et al.*, 1999). *In vivo*, les premières études ont mis en évidence l'efficacité de l'endostatine contre un certain nombre de tumeurs telles que le carcinome pulmonaire de Lewis, les fibrosarcomes ou encore le mélanome (O'Reilly *et al.*, 1997). L'injection d'endostatine sous forme plasmidique, directement dans la tumeur (modèle de carcinome mammaire chez la souris), permet une réduction du volume de la tumeur en comparaison avec les animaux témoins (Ding *et al.*, 2001). L'implantation chez l'animal, de cellules de carcinome mammaire préalablement transfectées à l'aide de rétrovirus par le gène de l'endostatine, provoque un ralentissement de la croissance des tumeurs, suivie du déclin des volume tumoraux (Indraccolo *et al.*, 2002). La même technique a été utilisée par Kurdow dans un modèle de cancer du poumon. Des résultats similaires ont été obtenus avec en plus une diminution significative des métastases pleurales (Kurdow *et al.*, 2003). Enfin, il a été mis en évidence que l'endostatine inhibe l'envahissement par les cellules endothéliales et les cellules tumorales en bloquant l'activation des métalloprotéinases de la matrice (MMP2) (Kim *et al.*, 2000). De plus des cures successives et prolongées d'endostatine n'ont mis en évidence aucun phénomène de résistance à l'endostatine (Boehm *et al.*, 1997).

II.2.d. Transfert de gène de sensibilité : exemple du système thymidine kinase/ganciclovir

Le transfert de gène de sensibilité permet de rendre des cellules cibles sensibles à des pro-drogues qui n'ont spontanément aucun effet toxique. Plusieurs gènes de sensibilité ou "gènes suicides" ont été décrits, ils sont regroupés dans le tableau B9. Les 2 gènes les plus utilisés sont le gène codant pour la cytosine désaminase (CD) (Consalvo *et al.*, 1995, Mullen *et al.*, 1992) et l'ADN complémentaire codant pour la thymidine kinase issue du virus de l'herpès simplex de type 1 ou hsv1-tk (Caruso *et al.*, 1993, Moolten, 1986).

La cytosine désaminase est une enzyme présente chez certaines bactéries et chez certains champignons, mais absente des cellules animales. Elle permet la désamination de la cytosine en uracile. Utilisée dans le cadre de la thérapie génique, elle métabolise la 5-Fluorocytosine (5-FC) en 5-Fluoro-uracil (5-FU). Le 5-FU est un agent anti-métabolite utilisé couramment en protocole de chimiothérapie. Des études ont montrées aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* l'efficacité du système CD/5-FC.

La thymidine kinase issue du virus de l'herpès de type 1 (hsv1-tk) permet la phosphorylation d'un certain nombre d'analogues nucléosidiques tels que les analogues de la guanosine : l'acyclovir (ACV) ou le ganciclovir (GCV). Ces 2 molécules sont en fait des agents anti-herpétiques utilisés lors du traitement des infections au cytomégalovirus (Faulds and Heel, 1990). Les thymidines kinases endogènes des cellules eucaryotes ont une faible affinité pour l'ACV et le GCV. De ce fait, ils sont très peu phosphorylés en temps normal. Lorsque le gène hsv1-tk est transféré dans des cellules à fort potentiel de division (des cellules cancéreuses par exemple), la thymidine kinase herpétique provoque la phosphorylation du GCV en GCV monophosphate. Sous cette forme, le GCV est alors de nouveau phosphorylé par les thymidines kinases endogènes en GCV biphosphate puis triphosphate. La forme GCV triphosphate est alors utilisée par la cellule pour la synthèse d'ADN à la place de désoxyguanosine triphosphate. La présence de GCV triphosphate inhibe la progression de l'ADN polymérase et donc l'élongation du brin d'ADN ce qui provoque la mort de la cellule.

Une des caractéristiques majeures de ce système est la présence d'un effet dit « bystander » (Bi *et al.*, 1993) qui permet la destruction des cellules cancéreuses non transfectées par le gène hsv1-tk mais se trouvant dans le voisinage de cellules qui le sont. Cet effet a été observé aussi bien *in vitro* (Culver *et al.*, 1992, Grossin *et al.*, 1999) qu'*in vivo* (Charissoux *et al.*, 1999), sur les cellules avoisinantes ainsi que sur les métastases à distance. Deux voies sont possibles pour expliquer ce phénomène : le GCV sous sa forme monophosphate pourrait passer d'une cellule à l'autre via les jonctions intercellulaires (« gap-junction » ou connexines) (Bi *et al.*, 1993, Elshami *et al.*, 1996, Mesnil *et al.*, 1996, Vrionis *et al.*, 1997). Il peut aussi y avoir relargage de vésicules apoptotiques par les cellules transfectées lors du traitement au GCV avec la mise en place *in vivo* d'une réponse immunitaire (Barba *et al.*, 1994, Freeman *et al.*, 1993).

Des résultats probants ont été obtenus à la fois *in vitro* et *in vivo*. L'efficacité du système hsv1-tk/GCV a été mise en évidence à la fois *in vitro* et *in vivo*, en utilisant plusieurs types de vecteurs de transfection. Les rétrovirus, longuement utilisés dans les premières études du système hsv1-tk/GCV, ont permis d'induire la mort de cellules de cancer du poumon en culture (Hasegawa *et al.*, 1995). L'équipe de Lambright, démontre l'efficacité *in vivo* du transfert du gène hsv1-tk par adénovirus. L'efficacité du système est d'ailleurs augmentée lorsque des cures répétées sont administrées aux animaux, même si ces derniers

sont au préalable immunisés contre l'adénovirus utilisé comme vecteur (Lambright *et al.*, 2000). L'efficacité du système peut encore être augmentée, lorsque le transfert du gène est associé à des irradiations. Valchaki a montré une meilleure réponse dans le cas de cellules de carcinome mammaire de la souris. De plus, l'efficacité est encore augmentée lorsque 3 cures successives de hsv1-tk/GCV suivie d'irradiation sont administrées à des animaux développant ces tumeurs mammaires, avec une nette diminution des métastases pulmonaires (Vlachaki *et al.*, 2001).

Afin de potentialiser ces effets observés, certaines équipes ont placé le gène hsv1-tk sous le contrôle de promoteur permettant de réguler l'expression du gène. C'est le cas par exemple de l'étude menée par Patil (Patil *et al.*, 2000). Ils ont placé le gène hsv1-tk sous le contrôle de la tétracycline, qui est activée uniquement en présence de doxycycline. Ils ont ensuite transfecté une lignée cellulaire de cancer du sein par leur construction de hsv1-tk inductible : la doxycycline permet une augmentation de 50 fois de l'expression du gène, avec une augmentation de la sensibilité des cellules au GCV. Le promoteur utilisé peut aussi être lié à une des caractéristiques des cellules tumorales. DeFatta et son équipe, ont utilisé le principe selon lequel les ARNm qui possèdent une région 5'UTR longue sont réprimés dans les cellules normales et exprimés dans les cellules tumorales. Cette variation est due à une forte expression du facteur eIF4E par les cellules tumorales, qui permet la levée de la répression sur les ARNm. Ils ont donc mis au point un ARNm hybride de hsv1-tk contenant la séquence 5'UTR du b-FGF (« basic Fibroblast Growth Factor »). Ils ont ainsi obtenu une spécificité d'action du système pour les cellules tumorales (DeFatta *et al.*, 2002). Ils ont observé des résultats similaires sur un modèle animal de tumeur mammaire (DeFatta *et al.*, 2002).

II.3. Thérapie génique et essais cliniques

La thérapie génique est à l'heure actuelle, mise à l'essai dans un certain nombre de protocoles thérapeutiques. Ces essais concernent actuellement 3496 patients dans 636 protocoles différents. La part la plus importante de ces essais cliniques concerne le cancer, pour 63,4% des essais, soit 403 protocoles, incluant 2392 malades.

Parmi les vecteurs de la thérapie génique que nous avons décrits précédemment, les rétrovirus sont les plus couramment utilisés (34,1% des essais), viennent ensuite les adénovirus (26,9%) et les liposomes (12,1%).

Les essais cliniques concernant le cancer du sein sont au nombre de 27, recensés dans le tableau B10. Seuls 4 sont à l'heure actuelle cloturés et publiés (tableau B11).

Les études menées par Hersh (Hersh, *et al.*, 1994) et Rubin (Rubin, *et al.*, 1994), n'ont pas été publiées dans la problématique du cancer du sein, mais pour les autres types de cancer qui faisaient partie de l'étude en l'occurrence le cancer colorectal. Nous ne les décrivons pas ici. En revanche, l'étude de phase I menée par Stewart (Stewart, *et al.*, 1997), comportait 8 patientes atteintes de cancer du sein (les 15 autres patients étaient atteints de mélanome). L'étude consistait en l'administration d'adénovirus délétés en E1 et E3, afin de permettre le transfert du gène de l'IL-2. Sur les 8 patientes, 2 seulement ont présenté une régression partielle au niveau du site d'injection, et 5 patientes ont présenté une inflammation locale toujours au niveau du site d'injection. L'étude menée par Sikora, consistait en l'administration intratumorale du gène de la cytosine désaminase sous contrôle du promoteur du gène erbB2 humain. Ce système permet de cibler directement les cellules cancéreuses surexprimant erbB2. Sur les 12 patientes, une efficacité de transfert a été observée chez 11 d'entre elles. Pour 2 patientes une réduction notable du volume tumoral a été observée au niveau du site d'injection.

| Investigateur | Gène | Technique de transfert |
|---------------|------------------------------------------|------------------------|
| Stewart | IL-2 | Adénovirus |
| Stewart | MDR-1 | Rétrovirus |
| Favrot | hsv1-tk | Rétrovirus |
| Sikora | CD sous contrôle d'un promoteur c-erb B2 | ADN nu |
| Economou | CYP P450 | Rétrovirus |
| Gluckman | MUC-1 et IL-2 | Pox virus |
| Cowan | MDR-1 et NeoR | Rétrovirus |
| Deisseorth | MDR-1 | Rétrovirus |
| Deisseorth | MDR-1 | Rétrovirus |
| Hersh | HLA-B7/beta2-microglobuline | Liposomes cationiques |
| Hesdorffer | MDR-1 | Rétrovirus |
| Holt | Antisens c-fos ou c-myc | Rétrovirus |
| Holt | BRCA-1 | Rétrovirus |
| Hortobagyi | E1A | Liposomes cationiques |
| Lyerly | IL-2 | Liposomes cationiques |
| O'Shaughnessy | MDR-1 | Rétrovirus |
| Rosenberg | TNF et NeoR | Rétrovirus |
| Rubin | HLA-B7/beta2-microglobuline | Liposomes cationiques |
| Urba | CD80 | Liposomes cationiques |
| Von Mehren | p53 | Adénovirus |
| Schuchter | CD80 | Adénovirus |
| Suzuki | GM-CSF | Adénovirus |
| Kufe | MUC-1 | Pox virus |
| Baynes | p53 | Adénovirus |
| Park | IL-12 | Rétrovirus |
| Cristotanilli | p53 | Adénovirus |
| Bucholz | mda7 | Adénovirus |

Tableau B10 : les essais cliniques de thérapie génique dans le cadre du cancer du sein.

| Investigateur | Nombre de patients | Phase | Références |
|---------------|--------------------|------------|---------------------------------|
| Stewart | 23 | Phase I | (Stewart, <i>et al.</i> , 1997) |
| Sikora | 12 | Phase I/II | (Pandha, <i>et al.</i> , 1999) |
| Hersh | 102 | Phase II | (Hersh, <i>et al.</i> , 1994) |
| Rubin | 28 | Phase II | (Rubin, <i>et al.</i> , 1994) |

Tableau B11 : Essais cliniques de thérapie génique cloturés du cancer du sein.

Deuxième partie

MATERIELS ET METHODES

I. Construction du plasmide pcDNA-tk

La construction d'un plasmide recombinant consiste à insérer, dans un vecteur plasmidique, une séquence d'ADN en aval d'un promoteur. Ce dernier permet l'expression de l'ADN cloné dans un système cellulaire eucaryote. L'ADN et le plasmide sont préparés séparément puis sont ligués. Le plasmide recombinant résultant est amplifié par le système cellulaire de bactéries compétentes.

I.1. Amplification du gène de la thymidine kinase à partir du plasmide pLJ-tk

L'ADNc de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex de type 1 (hsv1-tk), est amplifié par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à partir du plasmide pLJ-tk. La PCR est réalisée selon le protocole du kit « Expand High Fidelity PCR System Enzyme mix » (Roche, Meylan, France). Brièvement 100 ng du pLJ-tk sont incubés avec 2,6 U d'un mélange de 2 Taq DNA polymérases qui permet l'amplification d'ADN en limitant les erreurs. L'amplification est réalisée en présence de tampon de polymérisation 1X, de dNTP 0,2 mM (Roche) et d'amorces 0,3 µM dans un volume réactionnel de 50 µL. Les amorces utilisées dans le cadre du clonage de l'ADNc de hsv1-tk sont déterminées à l'aide du logiciel « GeneWorks ». Le plasmide pcDNA3.1+ n'est pas un vecteur de fusion, il est donc nécessaire d'utiliser des amorces intégrant une séquence d'initiation/translation dite séquence de Kozak (Kozak, 1987). Les séquences des amorces sont :

- l'amorce sens tk1 : 5'- ATC GCC ACC ATG GCT TCG TAC CCC GG -3'
- l'amorce antisens tk2 : 5'- ATC GCA GTT AGC CTC CCC CAT CT -3'

qui permettent l'amplification d'un fragment de 1135 pb.

L'amplification est effectuée dans un thermocycleur GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.) et comporte les étapes suivantes :

| | | |
|--------------|-----------------------------|-----------|
| Dénaturation | 8 min à 94 °C | 1 cycle |
| Dénaturation | 15 sec à 94°C | 10 cycles |
| Hybridation | 15 sec à 67°C | |
| Elongation | 1 min à 72 °C | |
| Dénaturation | 15 sec à 94°C | 20 cycles |
| Hybridation | 15 sec à 67°C | |
| Elongation | 1 min + 5 sec/cycle à 72 °C | |
| Elongation | 7 min à 72°C | 1 cycle |

Les produits de l'amplification sont déposés sur gel d'agarose 0,8% afin de vérifier leur taille. Pour s'assurer que le produit amplifié est bien celui attendu, nous réalisons une digestion enzymatique. Cinq µl de produit de PCR sont digérés par 10 unités de l'enzyme de restriction *SacI*, en présence de tampon de restriction 1X. La digestion doit générer deux fragments de longueur 458 pb et 677 pb. Les résultats de la digestion sont visualisés sur gel d'agarose 0,8%.

Une fois vérifiés, ces produits de PCR sont purifiés suivant le protocole du kit « Qiaquick PCR Purification Kit » (Qiagen, Courtaboeuf, France).

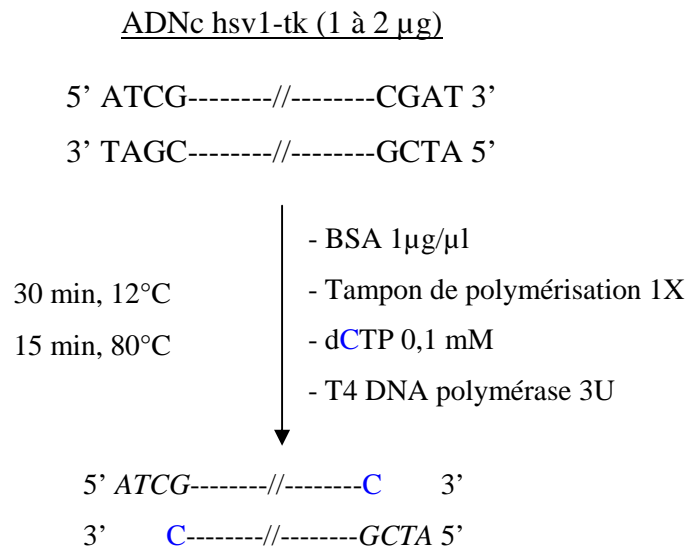
I.2. Clonage DiTrisec du gène tk dans le plasmide pcDNA3.1+

L'ADNc obtenu par PCR, ainsi que le plasmide pcDNA3.1+ (Invitrogen, Groningen, Pays Bas) sont modifiés en leurs extrémités en accord avec la méthodologie de clonage DiTrisec (Vieira and Messing, 1987). Cette technique permet de réduire les insertions non spécifiques de l'ADNc dans le vecteur de clonage.

I.2.a. Modification de l'ADNc

Les amorces utilisées pour l'amplification PCR de l'ADNc possèdent à leurs extrémités 5' 4 bases (ATCG) indépendantes de la séquence de l'HSV1-tk. Ces bases sont choisies en fonction de l'enzyme de restriction utilisée pour linéariser le plasmide. La

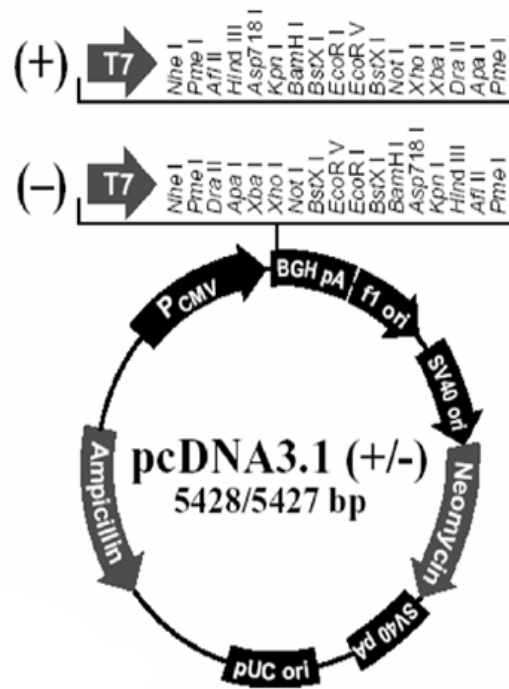
modification de l'ADNc est réalisée par la T4 DNA polymérase (Roche). Elle possède une activité 5'-3' exonucléase et une activité 3'-5' polymérase qui permettent d'obtenir un fragment d'ADNc aux extrémités compatibles avec celles du plasmide de clonage. La réaction est la suivante :



La réaction doit obligatoirement se faire dans de l'eau bidistillée à pH7. L'ADNc ainsi modifié est précipité par un mélange éthanol absolu /acétate de sodium 3mM (2,5 vol/0,1 vol), puis lavés dans l'éthanol 70%. Le culot est séché et repris par 22 µl d'eau bidistillée pH7. La concentration en acide nucléique est déterminée par spectrophotométrie.

I.2.b. Modification du plasmide

Le plasmide pcDNA3.1+ utilisé pour le clonage présente les caractéristiques suivantes :

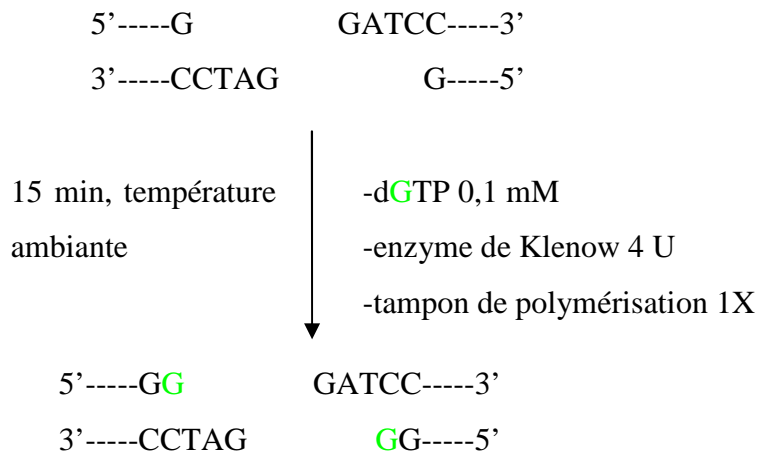


Il est modifié de la manière suivante :

- le pcDNA3.1+ (25 µg) est linéarisé par l'enzyme de restriction *Bam*HI (25 U). La réaction est réalisée à 37°C pendant 1 h. Le produit de digestion est précipité, lavé, séché de la même manière que les produits de PCR, et repris dans 20 µl d'eau bidistillée pH7. La linéarisation est vérifiée sur gel d'agarose 0,8%.

- Le plasmide ainsi linéarisé, ses extrémités sont modifiées par l'activité 5'-3' polymérase de l'enzyme Klenow (Roche) :

Plasmide linéarisé (5 µg)



La réaction s'effectue dans de l'eau bidistillée à pH7. Le plasmide ainsi modifié est précipité, lavé, séché, repris dans 20 µl d'eau bidistillée pH7. Il est dosé de la même manière que l'ADNc.

I.2.c. Ligation

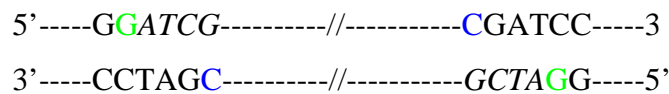
Afin de réaliser la ligation dans les meilleures conditions possibles, l'ADNc et le plasmide doivent être présents dans des proportions adéquates. Les quantités de chaque composante sont déterminées par le rapport nombre de molécules d'insert / nombre de molécules de plasmide. Le nombre de molécules/µl pour chaque acide nucléique est déterminé par la formule :

$$\frac{C \times 6,02 \cdot 10^{23}}{L \times 660}$$

où C est la concentration de l'insert (g/µl), et L la taille de l'acide nucléique en pb (5429 pb pour le pcDNA3.1+ et 1135 pb pour l'ADNc modifié de hsv1-tk). Les constantes $6,02 \cdot 10^{23}$ et 660 sont respectivement le nombre d'Avogadro et la masse d'une pb.

Trois rapports de ligation compris entre 10 et 100 sont réalisés avec les volumes nécessaires de chaque acide nucléique. La réaction se fait en présence d'1U de ligase et de tampon de

ligation 1X, 15 h à 12°C, la réaction s'effectue dans de l'eau bidistillée pH7. La séquence obtenue après ligation est la suivante :



Le plasmide recombinant pcDNA-tk généré par la ligation a une taille théorique de 6568 pb.

I.3. Amplification du plasmide pcDNA-tk

I.3.a. Transformation de bactéries compétentes

Le plasmide recombinant est amplifié par un système de bactéries *Escherichia Coli* JM.109 (Promega, Madison, U.S.A.), modifiées par le fabricant pour être compétentes. L'ensemble ADN/bactéries compétentes (60 µl) est soumis à un choc thermique, qui permet la pénétration de l'ADN dans les bactéries : 10 min d'incubation dans la glace suivies de 50 sec à 42°C puis de nouveau 2 min dans la glace. Les bactéries transformées sont mises à proliférer 1 h à 37°C sous agitation dans du milieu SOC (bacto-Tryptone 20 g/l, extrait bactérie-levure 5g/l, NaCl 8,5 mM, KCl 2,5 mM, pH7, MgCl₂ 10 mM, glucose 20 mM). Cent à 200 µl de la suspension bactérienne sont ensemencés sur des boîtes de gélose LB-agar (Luria-Broth LB : bacto-Tryptone 10 g/l, extrait bactérie-levure 5 g/l, NaCl 170 mM, pH7) contenant 0,1 mg/ml d'ampicilline comme antibiotique de sélection spécifique du plasmide pcDNA3.1+. La croissance des clones bactériens s'effectue sur la nuit à 37°C.

I.3.b. Amplification et purification de l'ADN plasmidique

I.3.b.1. Minipréparation

Le but de la minipréparation est de vérifier l'intégrité de la construction plasmidique. Les bactéries ensemencées sur les boîtes de Pétri donnent des colonies isolées. Chacune de ces colonies est prélevée et ensemencée dans 5 ml de milieu LB (10 g Tryptone, 10 g NaCl, extraits de levure 5 g, pH 7) supplémenté par 0,1 mg/ml d'ampicilline. La croissance des bactéries est déclenchée à 37°C sous agitation. Ces conditions sont maintenues durant une nuit afin d'atteindre la phase exponentielle de croissance des bactéries. La suspension

bactérienne est utilisée pour réaliser des souchiers (700 µl de suspension bactérienne, 300 µl de glycérol), conservés à -80°C. Le reste de la suspension est centrifugé à la vitesse de 4000 rpm à +4°C, et le culot bactérien est utilisé pour la purification de l'ADN plasmidique suivant le protocole du kit « High Pure Plasmide Isolation Kit™ » (Roche). Une digestion enzymatique du plasmide purifié, réalisée par l'enzyme de restriction *SmaI* génère, si l'ADNc de *hsv1-tk* est intégré correctement, 2 fragments de 1167 pb et 5401 pb. Les produits de digestion sont visualisés sur gel d'agarose 0,8%.

I.3.b.2. Maxipréparation

Cent µl du souchier correspondant au plasmide recombinant correct et identifié lors de l'étape précédente, sontensemencés dans 500 ml de LB supplémentés par 0,1 mg/ml d'ampicilline. L'ensemble est incubé une nuit à 37°C sous agitation. La suspension bactérienne est centrifugée, et l'ADN plasmidique est extrait et purifié à partir du culot selon la méthode du kit « Qiafilter » de maxipréparation (Qiagen). Comme pour la minipréparation, l'intégrité du plasmide est vérifiée par digestion enzymatique, et la séquence de l'*hsv1-tk* est contrôlée par séquençage (Genome Express, Grenoble, France).

I.3.b.3. Gigapréparation

Le principe de la gigapréparation est le même que celui de la maxipréparation, mais 2,5 L de LB/ampicilline sontensemencés à raison de 100 µl de souchier pour 500 ml de milieu de culture. L'extraction et la purification sont réalisées selon le kit « Gigaprep » (Qiagen). La gigapréparation permet de générer une grande quantité d'ADN plasmidique, nécessaire à la synthèse de liposomes cationiques. Cette synthèse est réalisée par la société Munich Biotech (MBT, Neuried, Allemagne).

I.4. Synthèse des lipoplexes

Les liposomes cationiques sont synthétisés par la société MunichBiotech, il s'agit de liposomes DOTAP/Cholestérol. Ils sont préparés suivant la technique du film lipidique : les lipides sont dissous dans du chloroforme et évaporés jusqu'à former un film lipidique qui est séché sous vide (pression de 3 à 5 mbar) à 40°C durant 60 minutes. Les lipides sont alors resuspendus dans un volume adéquat de glucose à 5%, formant une solution de vésicules

lipidiques multilamellaires. Ces vésicules sont soumises à une extrusion à travers une membrane de taille appropriée (entre 100 et 400 nm). Les lipoplexes sont réalisés en mélangeant vigoureusement des volumes égaux de liposomes cationiques préalablement préparés et la suspension d'ADN plasmidique. La concentration finale en ADN dans les complexes liposomes cationiques/ADN plasmidique est de 0,2 µg/µl.

I.5. Quantification des acides nucléiques

La concentration d'une solution d'acides nucléiques (ng/µl) est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre, (UVmc², SAFAS) selon la formule :

$$\frac{A(260) \times \epsilon \times V_T}{V_E}$$

A(260) est l'absorbance mesurée à 260 nm, V_T et V_E sont respectivement le volume total et le volume de l'échantillon et ε représente le coefficient d'extinction molaire spécifique de chaque acide nucléique : 33 pour l'ADN monocaténaire, 50 pour l'ADN bicaténaire et 40 pour l'ARN.

Le rapport A(260)/A(280) nous donne la pureté de la solution dosée (A(280) est l'estimation de la quantité de protéine dans l'échantillon). Il doit être supérieur à 1,8 pour les ADN et à 2 pour les ARN.

I.6. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les ARN ou ADN sont dilués dans du tampon échantillon 6X (bleu de bromophénol 2,5 mg/ml, glycérol 60%, eau bidistillée 40%), et sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose dans du tampon TAE (TAE 50X : Tris-HCl 0,5 M, acide acétique 50 mM, EDTA 50 mM, pH 7,4) et en présence de bromure d'éthidium (BET) 0,5 mg/ml. Le BET s'intercale entre les bases des acides nucléiques et permet leur visualisation lors de l'irradiation par les UV. La concentration des gels d'agarose est variable de 0,8% pour les fragments compris entre 500 et 2000 pb jusqu'à 2% pour les fragments de plus petite taille.

II. Culture cellulaire

II.1. Culture des différentes lignées cellulaires

II.1.a. Lignée MDA-MB-231

Les cellules MDA-MB-231 sont des cellules d'adénocarcinome mammaire humain non-hormonodépendant. Elles ont été isolées à partir d'effusion pleurale chez une femme caucasienne de 51 ans (ECACC). Elles sont de type morphologique « epithelial-like » (Cailleau *et al.*, 1974).

Ce sont des cellules adhérentes en monocouche, cultivées en milieu DMEM (Invitrogen) supplémenté de sérum de veau fœtal 10% (SVF, BioWhitaker, Verviers, Belgique), de glutamine 2 mM et d'une solution de pénicilline (100 µg/ml) / streptomycine (100 UI/ml), (Invitrogen). La culture s'effectue à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO₂.

Lorsque les cellules atteignent la confluence, elles sont soumises à trypsination. Les cellules sont lavées par du tampon phosphate salin stérile 1X (PBS 1X) (NaCl 140 mM, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, pH 7,4) et incubées 10 à 15 min à 37°C en présence de la solution de trypsine-EDTA (Invitrogen). Les cellules dissociées sont centrifugées puis reprises dans le milieu DMEM complet et ensemencées en flacons de culture stériles.

En dehors des cultures les cellules sont conservées sous forme congelée : après trypsination et centrifugation, le culot cellulaire est resuspendu par du milieu DMEM supplémenté par 20% de SVF et 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO). Le culot est resuspendu à raison de 5.10⁶ cellules/ml, et placé à -80°C.

II.1.b. Lignée HT29 cl. 19A

Les cellules HT29 sont des cellules humaines de cancer du colon isolées à partir d'une tumeur primaire. La lignée est décrite comme un adénocarcinome du colon humain modérément différencié de grade II. En 1984, Augeron et Laboisse ont décrit l'émergence d'un clone cellulaire différencié de façon permanente à partir de traitement des cellules HT29 par du butyrate de sodium, notamment le clone 19A (Augeron and Laboisse, 1984). La lignée HT29 cl. 19A est obtenue par M. Laboisse (INSERM U239 Paris).

II.2. Courbes de croissances et de cytotoxicité

II.2.a. Courbe de croissance des cellules MDA-MB-231

Les cellules MDA-MB-231 sont évaluées pour leur croissance par incubation avec du Methyl Thiazol Tetrazolium (MTT) selon Mosmann (Mosmann, 1983). Les déhydrogénases mitochondriales des cellules vivantes métabolisent le tétrazolium. Les métabolites se présentent sous forme de cristaux de formazan de couleur bleu, solubles dans le DMSO et quantifiables sous cette forme par spectrophotométrie.

Les cellules sontensemencées en plaques 96 puits à raison de 500, 1000, 1500, 2000 et 2500 cellules par puits. Chaque densité estensemencée dans 8 puits. A J1 après l'ensemencement, le MTT est ajouté dans les puits à la concentration de 0,5 mg/ml. Les cellules sont incubées 2 h à 37°C, ensuite la solution milieu/MTT est retiré des puits et remplacé par 100 µl de DMSO afin de dissoudre les cristaux de formazan. La réaction colorimétrique est lue par un lecteur de plaques ELISA (Multiscan EX, Labsystems, Helsinki, Finlande) à 540 nm et 690 nm. Cette lecture est réalisée tous les 2 jours pendant 11 jours, et les valeurs de DO sont reportées en fonction des jours de culture. Les valeurs de DO sont données par la formule :

$$DO = DO_{540nm} - DO_{690nm}$$

II.2.b. Courbes de cytotoxicité des cellules MDA-MB-231 au GCV

Les cellules MDA-MB-231 sont testées pour leur sensibilité au ganciclovir (GCV, Cymévan, Roche). Ceci permet de déterminer l'IC₅₀ qui est la concentration en GCV

nécessaire pour tuer 50% des cellules. L'IC₅₀ est déterminée à 8 jours. Les cellules sontensemencées à la densité de 3250 cellules par cm². A J1 après ensemencement les cellules sont mises en présence de différentes concentrations de GCV (0 ; 0,1 ; 0,4 ; 0,8 ; 1 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 ; 10 ; 100 et 1000 µM). Le milieu GCV est renouvelé tous les 2 jours. Au bout de 8 jours, le test MTT est réalisé. Les puits n'ayant pas reçu de GCV représentent 100% de survie et servent de références pour les autres concentrations. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie selon la formule :

$$\frac{(\text{DO } 540 - \text{DO } 690) \text{ échantillon} \times 100}{(\text{DO } 540 - \text{DO } 690) \text{ témoin}}$$

II.2.c. Efficacité du système hsv1-tk/GCV sur la lignée MDA-MB-231

L'efficacité du système hsv1-tk/GCV est vérifiée en transfectant les cellules MDA-MB-231 à l'aide de liposomes cationiques. Trois types de liposomes sont testés : les liposomes seuls, les liposomes contenant le plasmide vide (liposomes pcDNA3.1+) et les liposomes contenant le plasmide recombinant (liposomes pcDNA-tk). Les liposomes pcDNA3.1+ et pcDNA-tk sont utilisés à la concentration de 0,2 µg d'ADN /µl de liposome.

Les cellules MDA-MB-231 sontensemencées à la densité de 3250 cellules par cm² dans des plaques 24 puits. Quarante huit heures après l'ensemencement, le milieu de culture est éliminé des puits et remplacé par du milieu sans SVF. Différents volumes de liposomes correspondant à 0,4 ; 0,6 ; 1 ; 2 et 5 µg d'ADN par puits, sont ajoutés goutte à goutte au milieu de culture. Les cellules sont incubées 1 h à 37°C. Le milieu contenant les liposomes est éliminé et les cellules sont lavées 2 fois au PBS 1X, puis mises en culture en présence de plusieurs concentrations de GCV (0 ; 0,1 ; 1 ; 10 ; 100 et 1000 µM). L'opération est répétée une seconde fois au bout de 72 h. Trois jours après la seconde transfection, un test MTT est réalisé. Contrairement aux courbes de croissance précédemment réalisées, la lecture se fait à l'aide d'un spectrophotomètre par mesure des absorbances à 540 nm et 690 nm, afin de pouvoir appliquer la formule précédemment donnée dans le paragraphe II.2.a.

II.3. Accumulation du 18-FDG et du ^{99m}Tc-MIBI par les cellules MDA-MB-231

Le 18(F)-Fluoro-2-Deoxyglucose (18(F)-FDG, Flucis, CIS bio International, France) et le Technetium-99m Methoxyisobutylisonitrile (^{99m}Tc-MIBI, Flucis) sont deux traceurs utilisés couramment en médecine nucléaire pour la détection de diverses tumeurs. Leurs modes de fonctionnement seront détaillés plus loin.

Nous avons voulu déterminer la cinétique d'accumulation de chacun de ces 2 traceurs dans les cellules MDA-MB-231. Les cellules sontensemencées en plaques 96 puits à raison de 10 000 cellules par puits. La cinétique est réalisée pour chaque traceur à 30, 60, 120 et 300 min. Douze puits sontensemencés pour chaque temps. Les cellules sont mises en culture dans le milieu DMEM complet. Au bout de 48 heures, le milieu des puits destinés à la cinétique d'accumulation du 18(F)-FDG est remplacé par du milieu RPMI 1640 à faible teneur en glucose. Six heures après, 3 µCi de 18(F)-FDG (dilué dans du PBS 1X) sont ajoutés à chaque puits de culture. A chaque temps de lecture les 12 puits sont trypsinés, 2 sont réservés au comptage des cellules par exclusion au bleu de Trypan, les 10 autres sont utilisés pour déterminer le taux d'accumulation du 18(F)-FDG dans les cellules. Chaque puits est rincé 2 fois au PBS 1X après trypsination et le produit des rinçages est ajouté aux cellules afin de bien récupérer toute la radioactivité. Le même principe est appliqué pour la cinétique d'accumulation du ^{99m}Tc-MIBI qui est ajouté à raison de 3 µCi par puits. Contrairement à la cinétique du 18(F)-FDG, les cellules sont maintenues dans du milieu DMEM complet. La radioactivité est déterminée à l'aide d'un compteur gamma (compteur Cobra 5003, Packard Instrument S.A., Rungis, France).

III. Détermination du statut MDR

Le statut de la « Multi Drug Resistance » est ici déterminé de manière qualitative pour les 2 principaux gènes liés à ce phénomène : le gène *mrp1* codant pour la protéine P-gp et *mdr1*, pour la protéine MDR1. La détermination se fait par la technique de RT-PCR, les ARN étant extraits à partir de culots cellulaires.

III.1. Extraction des ARN totaux

Les ARN sont extraits suivant le protocole du kit « TriPure Isolation Reagent™ » (Roche) à partir de plusieurs lignées cellulaires : des cellules HT29 connues pour exprimer naturellement le gène *mrp1*, des cellules A549 exprimant le gène *mdr1* et des cellules MDA-MB-231 dont nous voulons déterminer le statut, les 2 premières lignées servent de contrôle positif. La solution de TriPure est ajoutée au culot cellulaire (1ml/10⁶ cellules). Les cellules sont incubées 5 min à température ambiante afin d'être complètement lysées et pour dissocier les complexes nucléoprotéiques. L'addition de chloroforme (0,2 ml/ml de TriPure), suivie d'une étape de centrifugation permet l'apparition d'une phase aqueuse supérieure dans laquelle sont contenus les ARN totaux. Ces derniers sont récupérés et précipités à froid en présence d'isopropanol et lavés dans de l'éthanol 70%. Les culots sont séchés puis repris dans 20 µl d'eau traitée au diéthyl pyrocarbonate (DEPC). La qualité des ARN est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% et les ARN sont dosés par spectrophotométrie comme décrit précédemment.

III.2. Transcription inverse

La réaction de transcription inverse (RT) permet de transcrire l'ARN en ADN complémentaire (ADNc). Cette réaction est possible grâce à une enzyme, la transcriptase inverse, en présence d'un oligo dT. Ce dernier a la capacité de s'hybrider avec la queue polyA des ARNm eucaryotes. L'ADNc est synthétisé selon le protocole du kit « Omniscript™ Reverse Transcriptase » (Qiagen). Un µg d'ARN totaux est incubé avec 4 U de transcriptase inverse, 10 U de « RNase » out (un inhibiteur de RNase, Invitrogen), 1 µM d'oligo dT, 0,5

mM de dNTP et du tampon de transcription 1X dans de l'eau traitée DEPC. L'incubation est de 60 min à 37°C puis 5 min à 93°C.

III.2. Réactions de PCR

L'ADNc obtenu après la RT est amplifié par PCR. Deux µl de produit de RT sont incubés avec 1,25 U de la polymérase AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, USA), en présence de tampon de polymérisation 1X, de MgCl₂ 2 mM, de dNTP 0,2 mM et d'amorces 0,2 µM dans un volume réactionnel de 50 µl. Les amorces utilisées sont les suivantes (Kamazawa *et al.*, 2002):

✓ amorces spécifiques *mdr1* (T_m : 53°C) :

sens : 5'-ACACCCGACTTACAGATGATGTCT-3'

antisens : 5'-CGAGATGGGTAAGTGAACAT-3'

✓ amorces spécifiques *mrp1* (T_m : 56°C) :

sens : 5'-AGTGACCTCTGGTCCTTAAACAAGG-3'

antisens : 5'-GAGGTAGAGAGCAAGGATGACTTGC-3'

Ces amorces permettent l'amplification de fragments de tailles respectives de 623 pb et 657 pb. Les amplifications sont réalisées sur un thermocycleur GeneAmp 9700 (Perkin Elmer) et comportent les étapes suivantes :

| | | |
|--------------|-------------------------------------|-----------|
| Dénaturation | 10 min à 95 °C | 1 cycle |
| Dénaturation | 15 sec à 95°C | 35 cycles |
| Hybridation | 15 sec au T _m spécifique | |
| Elongation | 30 sec à 72 °C | |
| Elongation | 7 min à 72°C | 1 cycle |

Les produits de PCR sont ensuite déposés sur gel d'agarose 0,8%.

IV. Mise au point d'un modèle animal de tumeur mammaire

Afin de travailler dans des conditions se rapprochant le plus possible de la clinique humaine, nous avons voulu mettre au point un nouveau modèle animal. Il consiste en l'injection de cellules humaines de cancer du sein chez des animaux immunocompétents. L'évolution des animaux est suivie par différentes techniques d'imagerie médicales. Après le sacrifice des animaux, les tumeurs sont prélevées et des études anatomopathologiques sont réalisées.

IV.1. Animaux

Les animaux, des rats Sprague-Dawley femelles de 4 semaines (élevage Depré) sont anesthésiés à l'aide d'un appareil spécialement conçu pour les animaux de petite taille (Minerve), délivrant un mélange oxygène/isoflurane (1-chloro-2,2,2-trifluoroéthyl difluorométhyl éther). Ils sont ensuite épilés sur la zone abdominale gauche, afin de mettre en évidence la mamelle. Les cellules MDA-MB-231 sont alors injectées dans la mamelle (10^7 cellules dans 100 μ l de PBS 1X pour 1 animal). Afin de prévenir le rejet de ces cellules d'origine humaine par le système immunitaire des animaux, ces derniers sont traités quotidiennement par des injections intrapéritonéales de cyclosporine A 35 mg/kg (CysA, Sadimunn, Novartis). Les animaux sont surveillés quotidiennement afin de déterminer la prise tumorale et la prise de poids. Dès 5 à 7 jours les tumeurs sont palpables et sont mesurées selon 2 dimensions à l'aide d'un pied à coulisse. Le volume de la tumeur est calculé selon la formule établie par Carlsson (Carlsson *et al.*, 1983):

$$V = \frac{1}{2} \cdot a \cdot b^2$$

où a est le plus long diamètre et b le plus petit diamètre.

IV.2. Imagerie médicale

Deux méthodes d'imagerie médicale fonctionnelles sont réalisées sur les animaux : (18F)-Fluoro-2-Deoxyglucose clinical Coincidence Detection Emission Tomography (FDG-CDET) and Technetium-99m Methoxyisobutylisonitrile (^{99m}Tc -MIBI) scintigraphy.

IV.2.a. PET Scan au 18(F)-FDG

Le 18(F)-FDG est un analogue du glucose, phosphorylé en 18(F)-FDG-6-phosphate par les hexokinases cellulaires. Ce composé ainsi obtenu ne peut plus être métabolisé par les cellules et s'accumule dans ces dernières. Cette accumulation permet de visualiser les organes possédant des cellules à forte activité métabolique, c'est le cas du cerveau, du coeur ou encore des tumeurs. L'activité métabolique d'une tumeur est corrélée à sa fixation de 18(F)-FDG, et c'est pourquoi des changements métaboliques peuvent apparaître et être visualisés avant même la détection de modifications morphologiques (Amano *et al.*, 1998, Som *et al.*, 1980).

Après 10 à 12 heures de diète, 37 MBq (1 mCi) de 18(F)-FDG sont injectés dans la veine caudale des rats placés sous anesthésie. Cinq heures après l'injection, les tomoscintigraphies des animaux anesthésiés sont réalisées à l'aide d'une caméra gamma à double tête (Axis, Philips Medical System, USA). Après 30 minutes d'acquisition en 2 dimensions, les données sont numérisées sans correction d'atténuation et reconstruites en utilisant une méthode itérative (EMML : 20 itérations). Les images peuvent être visualisées en coupes coronales, sagittales et axiales de 2,2 mm.

IV.2.b. La scintigraphie au ^{99m}Tc MIBI

Le ^{99m}Tc -MIBI est un radiotraceur de perfusion utilisé pour obtenir des images en cardiologie et en cancérologie (cancers du cerveau et du sein). L'accumulation du ^{99m}Tc -MIBI dans les cellules est due au potentiel électrique généré au travers des membranes des mitochondries. Comme les cellules tumorales possèdent un potentiel membranaire encore plus négatif, il y a une forte accumulation du traceur dans ces cellules (Kao *et al.*, 1998, Prats *et al.*, 1999).

Pour réaliser les scintigraphies, les animaux reçoivent 55 MBq de ^{99m}Tc MIBI dans la veine caudale. Ils sont placés à la surface de la caméra gamma (Axis) équipée d'un

collimateur à faible énergie. Des images dynamiques de 20 images par minute (128×128) sont réalisées. A 30 et 75 minutes, des images statiques sont réalisées avec des images de 5 minutes.

IV.3. Etudes anatomopathologiques

Les organes prélevés lors de l'autopsie sont fixés pendant au moins 24 heures dans une solution de formol-zinc (sulfate de zinc 3 g, formaldéhyde du commerce 36-40% 100 ml, chlorure de sodium 9 g, eau du robinet 900 ml). Les zones d'intérêt sont ensuite prélevées, incluses en paraffine à 56°C, après déshydratation des tissus dans des bains d'alcool de degré croissant et substitution dans un bain de toluène pendant la nuit. Le bloc d'inclusion en paraffine contenant le prélèvement tissulaire a été ensuite coupé à 4 µm d'épaisseur au microtome, déposé à 56 °C sur une lame de verre préalablement encollée, et séchée à l'étuve à 37°C. Les coupes tissulaires sont ensuite colorées par l'hématéine-éosine-safran et examinées au microscope optique.

V. Protocoles de traitement des animaux

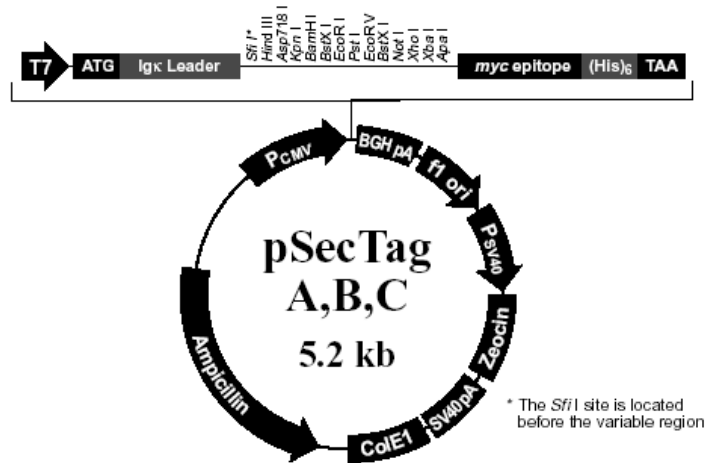
Deux stratégies thérapeutiques sont appliquées aux animaux : la stratégie antiangiogénique avec l'administration d'endostatine et la stratégie par transfert de gène de sensibilité avec l'administration du gène suicide hsv1-tk couplée à des injections de GCV. Les différents traitements sont administrés sous forme de lipoplexes. Les traitements s'effectuent en parallèle d'un groupe témoin ne recevant aucune forme de thérapie afin de s'assurer de la validité de la manipulation. Durant toute la période de traitement, les animaux sont maintenus sous CysA, afin d'éviter tout rejet de la tumeur.

V.1. Protocole hsv1-tk/ganciclovir

Cinq groupes de 5 animaux sont nécessaires à la réalisation de ce protocole. Les groupes sont détaillés dans le tableau suivant. Le GCV est administré quotidiennement à la dose de 150 mg/kg. Les injections de GCV débutent en même temps que les injections de liposomes. Les injections de 1,2 ml de lipoplexes sont réalisées dans la veine de caudale, à raison de 3 injections par semaine. Chaque injection correspond à une administration de 240 µg d'ADN. Ces conditions sont celles décrites par la société Munichbiotech, 1,2 ml étant le volume de liposomes pouvant être injecté au animaux sans effet toxique et les 240 µg d'ADN étant la quantité maximale pouvant être encapsulée dans 1,2 ml de liposomes. Le protocole de traitement est de 3 semaines, et est détaillé dans le tableau M1.

V.2. Protocole endostatine

Au laboratoire nous disposons du gène de l'endostatine, cloné dans un plasmide de sécrétion : le pSecTag2C (don de T.Bachelot, Lyon). Ce plasmide, dont la carte est représentée ci-dessous, possède une séquence de sécrétion IgK, en amont de son multisite de clonage, et en aval de celui-ci un épitope myc.



Le clonage a été réalisé comme décrit précédemment pour le plasmide recombinant pcDNA-tk. La séquence codante de l'endostatine est mise en phase avec avec la séquence sécrétoire de manière à ce que la protéine une fois synthétisée par les cellules puisse être excrétée hors de ces dernières. La séquence d'endostatine utilisée a été isolée à partir de foie de souris. Le produit de clonage est appelé pSecEndostatine. Les plasmides pSecEndostatine et pSecTag2c sont amplifiés par gigapréparation comme décrit précédemment, afin de pouvoir obtenir une quantité d'ADN nécessaire à la synthèse de liposomes cationiques (réalisée par la société Munichbiotech). Pour ce protocole, 10 animaux sont greffés et sont répartis en 2 groupes : 5 rats reçoivent les lipoplexes pSecEndostatine et les 5 autres reçoivent les lipoplexes pSecTag2c. Le protocole est détaillé dans le tableau M1.

V.3 Etudes statistiques

Des études statistiques sont réalisées afin de déterminer si les différences observées au sein des différents groupes sont significatives. Le test utilisé est la loi de Student permettant la comparaison de deux moyennes.

| GROUPE | TYPE D'INJECTION | FREQUENCE |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <i>PROTOCOLE hsv1-tk/GCV</i> | | |
| <i>Groupe GCV</i> | Injection I.P. de GCV à 150 mg/kg | Tous les jours |
| <i>Groupe pcDNA3.1+</i> | Injection I.V. de lipoplexes (240 µg) | 3 fois par semaine |
| <i>Groupe pcDNA3.1+/GCV</i> | Injections I.V. de lipoplexes (240 µg) Injection I.P. de GCV (150 mg/kg) | GCV : tous les jours Liposomes : 3 fois par semaine |
| <i>Groupe pcDNA-tk</i> | Injection I.V. des lipoplexes (240 µg) | 3 fois par semaine |
| <i>Groupe pcDNA-tk/GCV</i> | Injections I.V. de liposomes (240 µg) Injection I.P. de GCV (150 mg/kg) | GCV : tous les jours Liposomes : 3 fois par semaine |
| <i>PROTOCOLE Endostatine</i> | | |
| <i>Groupe pSecTag2C</i> | Injection I.V. de lipoplexes (240 µg) | 3 fois par semaine |
| <i>Groupe pSecEndostatine</i> | Injection I.V. de lipoplexes (240 µg) | 3 fois par semaine |

Tableau M1 : Protocole de traitement des animaux répartis dans deux études : thérapie génique par gène suicide, thérapie génique antiangiogénique.

Troisième partie
RESULTATS

I. Construction du plasmide pcDNA-tk

I.1. Amplification du gène hsv1-tk

L'amplification par PCR du gène de l'hsv1-tk est réalisée à partir du plasmide pLJ-tk (don du Pr Klatzmann). Les amorces spécifiques utilisées permettent l'insertion, en amont du codon initiateur de traduction, de la séquence de Kozak nécessaire à l'expression du gène. Le produit de PCR est vérifié sur gel d'agarose 0,8%, et est caractérisé par un fragment d'une taille de 1135 pb (figure R1). Le profil de digestion enzymatique par *SacI* confirme qu'il s'agit bien du gène hsv1-tk : 2 fragments de 458 et 677 pb sont obtenus après la digestion enzymatique (figure R1).

I.2. Vérification de la construction plasmidique

I.2.a. Vérification par digestion enzymatique

L'ADN plasmidique obtenu à partir des différentes colonies bactériennes est analysé par digestion enzymatique, afin d'identifier un vecteur recombinant pcDNA-tk correct. Sur 21 colonies testées, une ne contient aucun ADN plasmidique, 12 présentent le plasmide avec l'insert antisens et 8 avec l'insert sens. Le profil de digestion enzymatique par *SmaI* confirme le sens d'insertion de l'ADNc dans le pcDNA3.1+. Lorsque l'ADNc est inséré dans le sens correct, l'ADN plasmidique présente 2 fragments de taille 1167 et 5401 pb. Le profil de digestion présenté sur la figure R2 est celui correspondant à 1 des 8 clones avec la bonne insertion.

I.2.b. Vérification par séquençage

La séquence obtenue de la société GenomeExpress après séquençage est alignée contre la séquence de l'hsv1-tk d'une banque de donnée, publiée par Saijo (Saijo *et al.*, 1999). Les deux séquences sont identiques excepté deux bases : en position 933 de notre séquence un C est séquencé alors que la séquence de la banque comporte un T. En position 1083 c'est un C

qui est séquencé au lieu d'un A dans la séquence de la banque (figure R3). Cependant après vérification, ces deux modifications n'entraînent pas de changement de la séquence protéique. Nous pouvons donc considérer que notre clonage est correct.

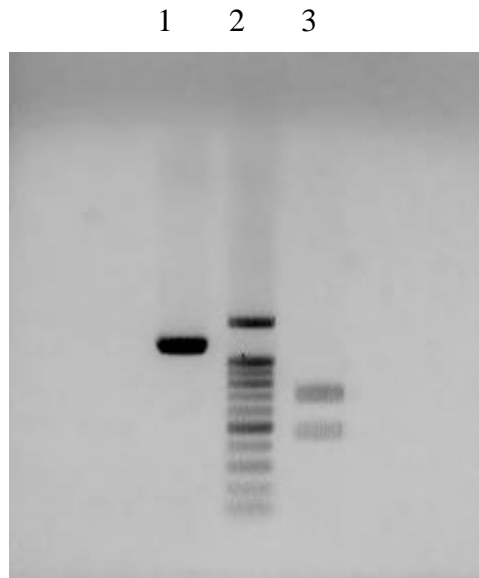


Figure R1 : Vérification du produit de l'amplification du gène hsv1-tk par PCR.

Piste 1 : produit de PCR ; Piste 2 : poids moléculaire 100 pb ; Piste 3 : produit de PCR digéré par l'enzyme de restriction *SacI*.

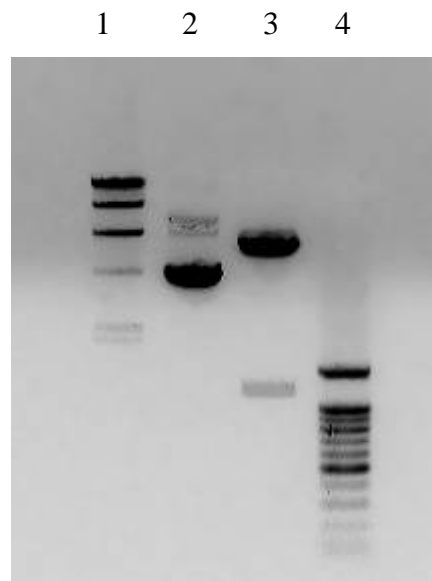


Figure R2 : Vérification du sens d'insertion de l'ADNc de hsv1-tk dans le plasmide pcDNA3.1+.

Piste 1 : poids moléculaire λ *HindIII* ; Piste 2 : plasmide pcDNA-tk ; Piste 3 : plasmide pcDNA-tk digéré par l'enzyme de restriction *SmaI* ; Piste 4 : poids moléculaire 100 pb.

| | | |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| pcDNA-tk | CGAGCTCGGA TCGCCACCAT GGCTTCGTAC CCTGCCATC AACACGCGTC | 50 |
| Saijo M pcDNA-tk | TGCGTTCGAC CAGGCTGCGC GTTCTCGCGG CCATAGCAAC CGACGTACGG TGCGTTCGAC CAGGCTGCGC GTTCTCGCGG CCATAGCAAC CGACGTACGG | 82 100 |
| Saijo M pcDNA-tk | CGTTCGCCCC TCGCCGCGAG CAAGAAGCCA CGGAAGTCCG CCTGGAGCAG CGTTCGCCCC TCGCCGCGAG CAAGAAGCCA CGGAAGTCCG CCTGGAGCAG | 132 150 |
| Saijo M pcDNA-tk | AAAAATGCCA CGCTACTGCG GGTTTATATA GACGGTCTCT ACGGGATGGG AAAAATGCCA CGCTACTGCG GGTTTATATA GACGGTCTCT ACGGGATGGG | 182 200 |
| Saijo M pcDNA-tk | GAAAACCACC ACCACGCAAC TGCTGGTGGC CCTGGGTTCG CGCGACGATA GAAAACCACC ACCACGCAAC TGCTGGTGGC CCTGGGTTCG CGCGACGATA | 232 250 |
| Saijo M pcDNA-tk | TCGTCTACGT ACCCGAGCCG ATGACTTACT GGCAGGTGCT GGGGGCTTCC TCGTCTACGT ACCCGAGCCG ATGACTTACT GGCAGGTGCT GGGGGCTTCC | 282 300 |
| Saijo M pcDNA-tk | GAGACAATCG CGAACATCTA CACCACACAA CACCGCCTCG ACCAGGGTGA GAGACAATCG CGAACATCTA CACCACACAA CACCGCCTCG ACCAGGGTGA | 332 350 |
| Saijo M pcDNA-tk | GATATCGGCC GGGGACGCGG CGGTGGTAAT GACAAGCGCC CAGATAACAA GATATCGGCC GGGGACGCGG CGGTGGTAAT GACAAGCGCC CAGATAACAA | 382 400 |
| Saijo M pcDNA-tk | TGGGCATGCC TTATGCCGTG ACCGACGCCG TTCTGGCTCC TCATATCGGG TGGGCATGCC TTATGCCGTG ACCGACGCCG TTCTGGCTCC TCATATCGGG | 432 450 |
| Saijo M pcDNA-tk | GGGAGGCTG GGAGCTCACA TGCCCGCCCC CCGGCCCTCA CCTTCATCTT GGGAGGCTG GGAGCTCACA TGCCCGCCCC CCGGCCCTCA CCTTCATCTT | 482 500 |
| Saijo M pcDNA-tk | CGACCCGCAT CCCATCGCCG CCTTCCTGTG CTACCCGGCC GCGGATACC CGACCCGCAT CCCATCGCCG CCTTCCTGTG CTACCCGGCC GCGGATACC | 532 550 |
| Saijo M pcDNA-tk | TTATGGGCAG CATGACCCCC CAGGCCGTGC TGGCGTTCGT GGCCTCATC TTATGGGCAG CATGACCCCC CAGGCCGTGC TGGCGTTCGT GGCCTCATC | 582 600 |
| Saijo M pcDNA-tk | CCGCCGACCT TGCCCGCAC AAACATCGTG TTGGGGGCC TTCCGGAGGA CCGCCGACCT TGCCCGCAC AAACATCGTG TTGGGGGCC TTCCGGAGGA | 632 650 |
| Saijo M pcDNA-tk | CAGACACATC GACCGCCTGG CCAACGCCA GCGCCCGGC GAGCGGCTTG CAGACACATC GACCGCCTGG CCAACGCCA GCGCCCGGC GAGCGGCTTG | 682 700 |
| Saijo M pcDNA-tk | ACCTGGCTAT GCTGGCCGCG ATTGCGCGG TTTACGGGCT GCTTGCCAAT ACCTGGCTAT GCTGGCCGCG ATTGCGCGG TTTACGGGCT GCTTGCCAAT | 732 750 |
| Saijo M pcDNA-tk | ACGGTGCAGT ATCTGCAGGG CGGCGGCTCG TGGCGGGAGG ATTGGGGACA ACGGTGCAGT ATCTGCAGGG CGGCGGCTCG TGGCGGGAGG ATTGGGGACA | 782 800 |
| Saijo M pcDNA-tk | GCTTTCGGGG ACGGCCGTGC CGCCCAAGG TGCCGAGCCC CAGAGCAACG GCTTTCGGGG ACGGCCGTGC CGCCCAAGG TGCCGAGCCC CAGAGCAACG | 832 850 |
| Saijo M pcDNA-tk | CGGGCCACG ACCCCATATC GGGACACGT TATTTACCCT GTTTCGGGCC CGGGCCACG ACCCCATATC GGGACACGT TATTTACCCT GTTTCGGGCC | 882 900 |
| Saijo M pcDNA-tk | CCCGAGTGC TGGCCCCAA CGCGACCTG TAAACGTGT TTGCCTGGG CCCGAGTGC TGGCCCCAA CGCGACCTG TAAACGTGT TTGCCTGGG | 932 950 |
| Saijo M pcDNA-tk | CTTGGACGTC TTGGCCAAAC GCCTCCGTCC CATGCACGTC TTTATCCTGG CTTGGACGTC TTGGCCAAAC GCCTCCGTCC CATGCACGTC TTTATCCTGG | 982 1000 |
| Saijo M pcDNA-tk | ATTACGACCA ATCGCCCGCC GGCTGCCGGG ACGCCCTGCT GCAACTTACC ATTACGACCA ATCGCCCGCC GGCTGCCGGG ACGCCCTGCT GCAACTTACC | 1032 1050 |
| Saijo M pcDNA-tk | TCCGGGATGG TCCAGACCCA CGTCACCACC CCGGCTCCA TACCGAGGAT TCCGGGATGG TCCAGACCCA CGTCACCACC CCGGCTCCA TACCGAGGAT | 1082 1100 |
| Saijo M pcDNA-tk | CTGGGACCTG GCGCGCACGT TTGCCCGGA GATGGGGG - - - - - CTGGGACCTG GCGCGCACGT TTGCCCGGA GATGGGGG GCTAACTGG | 1120 1150 |
| Saijo M pcDNA-tk | ----- ATCCAAGTAGT GCCAGTGTGG TGAATTCTG CAGATATCCA GCACAGTGGC | 1120 1200 |

Figure R3 : Alignement de la séquence de l'ADNc cloné du plasmide pcDNA-tk avec la séquence de la banque de données décrite par Saijo (Saijo *et al.*, 1999).

II. Etude des cellules MDA-MB-231

II.1. Aspect morphologique

Les cellules MDA-MB-231 sont des cellules adhérentes, de type épithéliales. Leur croissance est de type monocouche. A faible densité (figure R4a), elles présentent une forme très allongée et granulaire. A confluence, elles présentent une forme pavimenteuse, et ont une légère tendance à se chevaucher (figure R4b).

II.2. Courbe de croissance

Le profil de croissance des cellules MDA-MB-231 est réalisé sur une période de 11 jours, à l'aide de tests au MTT réalisés un jour sur deux. Différentes densités cellulaires sont testées. Les résultats sont présentés sur la figure R5. Les différentes courbes nous permettent d'obtenir les 3 phases caractéristiques des cellules en croissance : la phase de latence, la phase de croissance exponentielle et la phase de plateau (ou phase d'arrêt de la croissance). Ces trois phases sont obtenues pour toutes les densités testées. Cependant, les profils de chaque phase varient en fonction du nombre de cellules initialementensemencé. En effet, plus la densité cellulaire de départ est importante, plus la phase de latence est courte, voir nulle : pour la densité 8125 cellules par cm^2 , les cellules semblent entrer directement en phase exponentielle. De la même manière pour les densités les plus importantes, la phase de plateau est atteinte plus rapidement. La densité cellulaire que nous allons utiliser pour la suite des expérimentations, est la densité de 3250 cellules par cm^2 . Ensemencées de telle sorte, les cellules présentent le profil de croissance le mieux adapté avec une phase de latence de 24 heures et surtout une phase exponentielle de 5 jours nous permettant de réaliser la suite des expérimentations.

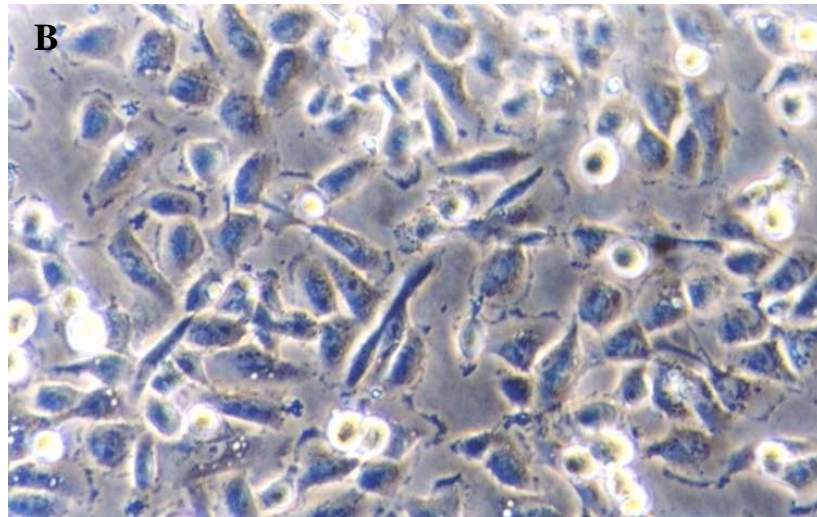
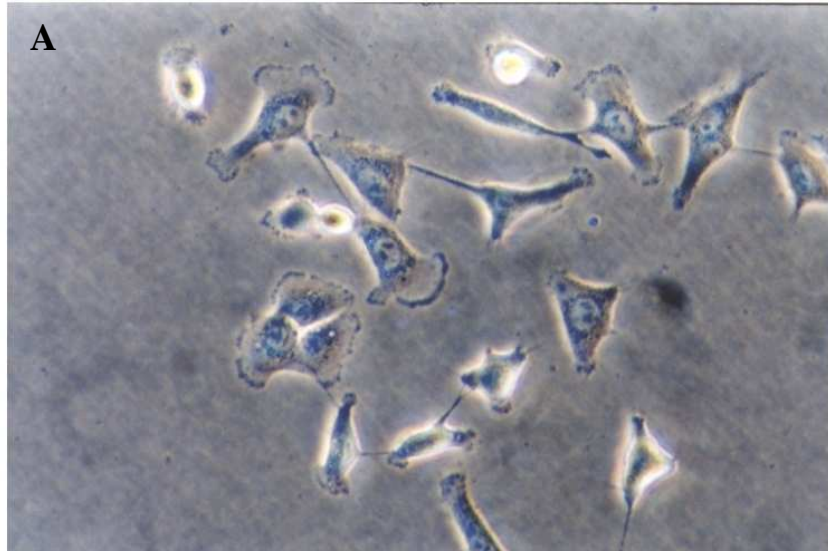


Figure R4 : Morphologie des cellules MDA-MB-231 en culture, A : cellules en culture de routine, B : cellules à confluence. Grossissement

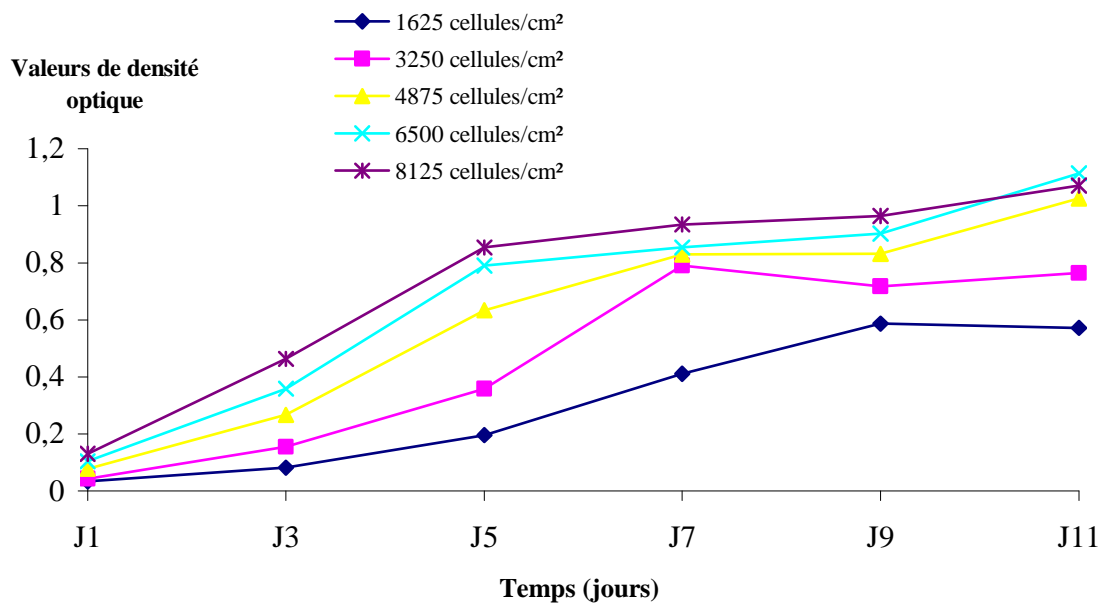


Figure R5 : Courbes de croissance des cellules MDA-MB-231.

Les courbes sont réalisées en plaques 96 puits sur 11 jours à l'aide du test MTT.

II.3. Cytotoxicité du GCV

La sensibilité des cellules au GCV permet de déterminer l'IC₅₀, concentration en GCV nécessaire pour induire 50% de mortalité à 8 jours. Le rapport entre l'IC₅₀ des cellules non transfectées et des cellules transfectées par les lipoplexes pcDNA-tk permet d'évaluer l'efficacité du traitement sur la lignée étudiée. Les cellules sontensemencées en plaques 96 puits à raison de 3250 cellules par cm². La toxicité des différentes concentrations de GCV est évaluée à 8 jours par un test au MTT. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie par rapport aux cellules non exposées au GCV (figure R6a). Au vu de ces résultats, nous pouvons dire que la mortalité induite par le GCV est dose dépendante. En effet, l'augmentation de la concentration de GCV induit une mortalité plus importante. Le taux de mortalité de 50% est obtenu pour une concentration de GCV de 750 µM (figure R6b). La concentration nécessaire pour induire la mortalité de la totalité des cellules n'a pas été déterminée, vu l'importante concentration de l'IC₅₀.

II.4. Etude du système hsv1-tk/GCV

II.4.a. Toxicité des liposomes sur les cellules MDA-MB-231

Afin de déterminer l'effet des lipoplexes pcDNA-tk couplés au GCV sur la lignée cellulaire, il faut avant tout évaluer la toxicité des liposomes seuls sur les cellules. Les cellules sontensemencées en plaques 24 puits à raison de 3250 cellules par cm². Quarante huit après l'ensemencement, les cellules sont mises en présence de différents volumes de liposomes (de 2 µl à 25 µl). Ces conditions correspondent aux volumes nécessaires pour apporter de 0,2 à 5 µg d'ADN. La transfection par les liposomes est répétée 72 h plus tard. Un test MTT, réalisé 3 jours après la dernière transfection, permet de déterminer la viabilité des cellules. Le volume correspondant à 1 µg d'ADN permet d'obtenir 92% de survie des cellules à 8 jours (figure R7). C'est donc le volume maximum qui sera testé sur les cellules afin d'être certain que la toxicité observée est bien un effet du système tk/GCV et non des liposomes en eux-mêmes.

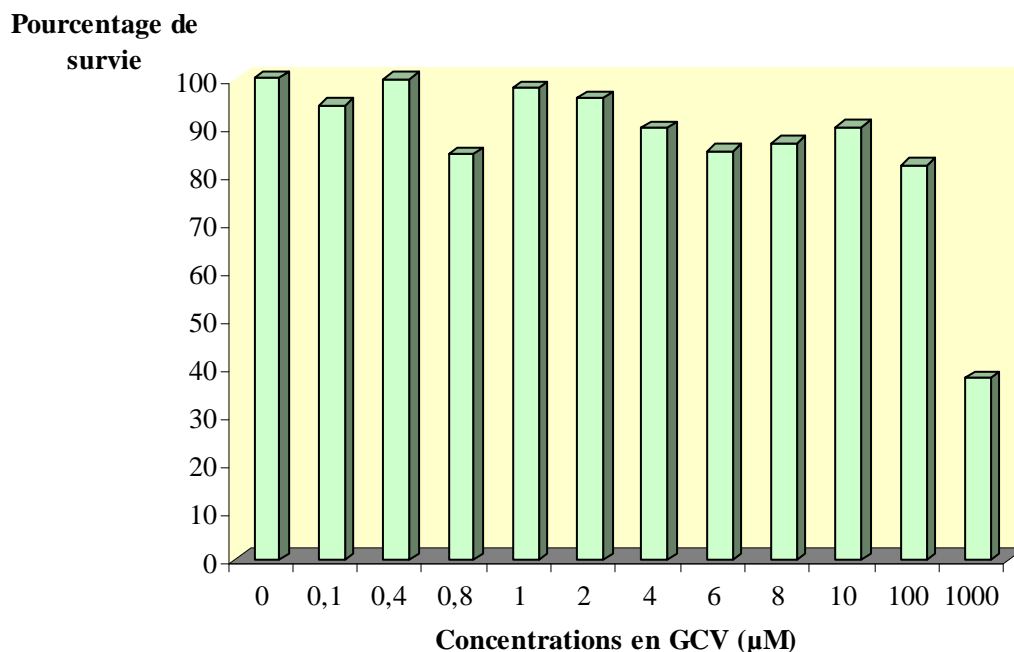


Figure R6a : Cytotoxicité du GCV sur les cellules MDA-MB-231.

Les cellules sont ensemencées à 3250 cellules par cm² en plaque 96 puits. La toxicité du GCV sur les cellules est évaluée par un test MTT réalisé 8 jours après la première exposition au GCV.

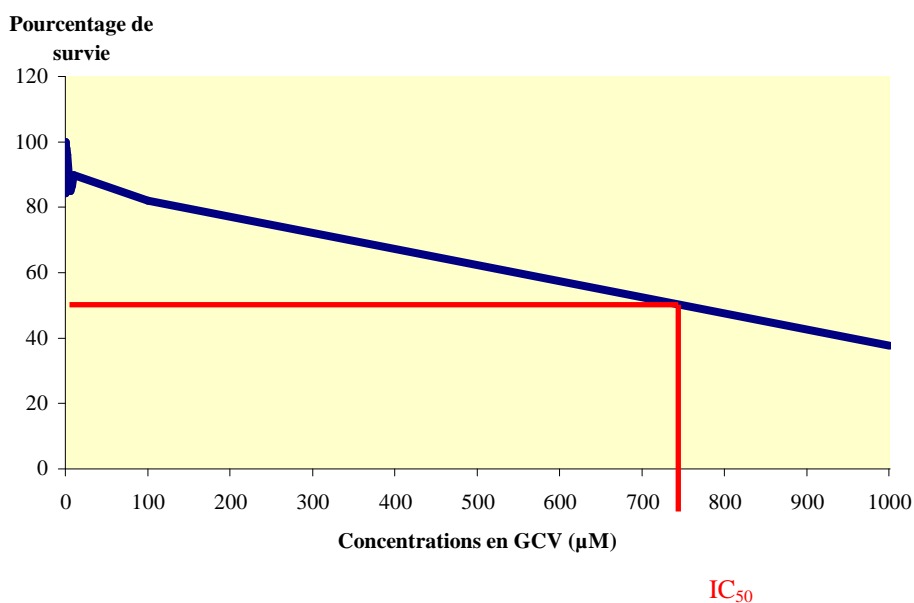


Figure R6b : Détermination de l'IC₅₀ du GCV sur les cellules MDA-MB-231. L'IC₅₀ est déterminée à partir de la courbe de toxicité du GCV sur les cellules MDA-MB-231. Elle correspond à la concentration de GCV nécessaire pour induire 50% de mortalité.

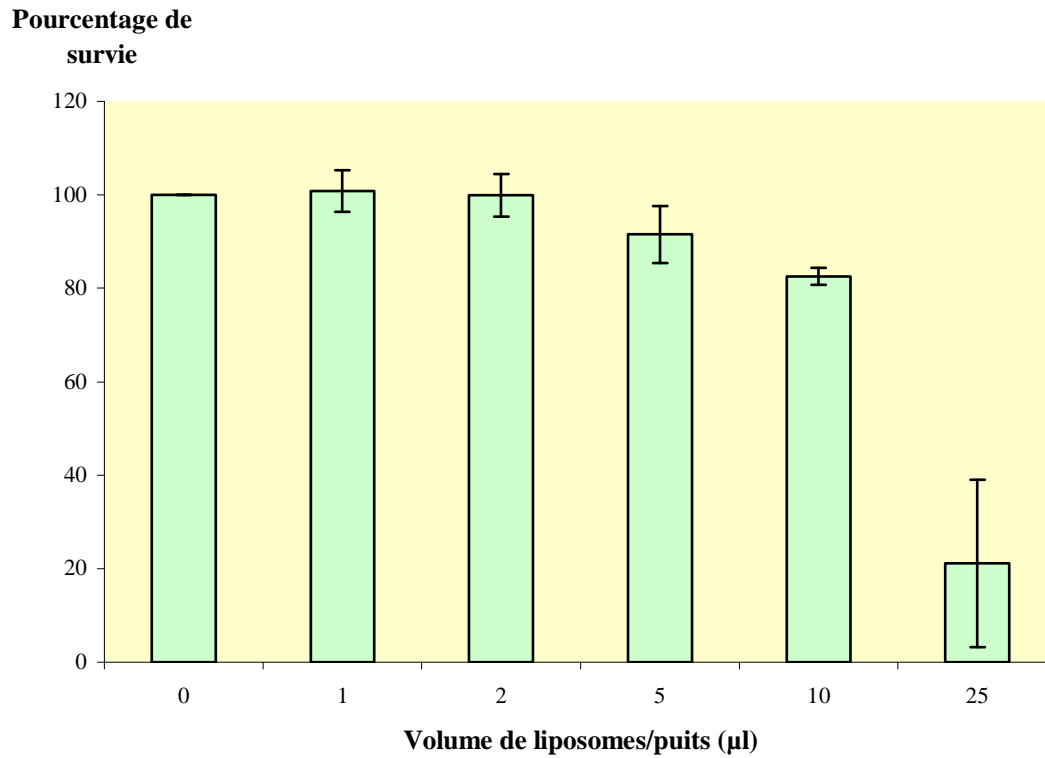


Figure R7 : Toxicité des liposomes vides sur les cellules MDA-MB-231.

Les lipoplexes sont utilisés à la concentration de 0,2 µg d'ADN par µl de liposomes. Les volumes de liposomes administrés aux cellules en culture correspondent aux volumes nécessaires pour apporter respectivement 0,2 ; 0,4 ; 1 ; 2 et 5 µg d'ADN.

II.4.b. Effet du système hsv1-tk/GCV sur les cellules MDA-MB-231

L'effet du système tk/GCV sur les cellules MDA-MB-231 est évalué en transfectant les cellules avec des quantités variables de lipoplexes pcDNA3.1+ et pcDNA-tk.

Une toxicité dose dépendante est observée pour les cellules transfectées par les deux types de lipoplexes en absence de GCV. Pour les cellules contrôles, transfectées par les lipoplexes pcDNA3.1+ et les cellules traitées, transfectées par les lipoplexes pcDNA-tk, les mêmes profils de croissance sont observés. Il existe une toxicité dose dépendante des deux types de lipoplexes, jusqu'à atteindre 40% de mortalité à 1 µg de lipoplexes (figure R8).

La mise en présence des cellules non transfectées avec différentes concentrations de GCV, permet d'obtenir de manière homogène dans les deux groupes une IC_{50} de 900 µM. La transfection des cellules par les lipoplexes pcDNA3.1+ et pcDNA-tk permet d'obtenir une diminution de la concentration en GCV nécessaire obtenir 50% de mortalité. Cette diminution de l' IC_{50} est beaucoup plus importante pour les cellules transfectées par les lipoplexes pcDNA-tk. En effet, 0,2 µg d'ADN pcDNA3.1+ donne une IC_{50} d'environ 600 µM (figure R9A), alors que la même quantité d'ADN pcDNA-tk permet d'obtenir une IC_{50} de 250 µM (figure R9B). Cette tendance se confirme avec 0,8 µg d'ADN : l' IC_{50} des cellules contrôles passe à 500 µM (figure R9a), alors que l' IC_{50} des cellules traitées est réduite à 100 µM (figure R9b).

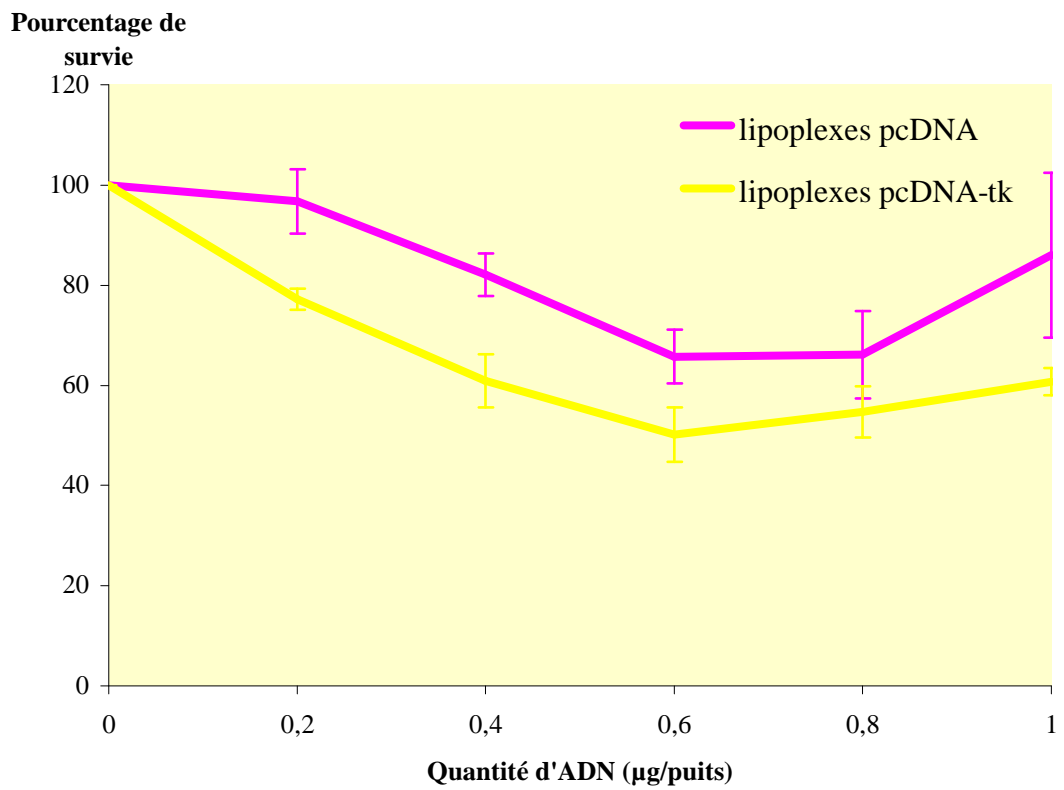


Figure R8 : Cytotoxicité des lipoplexes pcDNA3.1+ et pcDNA-tk sur les cellules MDA-MB-231.

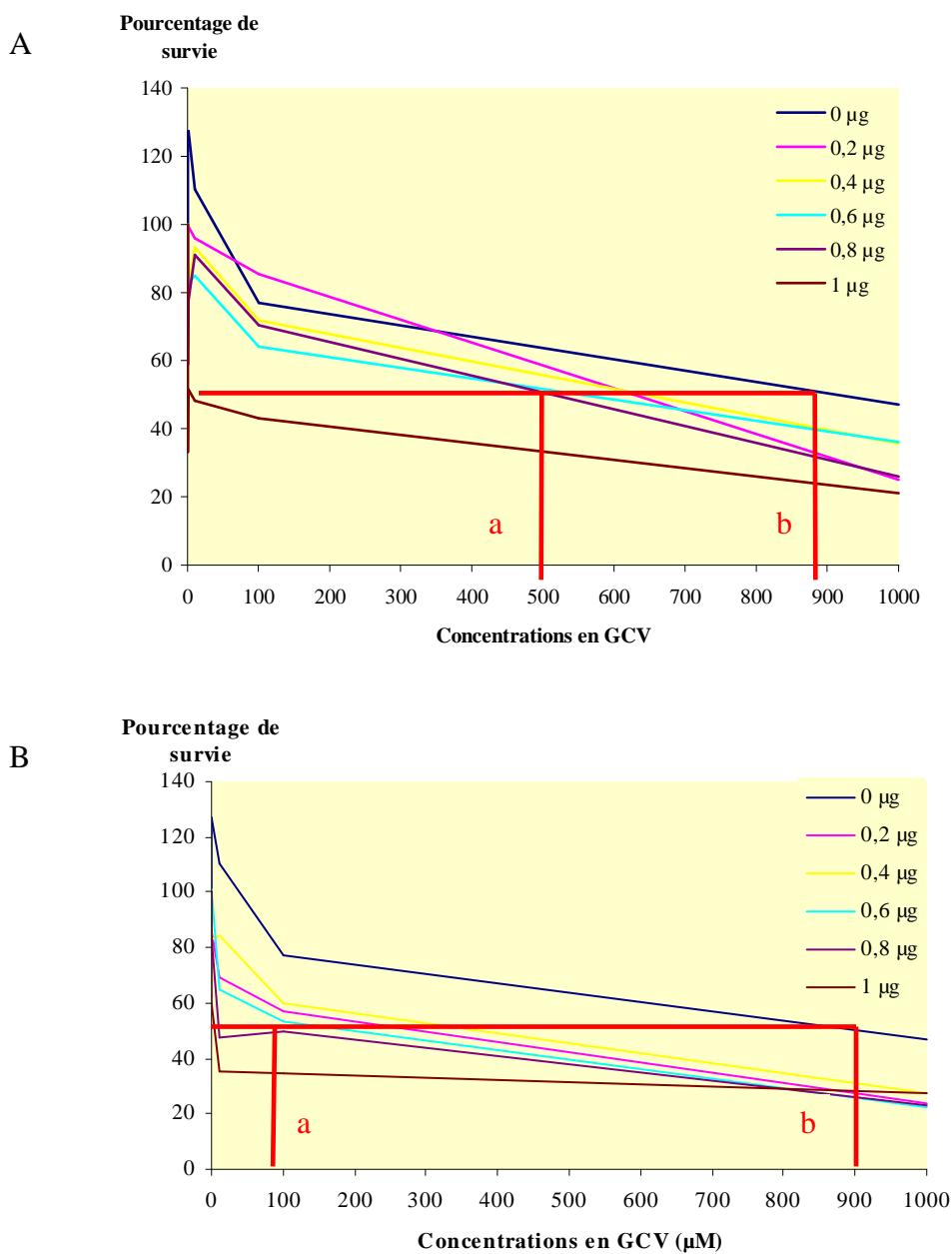


Figure R9 : Effets des lipoplexes sur les cellules MDA-MB-231. Les quantités de lipoplexes sont indiquées en terme de quantité d'ADN transfecté ($\mu\text{g/puits}$) dans les légendes situées au dessus des courbes.

A : Effet de lipoplexes pcDNA3.1+ sur les cellules. L' IC_{50} des cellules non transfectées est de $900 \mu\text{M}$ (a) et passe à $500 \mu\text{M}$ pour $0,8 \mu\text{g}$ d'ADN.

B : Effet de lipoplexes pcDNA-tk sur les cellules. L' IC_{50} des cellules non transfectées est de $900 \mu\text{M}$ (a) et passe à $100 \mu\text{M}$ pour $0,8 \mu\text{g}$ d'ADN.

II.5. Cinétique d'accumulation du 18(F)-FDG et du ^{99m}Tc-MIBI

Les cinétiques d'accumulation du 18(F)-FDG et du ^{99m}Tc-MIBI sont réalisées en incubant les cellules avec l'un des 2 traceurs. Les temps d'incubation varient de 30 minutes à 5 heures.

Le profil d'accumulation du 18(F)-FDG pour les cellules MBA-MB-231 montre une augmentation de la fixation du traceur par la cellules en fonction du temps. La croissance est linéaire jusqu'à 2 heures d'incubation, puis un plateau de fixation est atteint, avec un maximum d'accumulation à 5 heures (figure R10a). Les cellules MDA-MB-231 ont donc la capacité d'accumuler le 18(F)-FDG.

Les cellules MDA-MB-231 ont une capacité presque nulle à accumuler le ^{99m}Tc-MIBI, puisque après 5 heures d'incubation, seulement 1,3% de la radioactivité totale apportée retrouvée au niveau cellulaire (figure R10b).

II.6. Détermination du statut MDR

Certains auteurs ont montré qu'une faible accumulation de ^{99m}Tc-MIBI au niveau tumoral pouvait être la conséquence de l'expression de gènes de la MDR. Nous avons analysé l'expression des ARNm des gènes *mdr1* et *mrp1* dans les cellules MDA-MB-231. Ces deux gènes sont impliqués dans l'expulsion hors des cellules d'un certain nombre de composés comme notamment le ^{99m}Tc-MIBI. Les cellules A549 et HT29 sont utilisées comme contrôles positifs. Les cellules MDA-MB-231 n'expriment pas l'ARNm du gène *mdr1* tout comme les cellules HT29 c119 A (figure R11). En revanche elles expriment l'ARNm du gène *mrp1* (figure R12). Les cellules MDA-MB-231 présentent donc un profil de MDR de part l'expression du gène *mrp1*.

**Accumulation du
18(F)-FDG
(CPM/10000 cellules)**

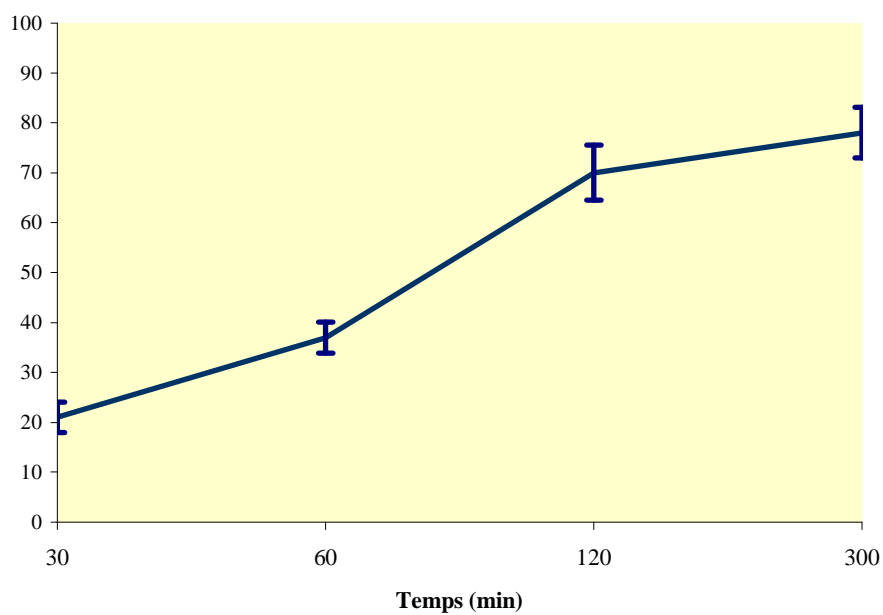


Figure R10a : Cinétique d'accumulation du 18(F)-FDG dans les cellules MDA-MB-231.

**Pourcentage de
fixation
du MIBI**

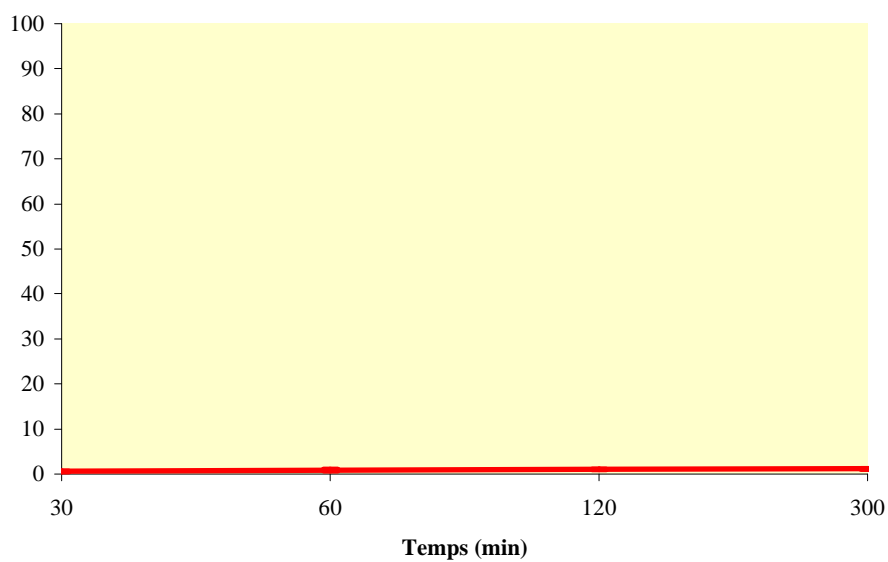


Figure R10b : Fixation du ^{99m}Tc-MIBI par les cellules MDA-MB-231.

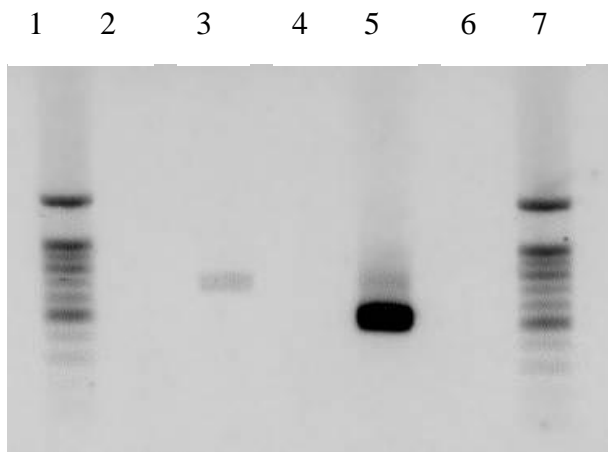


Figure R11 : Détermination du statut MDR1 des cellules MDA-MB-231.

Piste 1 : poids moléculaire 100 pb ; Piste 2 : cellules HT29 c119A ; Piste 3 : cellules A549 ;
 Piste 4 : cellules MDA-MB-231 ; Piste 5 : contrôle positif de la RT-PCR ; Piste 6 : contrôle
 négatif ; Piste 7 : poids moléculaire 100 pb.

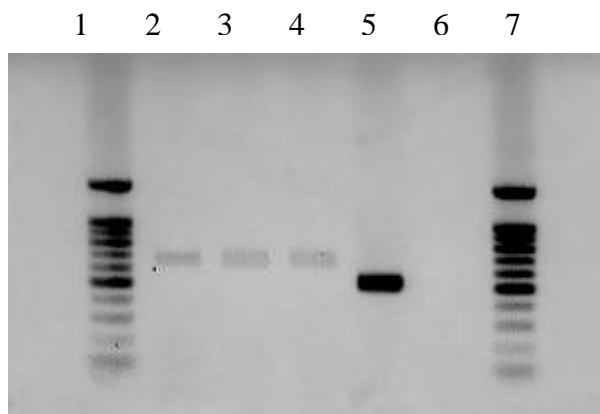


Figure R12 : Détermination du statut MRP1 des cellules MDA-MB-231.

Piste 1 : poids moléculaire 100 pb ; Piste 2 : cellules HT29 c119A ; Piste 3 : cellules A549 ;
 Piste 4 : cellules MDA-MB-231 ; Piste 5 : contrôle positif de la RT-PCR ; Piste 6 : contrôle
 négatif ; Piste 7 : poids moléculaire 100 pb.

III. Modèle animal

III.1. Evolution des volumes tumoraux et du poids des animaux

Après injection de 10^7 cellules MDA-MB-231 dans la mamelle (dans un volume de 100 μ l de PBS 1X), les rats sont suivis quotidiennement pour leur prise de poids et pour l'évolution tumorale. L'injection de cellules permet d'obtenir une tumeur palpable dès 4 à 5 jours post injection. L'évolution des volumes tumoraux sur 7 semaines est rapportée sur la figure R13. La présence de tumeur n'a pas d'influence sur la prise de poids des animaux, puisque les courbes de poids obtenues sont identiques à celles d'animaux ne présentant pas de tumeurs (résultats non présentés).

III.2. Etudes anatomopathologiques

Les études macroscopiques et microscopiques des tumeurs ont été réalisées après 7 semaines de croissance.

Les tumeurs ne présentent pas de forme particulière et sont très vascularisées. Elles sont difficiles à exciser car bien adhérentes et très infiltrantes au niveau des tissus périphériques. La tumeur présentée sur la figure R14 est représentative de la morphologie des tumeurs obtenues au cours de nos expérimentations. Son volume est d'environ 14 cm^3 , ce qui est le volume maximal obtenu 7 semaines après l'injection des cellules MDA-MB-231 dans la mamelle. Au niveau microscopique, des structures caractéristiques de la glande mammaire, telles que les canaux galactophores sont aussi retrouvés au niveau de la tumeur (figure R15a), et les cellules tumorales sont larges et caractérisées par un gros noyau irrégulier. De nombreuses mitoses sont observées et les tumeurs contiennent de nombreuses embolies capillaires (figure R15b). Un des animaux présente des embolies de cellules tumorales dans les artères pulmonaires (figure R16) dans les autres cas, les artères pulmonaires sont entourées de cellules inflammatoires. Aucune métastase pulmonaire n'a pu être mise en évidence.

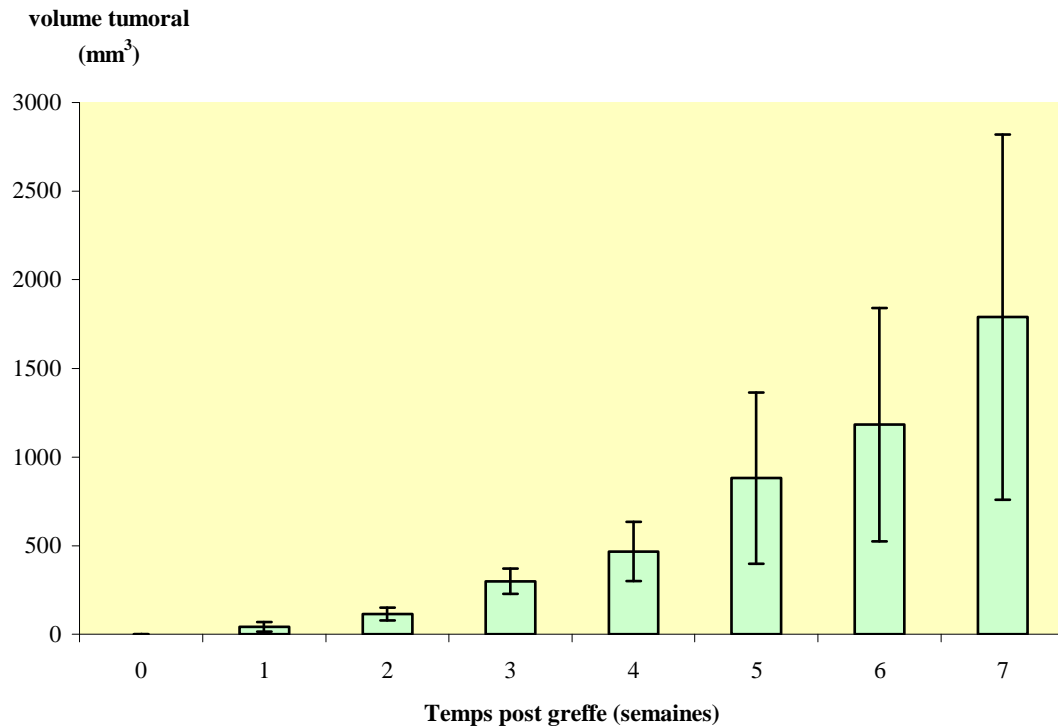


Figure R13 : Courbe de croissance des cellules MDA-MB-231, injectées dans la mamelle abdominale des rats.



Figure R14 : Tumeur extraite chez l'animal, sept semaines après l'injection de cellules tumorales dans la mamelle.

La tumeur ne présente pas de forme particulière, et une idée de la taille de la tumeur est donnée grâce à la règle présentée au bas de la photo.

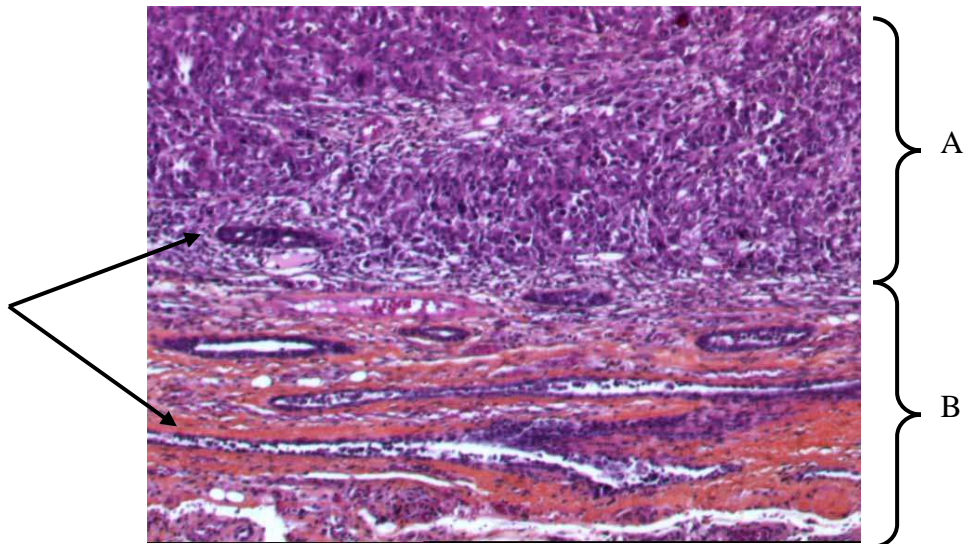


Figure R15a : Coupe histologique de tumeur mammaire.

La coupe est réalisée à partir de tumeur prélevée chez le rat suite à l'injection de cellules MDA-MB-231 dans la mamelle. La coupe présente 2 morphologies différentes : A : tissu tumoral dense, avec canaux galactophores (flèche) ; B : tissu sain avec de nombreux canaux galactophores (flèche). Grossissement fois 50.

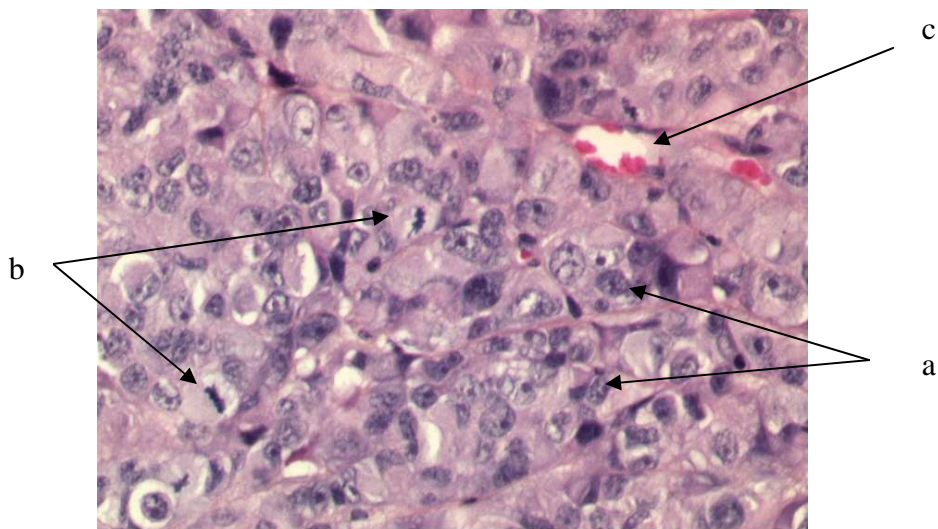


Figure R15b : Coupe histologique de tumeur mammaire.

La tumeur présente des cellules avec des noyaux volumineux (a), de nombreuses mitoses (b) et des embolus capillaires (c). Grossissement fois 200.

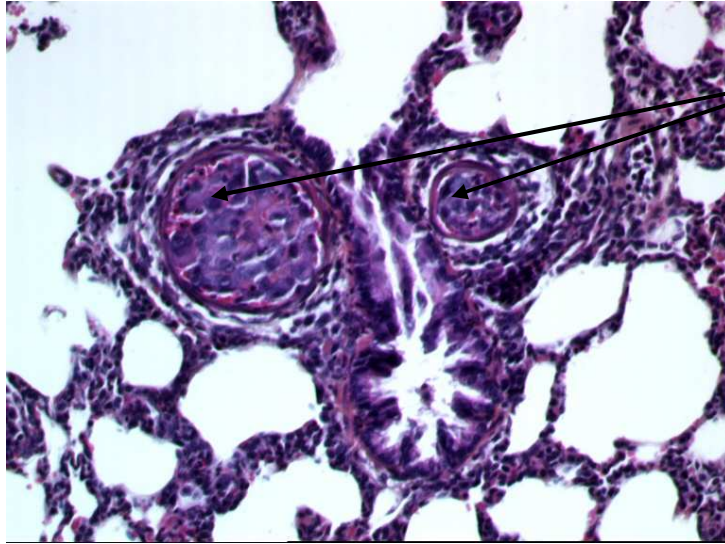


Figure R16 : Coupe histologique de poumons prélevés sur un animal porteur d'une tumeur.
Les artères pulmonaires présentent des emboles de cellules tumorales (flèches).
Grossissement fois 100.

III.3. Imagerie médicale

Des images ont été obtenues pour les 2 traceurs ^{18}F -FDG et $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI. Le site d'implantation de la tumeur a été choisi de manière à pouvoir distinguer la tumeur des organes périphériques (tel que le cœur). L'accumulation du ^{18}F -FDG est visualisée au niveau de la tumeur ainsi que dans les autres organes qui fixent classiquement ce traceur (cœur, cerveau et vessie). La tumeur est visualisable 3 semaines après l'injection de cellules. Aucune métastase n'est détectée ni au niveau pulmonaire ni au niveau osseux (figure R17a). En revanche, les scintigraphies au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI ne nous donnent aucune image de la tumeur, que ce soit 5 minutes ou 75 minutes après l'injection du traceur, et quelque soit la taille de la tumeur (figure R17b). Le modèle tumoral étudié ne fixe donc pas ou très peu $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI, ce qui confirme les résultats précédemment obtenus en culture cellulaire. Les animaux sont observés pendant 3 semaines avec un examen hebdomadaire au ^{18}F -FDG, ce qui nous permet de suivre l'évolution de la tumeur (figure R18) qui en relation avec les données morphologiques.

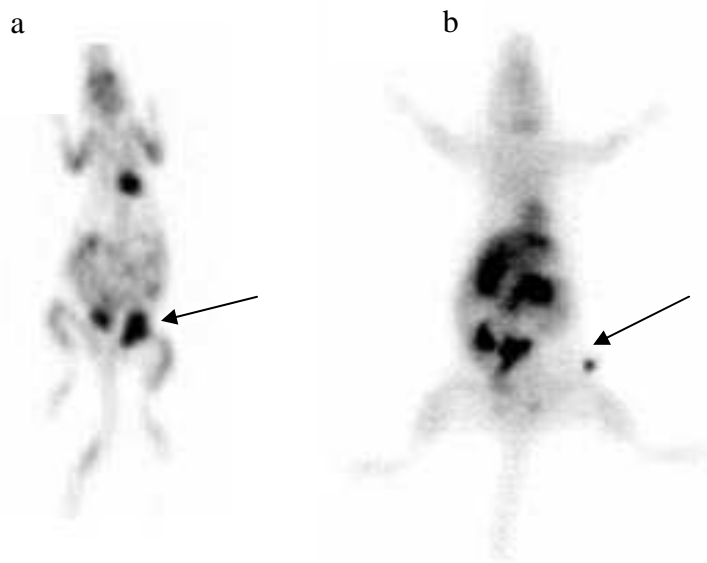


Figure R17 : Comparaison de l'accumulation de deux traceurs, le ^{18}F -FDG (a) et le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI (b) au niveau de la tumeur. Les deux images sont générées à partir du même animal, à cinq jours d'intervalle. Le modèle fixe le ^{18}F -FDG au niveau de la tumeur (flèche a), alors que le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI ne s'accumule pas dans la tumeur (flèche b).

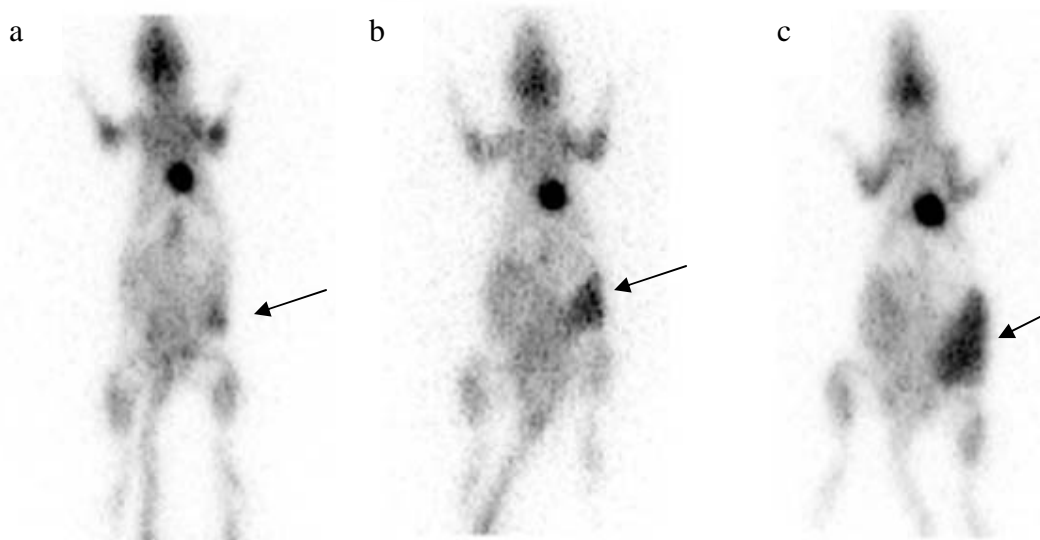


Figure R18 : Evolution de l'accumulation du ^{18}F -FDG pour le même animal en fonction du temps.

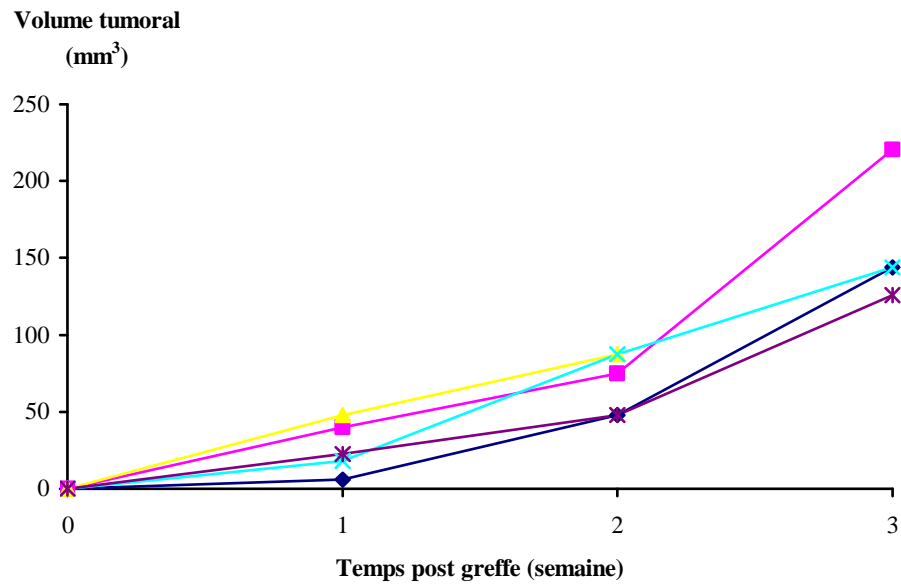
L'accumulation est exprimée en pourcentage de la radioactivité totale, soit 2% à J25 (a), 9% à J32 (b) et 16% à J45 (c), après l'injection des cellules MDA-MB-231 dans la mamelle.

IV. Efficacité des protocoles thérapeutiques

IV.1. Système hsv1-tk/GCV

L'étude réalisée, porte sur l'administration par voie intraveineuse de lipoplexes pcDNA-tk, suivi d'injections intra péritonéales de GCV. Ces animaux constituent le groupe dit « traité », et est réalisé en parallèle des groupes dits « témoins » et « contrôles ». Les traitements débutent une semaine après l'injection des cellules MDA-MB-231 dans la mamelle des rats. L'expérimentation prévue sur trois semaines n'a pu être réalisée que sur une période de quinze jours, les animaux ayant mal toléré les injections de lipoplexes. En effet, après la deuxième semaine de traitement, sur 20 animaux traités par injections de lipoplexes, seuls 6 animaux ont survécu. Il existe, au sein de chaque groupe une très grande hétérogénéité au niveau des volumes tumoraux, et chacun d'entre eux présente au moins un animal pour lequel la tumeur est restée à un état latent (figures R19 et R20). Pour les groupes témoins, lipoplexes pcDNA3.1+ et lipoplexes pcDNA3.1+ suivi de GCV, un décès a été constaté après la première semaine de traitement. Ces décès sont probablement dus à la présence d'endotoxines bactériennes dans les préparations plasmidiques. La comparaison des volumes tumoraux des différents groupes met en évidence une hétérogénéité des volumes avant même le début du traitement. Après une semaine d'injections répétées, les animaux traités par les lipoplexes pcDNA-tk suivi de GCV sont les seuls à présenter une régression de leur volume tumoral d'environ 10% par rapport au début du traitement (figure R21). Les autres groupes traités par injections de lipoplexes présentent uniquement un ralentissement de la croissance tumorale. Après la seconde semaine de traitement, les tumeurs du groupe lipoplexes pcDNA-tk/GCV présentent une reprise de la croissance tumorale, pour atteindre des valeurs voisines de celles obtenues pour le groupe lipoplexes pcDNA-tk, de l'ordre de 65% d'inhibition de croissance par rapport aux animaux n'ayant reçu aucune injection (animaux témoins) (figure R22). Les animaux traités par lipoplexes pcDNA3.1+ et lipoplexes pcDNA3.1+ suivi de GCV présentent un ralentissement de leur croissance tumorale d'environ 50% par rapport aux animaux témoins. Les tests statistiques réalisés permettent de mettre en évidence une différence significative entre le groupe hsv1-tk/GCV et le groupe témoin.

A



B

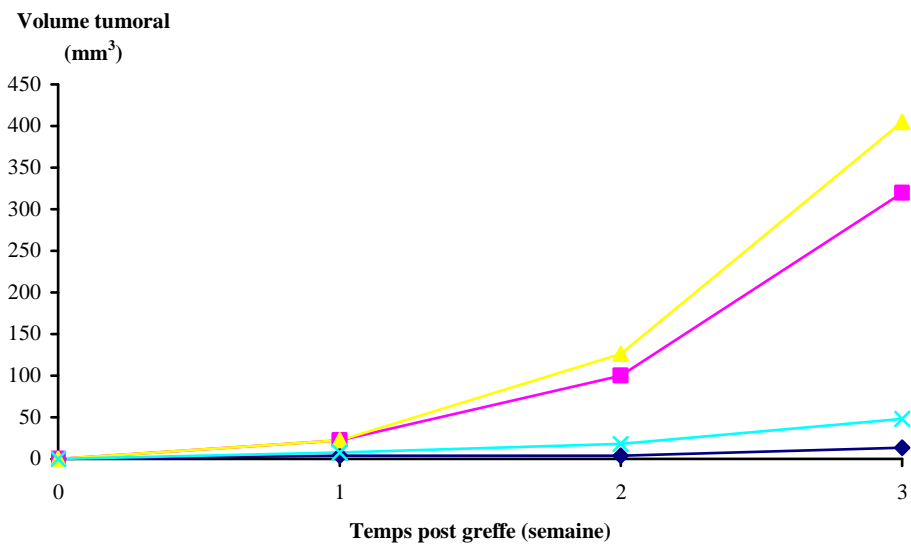


Figure R19 : Evolution des volumes tumoraux pour chaque animal : les animaux témoins (A), n'ayant reçu aucune injection, et les animaux contrôles liposomes (B), ayant reçu des injections intraveineuses de liposomes vides. Les injections débutent en semaine 1 après la greffe.

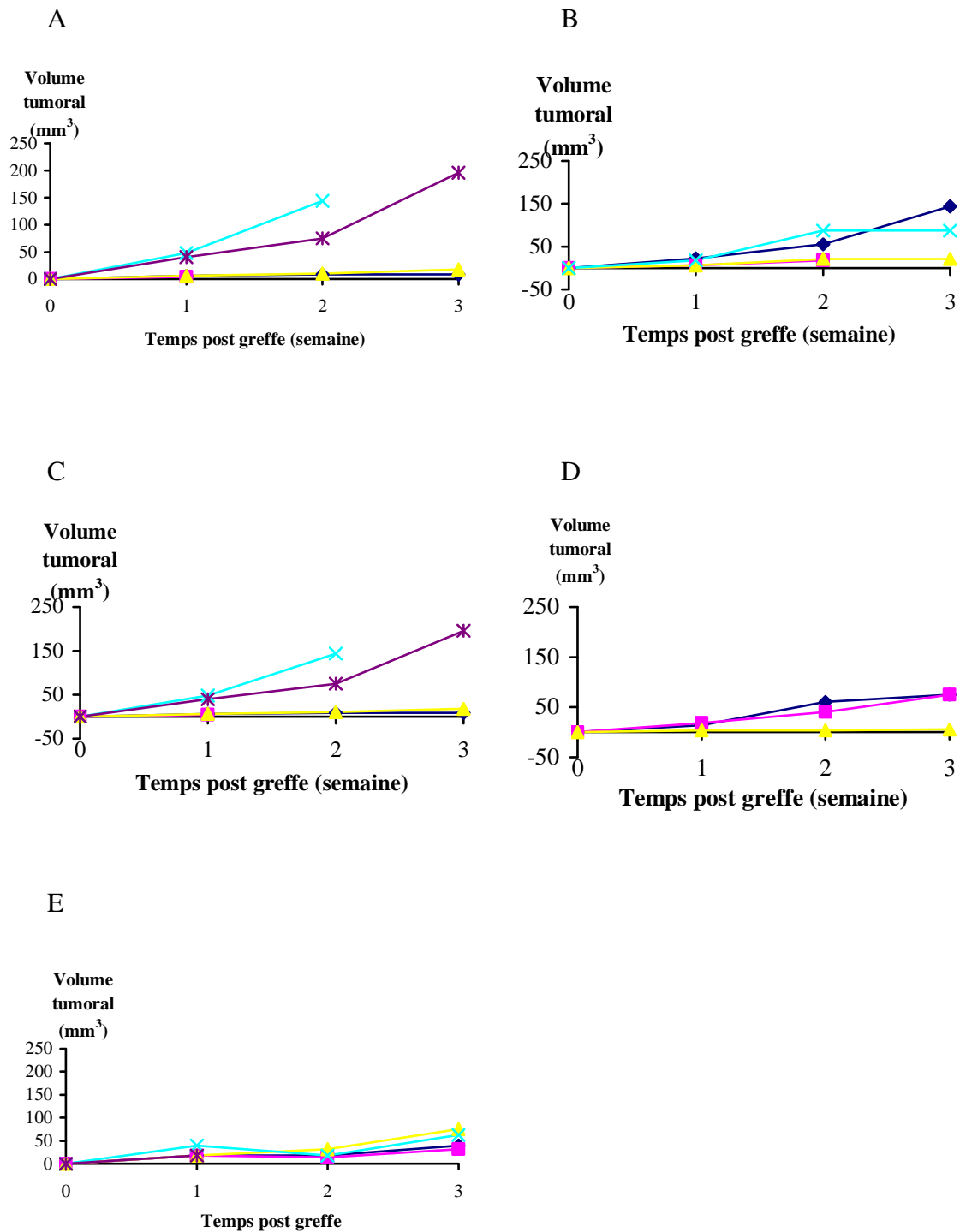


Figure R20 : Evolution des volumes tumoraux pour les différents groupes constituant l'étude hsv1-tk/GCV : avec les groupes contrôles GCV (A), contrôles lipoplexes pcDNA3.1+ (B), contrôles lipoplexes pcDNA3.1+ suivi de GCV (C), contrôles lipoplexes pcDNA-tk (D) et traités lipoplexes pcDNA-tk suivi de GCV (E). Les administrations de lipoplexes sont réalisées par injections intraveineuses et les administrations de GCV par injections intra péritonéales.

Evolution des volumes tumoraux

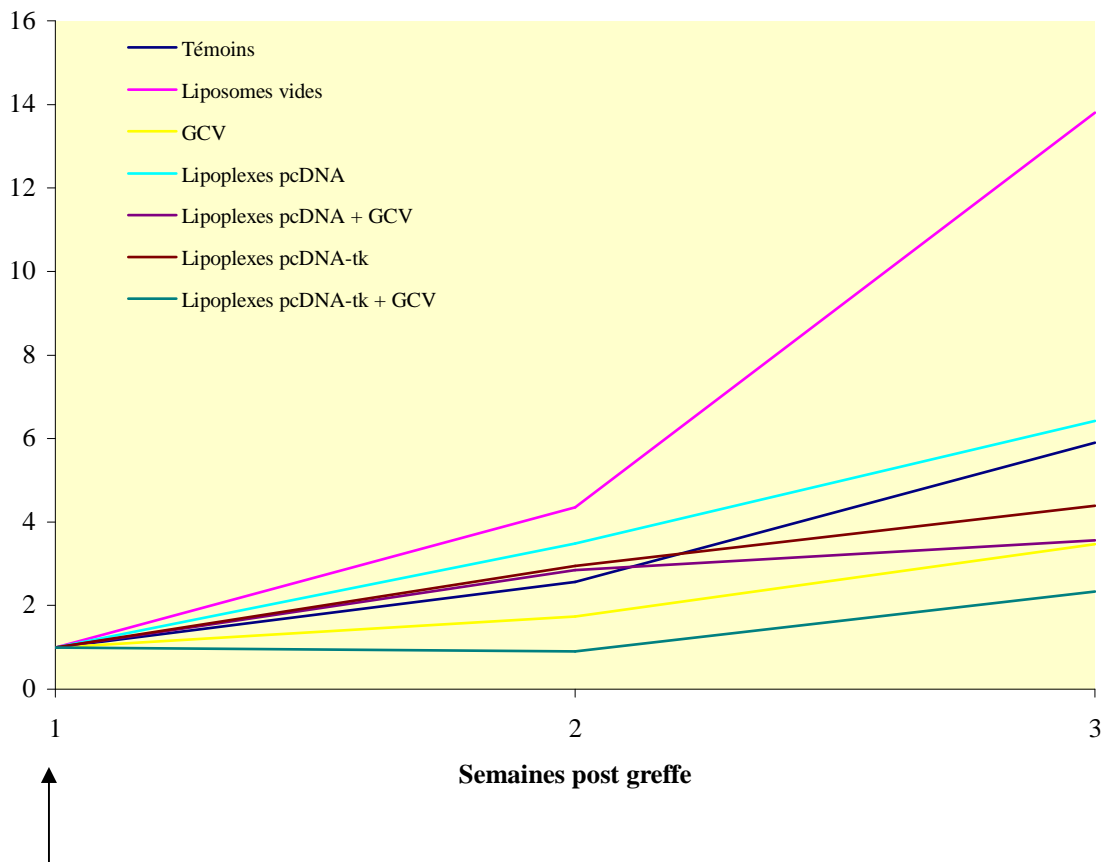


Figure R21 : Comparaison de l'évolution des volumes tumoraux au cours des deux semaines de traitements pour l'étude hsv1-tk. Les volumes avant injection sont pris comme valeurs références. Le début des traitements est symbolisé par la flèche.

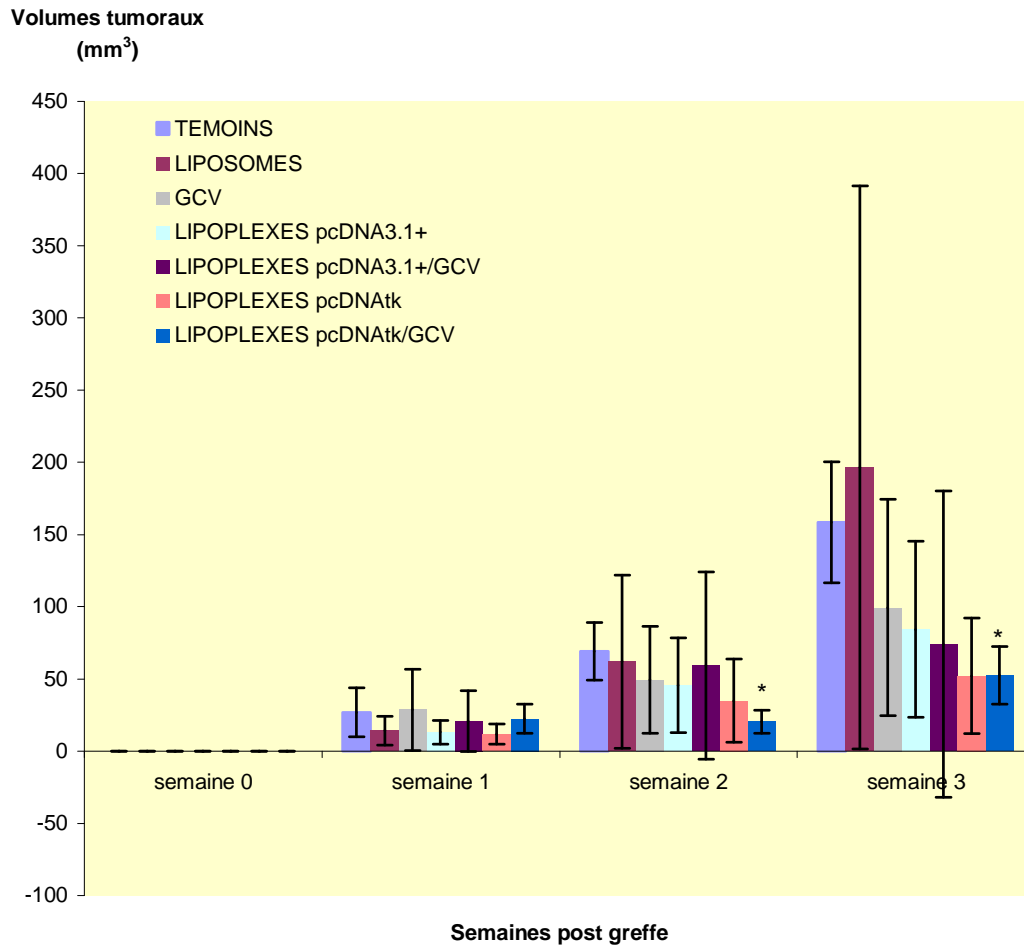


Figure R22 : Comparaison de l'évolution des volumes tumoraux pour les différents groupes composant l'étude hsv1-tk/GCV.

* : les volumes tumoraux du groupe lipoplexes pcDNAtk/GCV sont statistiquement inférieurs aux volumes tumoraux du groupe témoin, 1 semaine et 2 semaines après le début du traitement, $p = 0,05$.

IV.2. Endostatine

L'étude endostatine est réalisée dans les mêmes conditions et même temps que l'étude hsv1-tk/GCV. Dans les 24 h suivant la première injection de lipoplexes pSecTag2C (constituant le groupe contrôle), 3 animaux sur 5 sont morts. Tout comme pour l'étude hsv1-tk/GCV ces décès précoces peuvent être attribué à la présence d'endotoxines bactériennes dans les préparations plasmidiques. L'utilisation de ce groupe en tant que groupe contrôle n'est donc plus possible, du fait du faible nombre d'animaux le constituant. Ce groupe est remplacé par les animaux ayant reçu les injections de lipoplexes pcDNA3.1+. Sur les cinq animaux du groupe lipoplexes pSecEndostatine, un animal est mort après une semaine d'injection, trois présentent des tumeurs restées à l'état basal et un avec une tumeur de croissance normale (figure R23D). L'état basal des trois tumeurs n'est pas obligatoirement attribuable à l'effet de l'endostatine, car chaque groupe contrôle présente au moins un animal pour lequel la tumeur est restée à l'état basale (figure R23). Le suivi de l'évolution des volumes tumoraux montre une croissance ralentie des tumeurs chez les animaux traités par lipoplexes pSecEndostatine (figure R24). Lorsque les volumes tumoraux sont comparés entre eux, le ralentissement de la croissance des tumeurs traitées par l'endostatine se confirme, avec une inhibition de la croissance de l'ordre de 65% par rapport aux animaux n'ayant reçu aucun traitement. Cependant les volumes tumoraux des rats contrôles sont aussi inférieurs d'environ 50% par rapport aux animaux témoins (figure R25). Comme pour l'étude hsv1-tk/GCV, l'hétérogénéité des volumes au sein de chaque groupe ne permet pas de déterminer si les différences obtenues sont significatives ou non.

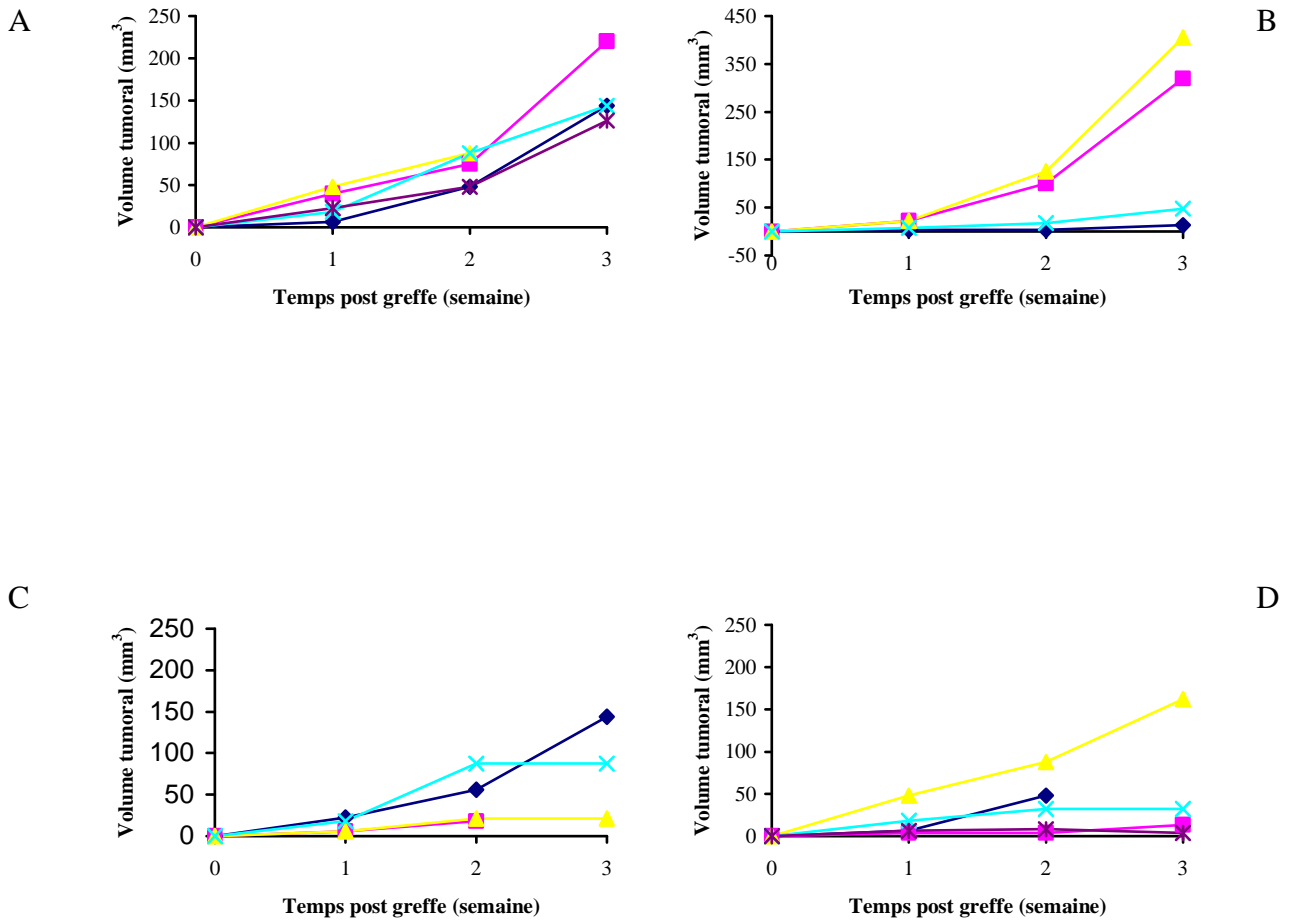


Figure R23 : Evolution des volumes tumoraux pour les animaux traités par des injections intraveineuses de lipoplexes pSecEndostatine. A : animaux témoins n'ayant reçu aucune injection, B : animaux contrôles liposomes ayant reçu des injections intraveineuses de liposomes vides, C : animaux contrôles ayant reçu des injections intraveineuses de lipoplexes pcDNA3.1+, D : animaux traités ayant reçu des injections intraveineuses de lipoplexes pSecEndostatine. Les injections débutent en semaine 1 post greffe.

Evolution de la masse tumorale

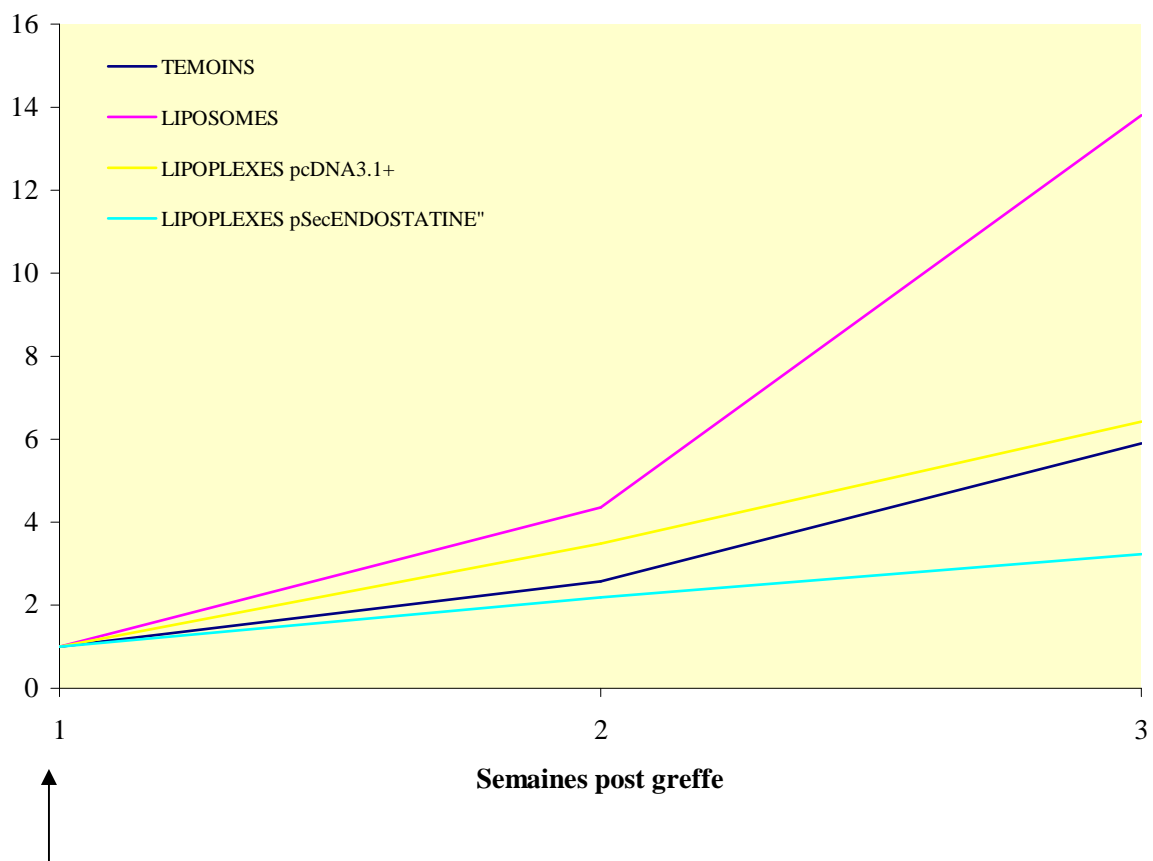


Figure R24 : Comparaison de l'évolution des volumes tumoraux au cours des deux semaines de traitements pour l'étude endostatine. Les volumes avant injection sont pris comme valeurs références. Le début des traitements est symbolisé par la flèche.

**Volumes tumoraux
(mm³)**

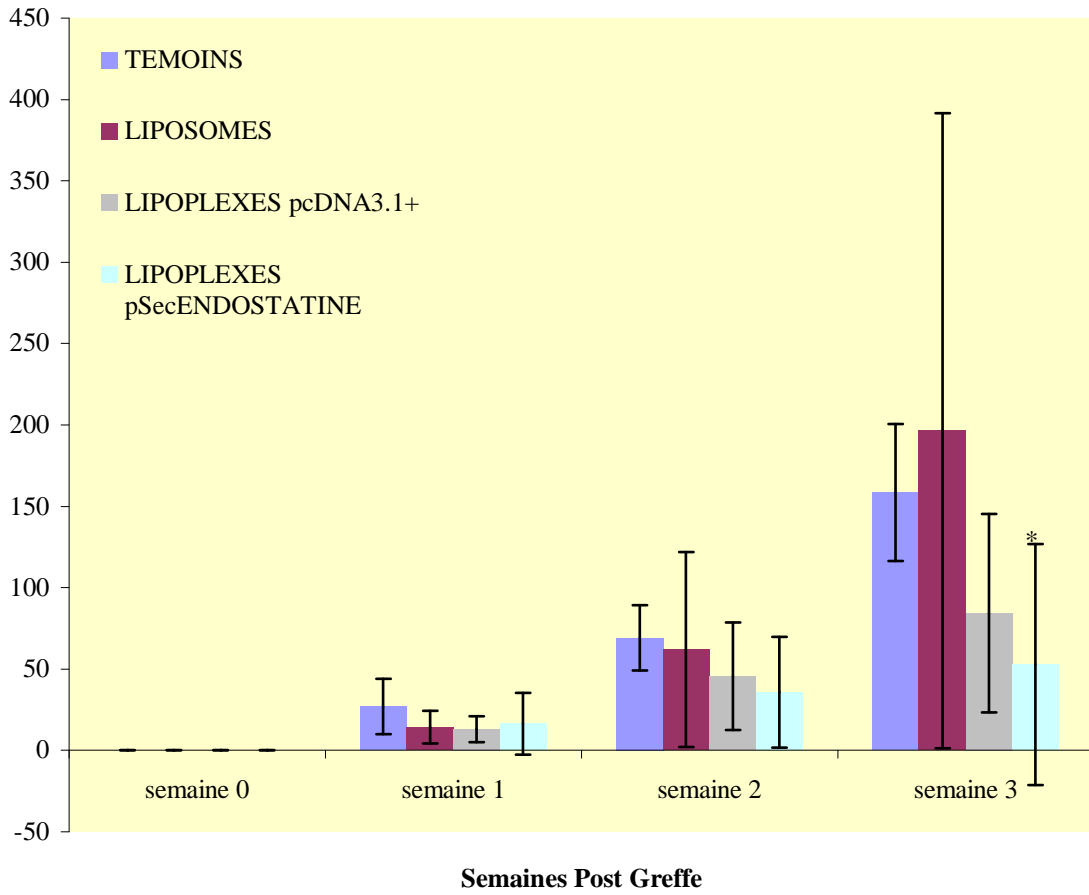


Figure R25 : Comparaison de l'évolution des volumes tumoraux pour les différents groupes composant l'étude endostatine.

* : les volumes tumoraux du groupe lipoplexes pSecEndostatine sont statistiquement inférieurs aux volumes tumoraux du groupe témoins, $p = 0,05$.

Quatrième partie
DISCUSSION

I. But de l'étude – Rappel des résultats

Le cancer du sein est la première cause de mortalité par tumeur maligne chez les femmes dans les pays occidentaux. En 2000, 11 637 décès ont été recensés en France et 46 845 nouveaux cas dépistés. Les thérapeutiques conventionnelles (radiothérapie, chimiothérapie et hormonothérapie) ont gagné en efficacité ces dernières années. Cependant, même si les réponses aux traitements sont relativement bonnes pour des cancers dépistés et traités très tôt, le pronostic reste mauvais pour des cancers de stade avancé. Les avancées de la biologie moléculaire et une meilleure connaissance des gènes, ont permis la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques comme notamment la thérapie génique. Le transfert d'acides nucléiques permet à l'heure actuelle d'obtenir des résultats intéressants chez l'animal pour un certain nombre de maladies, mais l'application d'une telle technique à l'homme n'a pour l'instant pas encore été concluante. Cependant, la thérapie génique a encore beaucoup à apporter et notamment dans la mise en place de nouvelles stratégies anticancéreuses. C'est pour ces raisons que nous avons comparé au cours de nos travaux, deux stratégies de thérapie génique anticancéreuses, afin de déterminer leur possible utilité dans le cadre de nouvelles thérapeutiques appliquées au cancer du sein. Le but de cette étude était donc dans un premier temps, d'évaluer l'efficacité *in vitro* du système lipoplexes hsv1-tk associé au GCV sur une lignée cellulaire humaine d'adénocarcinome mammaire (MDA-MB-231). La seconde étape de ces travaux était d'évaluer l'efficacité de ce même système sur un modèle animal d'adénocarcinome mammaire humain mis au point par nos soins. Dans un même temps, le système lipoplexe endostatine à lui aussi été évalué pour son efficacité *in vivo* sur ce même modèle animal, afin de pouvoir déterminer laquelle de ces deux stratégies est la plus efficace.

Au cours de notre étude sur les cellules MDA-MB-231, le système hsv1-tk vectorisé par les lipoplexes s'est montré d'une efficacité relative. La concentration de GCV nécessaire pour induire 50% de mortalité cellulaire est de 900 μM pour les cellules non transfectées, et elle passe à 100 μM pour les cellules transfectées par 0,8 μg de lipoplexes pcDNA-tk. Le gène hsv1-tk que nous avons au préalable cloné est donc fonctionnel et le système de vectorisation choisi permet une expression du gène d'intérêt. Cependant l'IC₅₀ des cellules

transfectées est élevée, il semble donc que les cellules MDA-MB-231 soient insensibles au système hsv1-tk.

Les études *in vivo* ont été réalisées sur un modèle animal d'adénocarcinome mammaire humain, mis au point par nos soins. Les cellules MDA-MB-231 sont injectées dans la mamelle de rats femelles, immunodéprimés par injections de cyclosporine A (CysA). Les études anatomopathologiques ainsi que les examens d'imagerie médicale (18(F)-FDG CDET et ^{99m}Tc-MIBI), confirment le caractère malin de la tumeur. Sur un tel modèle, les injections intraveineuses répétées de lipoplexes pcDNA-tk suivies d'injections intra péritonéales de GCV, ont donné des résultats assez surprenants. Après la première semaine de traitement, ce groupe (pcDNA-tk suivi de GCV) est le seul à présenter une régression des volumes tumoraux, alors que dans les autres groupes seul un ralentissement de la croissance est observé. Après la deuxième semaine nous avons observé une reprise de la croissance tumorale, avec des volumes restant inférieurs de 65% à ceux du groupe témoin. Cependant cette même diminution est obtenue pour certains des groupes dits « contrôles ».

Le traitement par les lipoplexes pSecEndostatine permet un ralentissement de la croissance tumorale de l'ordre de 65% par rapport aux animaux n'ayant reçu aucune injection, mais aucune régression complète de la tumeur n'a été observée. De plus une régression des volumes tumoraux a aussi été observée pour les animaux « contrôles ».

Après deux semaines de traitements, les deux systèmes étudiés présentent donc la même efficacité thérapeutique en terme de ralentissement de la croissance tumorale, ralentissement évalué par le suivi des volumes tumoraux. Cependant ces effets sur la croissance tumorale ne sont probablement pas totalement imputables aux gènes utilisés puisque certains groupes utilisés comme contrôles dans cette étude préliminaire présentent des volumes tumoraux beaucoup moins importants que pour les animaux témoins.

Les résultats obtenus ne sont pas complets, puisque l'expérimentation prévue sur trois semaines n'a pu être réalisée que pendant 15 jours du fait d'un grand nombre de décès survenus au terme de la seconde semaine de traitement. Nous discuterons dans un premier temps des méthodes d'évaluation de l'efficacité anticancéreuse des stratégies utilisées, puis des résultats obtenus sur le modèle de cancer du sein choisi.

II. Système de vectorisation

La thérapie génique requiert, pour son bon fonctionnement, l'utilisation de vecteurs capables d'acheminer les acides nucléiques vers leur cible. Cette étape de vectorisation est bien souvent une étape limitante de la thérapie génique. Pour pouvoir être utilisé en toute sérénité, un vecteur doit être efficace, de part sa capacité de transfection, la charge génique qu'il peut supporter et la spécificité dont il peut faire preuve. Mais un vecteur doit aussi pouvoir être utilisé en toute sécurité : il ne doit pas induire de réaction immunitaire, ou déclencher une nouvelle pathologie.

Les vecteurs de la thérapie génique peuvent être classés en deux grandes catégories : les vecteurs viraux et les vecteurs non viraux. Très largement utilisés jusqu'à maintenant les vecteurs viraux présentent un grand nombre d'avantages. Les adénovirus présentent la plus grande capacité de transfert de gène puisque le titre viral de ces vecteurs peut atteindre 10^{13} CFU/ml. De plus ils sont capables d'effectuer un transfert de gène dans des cellules quiescentes. Malheureusement, ils présentent aussi un fort pouvoir immunogénique et les avancées réalisées pour diminuer le déclenchement de ces réponses immunogéniques induit une baisse de la capacité de transfert des adénovirus (réf). Le second système viral le plus utilisé est celui utilisant les rétrovirus. Beaucoup moins immunogéniques que les adénovirus, ils ont cependant une capacité de transfert plus faible (10^8 CFU/ml). Ils ne sont capables de transférer l'ADN qu'à des cellules en division et l'insertion de l'acide nucléique dans la cellule hôte se fait de manière aléatoire, pouvant soit activer un pro-oncogène soit inactiver un anti-oncogène (Robbins and Ghivizzani, 1998). En effet, les résultats obtenus par Fischer et son équipe, démontre le danger de l'utilisation des rétrovirus en clinique humaine. Il ne faut pourtant pas dénigrer les vecteurs viraux qui ont permis de grandes avancées en thérapie génique, mais leur utilisation systématique en clinique humaine nécessite de nettes améliorations. La mise au point de techniques non virales a permis d'élargir le champ des recherches, et d'envisager des méthodes de transfert beaucoup plus sûres pour l'homme. Mais l'efficacité de la plupart de ces techniques est encore très limitée. L'introduction d'ADN nu *in vivo* donne très peu de résultats puisque dès son injection, l'ADN est dégradé par les nucléases endogènes (Ogris and Wagner, 2002). Les techniques d'électrotransfert qui

montrent de bons résultats en culture cellulaire sont encore à l'état d'expérimentation en ce qui concerne les animaux. De plus cette technique ne garantit pas le ciblage d'un type cellulaire particulier. L'apparition des liposomes comme vecteurs de la thérapie génique semble être une grande avancée dans l'administration d'acides nucléiques *in vivo*. En effet, les liposomes possèdent un certain nombre de caractéristiques qui en font de bons candidats pour la vectorisation d'ADN. Les liposomes sont répartis en trois catégories : liposomes cationiques, liposomes anioniques et liposomes neutres. Les différences de charges sont dues aux différents lipides entrant dans la constitution des liposomes. Du fait de ces variations au niveau des charges, les liposomes ont des utilités différentes. Les liposomes cationiques ont notamment une grande affinité pour les cellules endothéliales (McLean *et al.*, 1997, Thurston *et al.*, 1998), et une variation du ratio entre les différents lipides, ainsi que la modification de la proportion ADN/lipides permet un ciblage préférentiel des cellules endothéliales des néo-vaisseaux tumoraux (Krasnici *et al.*, 2003). Un ciblage des cellules tumorales est possible, en utilisant des anticorps ou des fragments d'anticorps spécifiques des marqueurs des cellules tumorales.

Dans les liposomes cationiques, l'ADN, chargé négativement, est encapsulé dans une capsule lipidique chargée positivement, ce qui le protège de la dégradation par les nucléases endogènes, et permet une expression du transgène plus durable. De plus, les lipides entrant dans la composition des liposomes sont très peu immunogéniques et n'induisent pas ou peu de toxicité *in vivo*. Enfin, les liposomes sont capables de transférer une grande quantité d'ADN. Cependant, malgré tous ces avantages, les liposomes cationiques ne sont pas sans effets négatifs. Bien qu'ils ne présentent en eux-mêmes aucun effet toxique, l'association liposomes/ADN (lipoplexes) induit une réaction inflammatoire avec la production de cytokines. Cette réaction inflammatoire est due à la présence de séquences CpG non méthylées sur les acides nucléiques plasmidiques. Elle n'est pas observée pour l'ADN nu car ce dernier est dégradé quasi immédiatement après son administration. L'effet antitumoral de cette production de cytokines est loin d'être négligeable, car elle a un grand intérêt dans la mise au point de protocoles d'immunothérapie (Krieg *et al.*, 1999).

Il existe une autre catégories de liposomes : les liposomes polycationiques ou polyplexes. Le plus utilisé est le liposome polyéthylèneimine (PEI), qui est un polymère synthétique, permettant la transfection d'ADN *in vitro* et *in vivo* (Ogris and Wagner, 2002).

Les PEI sont souvent complexés à des polymères hydrophiles tel que le poly éthylène glycol (PEG), dans le but d'éliminer les interactions non spécifiques entre les PEI et les composants sanguins (Kursa *et al.*, 2003). L'utilisation des PEI, permet d'augmenter l'efficacité de transfection à la fois *in vitro* et *in vivo* de 2 à 28 fois. De plus, l'administration conjointe de PEI et de lipoplexes permet une augmentation de l'efficacité de transfert et une diminution de l'effet toxique (Lee *et al.*, 2003).

Dans notre étude, nous voulions cibler l'angiogenèse à l'aide de l'endostatine. Cette dernière agissant directement sur les cellules endothéliales des néo vaisseaux sanguins tumoraux, les liposomes cationiques décrits par Krasnici nous ont semblé être les plus appropriés dans notre étude. Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus par le traitement endostatine, le gène de l'HSV1-tk a lui aussi été vectorisé par les mêmes liposomes cationiques. Le choix de ce système de vectorisation, s'est montré intéressant, car alors que le système HSV1-tk a démontré une faible efficacité *in vitro*, une diminution de 65% des volumes tumoraux a été observée chez les animaux traités. Le même taux d'inhibition tumorale a été obtenu pour l'endostatine. Cependant, faible tolérance des animaux aux injections répétées de lipoplexes nécessite des améliorations soit du vecteur lui-même, soit des méthodes d'administration.

III. Méthodes d'évaluation de l'activité anticancéreuse

Au cours de cette étude, nous avons évalué l'efficacité thérapeutique de deux stratégies anticancéreuses différentes : une stratégie par gène suicide avec la thymidine kinase du virus de l'herpès, et une stratégie anti-angiogénique avec l'endostatine. Cette évaluation est réalisée à la fois *in vitro* et *in vivo* pour le système hsv1-tk/GCV et uniquement *in vivo* pour l'endostatine. Les études *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées sur un modèle d'adénocarcinome mammaire humain constitué par les cellules MDA-MB-231 en culture cellulaire et greffées en site orthotopique chez le rat immunodéprimé par des injections quotidiennes de cyclosporine A (CysA).

III.1. Modèle animal

L'utilisation de lignées cellulaires est un premier pas vers l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de nouvelles molécules. Cette étape est nécessaire pour déterminer le spectre d'action et la toxicité du produit utilisé. Un très grand nombre d'études ont été menées sur des lignées cellulaires d'origine animale et la forte homologie entre les murins et les hommes permet de pouvoir extrapoler les résultats obtenus chez l'animal à l'homme. Nous avons cependant opté pour une lignée cellulaire d'adénocarcinome mammaire humaine : les cellules MDA-MB-231. Ces cellules sont très largement décrites dans la littérature et ont été utilisées dans un grand nombre d'essais aussi bien *in vitro* que *in vivo* (Bandyopadhyay *et al.*, 1999, El Abdaimi *et al.*, 2000, Hardman *et al.*, 2001, Hiraga *et al.*, 2001, Wu *et al.*, 2001, Yoneda *et al.*, 2000). Ces cellules présentent, quand elles sont injectées chez l'animal, les caractéristiques d'une tumeur de faible pronostic en terme de survie. La tumeur obtenue est de grade III faiblement différenciée et présente une indépendance aux hormones (Cailleau *et al.*, 1974). Ces cellules ont été isolées chez une patiente traitée par de nombreuses molécules de chimiothérapie (adriamycine, 5-FU), leur chimiorésistance est donc suspectée (DeFatta *et al.*, 2002). Cependant, même si les études *in vitro* sont nécessaires, elles ne sont pas représentatives du comportement réel des cellules cancéreuses dans l'organisme et ne reflètent pas les différentes interactions qui peuvent intervenir au niveau de l'activation ou de l'inactivation de la molécule testée au sein d'un organisme vivant. C'est pour cette raison que

de nombreux modèles animaux de cancer du sein ont été développés ces dernières années. Ils peuvent être arbitrairement classés en deux catégories : les tumeurs induites par des méthodes virales, chimiques ou génétiques et les tumeurs induites par injections de cellules chez des animaux immunodéficients (animaux « nude »).

Depuis les années 50, de gros efforts ont été réalisés pour décrire et classer les différents types de cancers du sein et les mécanismes impliqués dans leur développement. La mise au point d'un modèle de souris infectée par le virus de tumeur mammaire de la souris (« Mouse mammary tumor virus », MMTV), a permis de réelles avancées en terme de compréhension du rôle des mutations et de l'activation des oncogènes dans le développement de la tumeur. Cependant, peu d'homologues des gènes mutés chez la souris sont retrouvés mutés chez l'homme (Gusterson *et al.*, 1999).

L'utilisation de carcinogènes chimiques induit des tumeurs chez le rat avec une forte incidence de mutations notamment celles des gènes *ras*, qui sont très rares dans les cancers du sein humains. Ce type de modèle n'est donc pas représentatif de la réalité de la maladie chez l'homme (Gould, 1995).

Avec les avancées en matière de génétique, des modèles d'animaux transgéniques ont été mis au point (Hutchinson and Muller, 2000). De tels modèles sont très intéressants pour étudier l'efficacité d'un système ciblant spécifiquement une mutation génétique. Mais ces modèles ne sont pas utiles pour l'étude d'autres stratégies thérapeutiques.

A l'heure actuelle, le modèle qui nous semble le plus représentatif de la clinique humaine est la greffe de cellules humaines chez l'animal. Le modèle le plus répandu est celui utilisant des animaux immunodéficients tel que les souris « nude ». Cette méthode permet une croissance tumorale chez l'animal, sans problème de rejet. Mais ces animaux ne sont pas sans inconvénient, du fait de leur coût élevé et de leur difficulté d'utilisation : faible espérance de vie et conditions de maintien très contraignantes. De plus cette immunosuppression totale n'est pas représentative de la biologie du cancer chez l'homme, puisque l'immunité joue un rôle très important dans le développement tumoral et donc dans la mise au point de stratégies thérapeutiques.

De nombreuses études ont été réalisées, afin de créer de nouveaux modèles d'animaux immunocompétents portant des tumeurs humaines. En 1978, Steel et son équipe ont décrit des

techniques d'immunosuppression par thyméctomie, irradiations complètes de l'organisme et reconstitution de la moelle osseuse. Ces techniques leur ont permis de greffer avec succès des cellules tumorales humaines. La prise des tumeurs était augmentée si les animaux étaient au préalable traités par un puissant immunosuppresseur : le cyclophosphamide (Steel *et al.*, 1978). En combinant deux immunosuppresseurs, le cyclophosphamide et la CysA, à une irradiation lymphoïde totale, Hoogenhout a obtenu une prise de 100% d'ostéosarcome de souris chez des rats Wistar. Cependant, cette étude ne lui a pas permis d'obtenir d'aussi bons résultats en greffant des sections d'adénocarcinome de colon humain (Hoogenhout *et al.*, 1983). Enfin, Goodman et son équipe ont utilisé la CysA comme moyen unique d'immunosuppression. Ils ont greffé avec succès des sections solides de tumeur issue de mélanome humain, chez des rats Lewis, mais n'ont pas réussi à greffer des cellules humaines (Goodman *et al.*, 1987).

Aux vues de ces études, nous avons donc choisi d'utiliser la CysA comme agent unique d'immunosuppression. Des rats femelles de quatre semaines ont reçu une injection de cellules MDA-MB-231 en suspension dans la mamelle abdominale gauche. Les injections de CysA sont réalisées de manière quotidiennes. La dose administrée est de 35 mg/kg. Les études anatomopathologiques macroscopiques et microscopiques ont montré des tumeurs invasives et bien vascularisées, avec parfois une imbrication des structures normales et tumorales. Cependant aucune métastase pulmonaire n'a pu être mise en évidence dans ce modèle. Le lieu d'injection des cellules tumorales a une influence sur le développement de la tumeur chez l'animal. Il a été démontré que l'évolution des tumeurs dépend de l'organe hôte, et que les tumeurs se développent plus rapidement quand les cellules sont injectées directement dans la mamelle (Miller, 1981, Miller and McInerney, 1988, Miller *et al.*, 1981, Price, 1996, Price *et al.*, 1990, Price and Zhang, 1990). Les cellules MDA-MB-231 semblent avoir un faible pouvoir métastatique lorsqu'elles sont injectées de manière orthotopique (Price *et al.*, 1990), alors qu'injectées de manière intracardiaque elles donnent des métastases osseuses (El Abdaimi *et al.*, 2000, Hiraga *et al.*, 2001). Dans notre modèle, la présence de foyers inflammatoires autour des artères pulmonaires nous a laissé penser que l'immunosuppression n'était pas suffisante, et que les cellules qui migraient au niveau des poumons étaient automatiquement éradiquées par le système immunitaire. Nous avons donc tenté d'augmenter la dose de CysA (55mg/kg) pour inhiber un peu plus la réponse immunitaire. Une telle dose d'immunosuppresseur a conduit à la mort des animaux en 5 jours.

Un autre moyen pour augmenter le pouvoir métastatique de la lignée est l'injection des cellules au niveau d'un site plus vascularisé, comme par exemple les mamelles thoraciques (Meschter *et al.*, 1992), ce que nous n'avons pas réalisé. Cependant, Price et son équipe ont montré que les cellules MDA-MB-231 ont aussi un faible pouvoir métastatique chez la souris « nude » (Price and Zhang, 1990). L'utilisation d'une autre lignée cellulaire comme par exemple les cellules MDA-MB-435 présentant les mêmes caractéristiques que les cellules MDA-MB-231, et ayant un fort potentiel métastatique chez la souris « nude », pourrait peut être améliorer ce modèle en nous rapprochant encore un peu plus de la réalité clinique de la maladie.

Il faut toute fois noter, que les modèles animaux basés sur le principe de greffe de section tumorale ou d'injection de cellules cancéreuses ne reflètent pas la réalité de l'angiogenèse tumorale. En effet, les mécanismes angiogéniques mis en place lors de greffe différent de ceux impliqués lors de l'apparition de tumeurs spontanées.

III.2. Techniques d'imageries médicales

Les techniques modernes de médecine nucléaire permettent à l'heure actuelle de diagnostiquer des tumeurs non décelables par d'autres moyens et/ou de confirmer un diagnostic obtenu par d'autres techniques d'imagerie. Deux traceurs ont été utilisés lors de cette étude : le 18(F)-FDG et le ^{99m}Tc-MIBI.

III.2.a. 18(F)-FDG

Le 18(F)-FDG est un analogue du glucose. Il est transformé en 18-FDG-6-phosphate par les kinases cellulaires. Il ne peut alors plus être métabolisé et s'accumule dans les cellules. Ce phénomène est observé pour les cellules des organes à forte activité métabolique tel que le cœur ou le cerveau (Som *et al.*, 1980). A cette fixation physiologique s'ajoute l'accumulation de FDG au niveau des cellules tumorales. A ce niveau, la fixation de FDG est en corrélation avec l'activité métabolique de la tumeur, et par ce fait avec son caractère agressif. L'utilisation du 18(F)-FDG est de plus en plus répandue dans les diagnostics de cancérologie, car toute modification métabolique est observée bien avant les modifications morphologiques qui s'en suivent (Amano *et al.*, 1998, Gambhir, 2002, Price, 2001). Ce n'est pourtant pas ce qui a pu être mis en évidence dans notre modèle. En effet les tumeurs palpables 4 à 5 jours

après l'injection ne sont détectables au FDG qu'au bout de trois semaines. Cela vient du fait que la caméra utilisée est dédiée aux hommes et non pas aux animaux, et que sa limite de détection est de l'ordre de 8 mm. Ainsi les tumeurs de taille inférieure sont difficilement décelables. Ces problèmes pourraient être éradiqués en utilisant un système de « MicroPet », dédié uniquement aux petits animaux et ayant une plus grande résolution en décelant des lésions de 2 mm de diamètre (Chatziioannou *et al.*, 1999, Oyama *et al.*, 2002). La faible fixation de FDG par notre modèle tumoral, comparé à d'autres modèles animaux (ostéosarcome, mélanome) étudiés par notre équipe, permet de le définir comme peu agressif. En effet, les animaux porteurs d'ostéosarcome ou de mélanome présentent un taux de fixation du FDG beaucoup plus élevé que pour notre modèle de cancer du sein. Cette forte activité métabolique est corrélée à une faible survie des animaux porteurs de ces tumeurs, alors que notre modèle, suivi pendant 7 semaines n'a pas occasionné de décès liés au développement et au caractère agressif de la tumeur.

L'utilisation du FDG voit surtout son utilité dans le suivi de l'évolution des pathologies malignes *in vivo*. Nous avons pu suivre l'évolution des tumeurs sur trois semaines à l'aide d'examens hebdomadaires, sans avoir besoin de sacrifier les animaux. L'examen au FDG permet de confirmer qu'il s'agit bien d'une tumeur et non pas d'une réaction inflammatoire. En effet 5 heures après l'injection du traceur, le taux de fixation du FDG par la zone inflammatoire est négligeable par rapport à la fixation tumorale (Monteil, communication personnelle).

En clinique humaine, les images sont générées 1 heure après l'injection de FDG, par le passage sous la caméra gamma. Il s'est avéré que *in vitro* le taux d'accumulation est beaucoup important à 4 heures qu'à une 1 heure. Cependant il n'est pas nécessaire de prolonger cette phase de diffusion du FDG dans l'organisme, puisque entre 4 et 5 heures un plateau d'accumulation apparaît. Pour ces raisons, nous générons nos images 4 heures après l'injection de traceur.

III.2.b. ^{99m}Tc -MIBI

Le ^{99m}Tc -MIBI est, à l'origine, un traceur utilisé comme agent de perfusion myocardique. A l'heure actuelle, le ^{99m}Tc -MIBI est utilisé comme traceur de scintigraphie pour un certain nombre de tumeurs comme les gliomes, les tumeurs osseuses, les cancers du

poumon, de la thyroïde et du sein (Caner *et al.*, 1991, Prats *et al.*, 1999). Le ^{99m}Tc -MIBI est un radiotraceur lipophile et cationique, et son accumulation se situe principalement au niveau mitochondrial. Elle est due au potentiel électrique généré au travers des membranes mitochondriales. Les tumeurs maintiennent un potentiel transmembranaire très négatif d'où une accumulation du traceur dans ces cellules.

L'utilisation du ^{99m}Tc -MIBI dans notre modèle animal, ne nous a pas permis d'obtenir d'accumulation de traceur au niveau de la tumeur, quelque soit le délai entre l'injection et le passage sous la caméra, et quelque soit la taille de la tumeur. Ces résultats ont été confirmés *in vitro*, puisque contrairement au FDG, les cellules MDA-MB-231, n'accumulent que très peu le ^{99m}Tc -MIBI. Le ^{99m}Tc -MIBI est l'un des substrats de la protéine P-gp ainsi que de la protéine MRP1 toutes deux impliquées dans les mécanismes de MDR. Nous avons donc recherché la présence de ces deux gènes dans notre lignée cellulaire, afin de justifier l'absence d'accumulation du MIBI. Les cellules MDA-MB-231 n'expriment pas la P-gp, mais en revanche expriment le gène *mrp1*. Ceci est en rapport avec les travaux de Moretti, montrant que l'expression de l'une ou l'autre des deux protéines est suffisante pour obtenir une absence d'accumulation du ^{99m}Tc -MIBI dans les cellules tumorales (Moretti *et al.*, 1998).

L'absence de fixation du ^{99m}Tc -MIBI est donc probablement un signe de résistance à la chimiothérapie et l'utilisation de ce traceur en tant que prédicateur de réponse aux médicaments pourrait faciliter le traitement de certaines patientes. De plus, la réalisation d'un examen au FDG suivi d'un examen au ^{99m}Tc -MIBI et la superposition des deux images obtenues permettrait de déterminer la présence de métastases chimiorésistantes et ainsi d'adapter le protocole thérapeutique.

Nous avons donc mis au point au cours de la première partie de notre travail, un modèle animal d'adénocarcinome mammaire humain. Ce modèle, proche de la réalité clinique (malgré l'absence de métastases pulmonaires) nous a permis dans un second temps, d'étudier l'efficacité thérapeutique de deux stratégies anticancéreuses vectorisées par les liposomes cationiques : l'utilisation du gène anti-angiogénique de l'endostatine, et l'utilisation du système de gène suicide *hsv1-tk*.

IV. Efficacité des stratégies anticancéreuses

Nos travaux portaient sur l'étude de l'efficacité thérapeutique de deux stratégies anticancéreuses : une stratégie antiangiogénique avec le gène de l'endostatine et une stratégie par transfert de gène de sensibilité avec le gène hsv1-tk. Cette étude a été réalisée en deux temps : *in vitro*, par l'étude du système hsv1-tk sur une lignée d'adénocarcinome mammaire humain, et *in vivo* pour les deux gènes décrits. Les études *in vivo* ont été réalisées sur le modèle animal que nous avons mis au point.

Ces études *in vitro* et *in vivo* avaient pour but de l'efficacité anticancéreuse des deux présentés, hsv1-tk et endostatine, et évaluer leur utilité dans le cadre du cancer du sein.

IV.1. Etudes *in vitro*

Les études *in vitro* ont été menées à l'aide du système hsv1-tk/GCV, en utilisant les liposomes cationiques comme système de vectorisation.

Le système tk/GCV a largement été utilisé *in vitro*, avec pour principal vecteur les rétrovirus (Elshami *et al.*, 1996, Ezzeddine *et al.*, 1991, Hasegawa *et al.*, 1993, Kasid *et al.*, 1986). Nous même avons tenté au début de notre étude, d'utiliser le système rétroviral pour transfecter nos cellules. Malheureusement, les rétrovirus utilisés ne nous ont pas permis d'obtenir des titres viraux suffisants pour réaliser nos transfections. Les rétrovirus sont connus pour avoir une capacité de transfert plus faible que d'autre système. Ils ne sont capables de transférer l'ADN qu'à des cellules en division et l'insertion de l'acide nucléique dans la cellule hôte se fait de manière aléatoire, pouvant soit activer un proto-oncogène soit inactiver un anti-oncogène (Rochlitz, 2000). La mise au point de techniques non virales a permis d'élargir le champ des recherches, et d'envisager des méthodes de transfert beaucoup plus sûres. Une de ces stratégies non virale est l'utilisation de liposomes cationiques comme vecteurs de la thérapie génique. Les résultats obtenus, *in vitro* avec le système hsv1-tk/GCV sont très variables et sont fonctions du type cellulaire étudié (Li *et al.*, 1999). En effet, il existe une grande différence de sensibilité des cellules au système tk/GCV (Sturtz *et al.*, 1997), et plus particulièrement au GCV (DeFatta *et al.*, 2002). Nous avons donc chercher si le

système hsv1-tk/GCV était capable d'induire une inhibition de la croissance des cellules MDA-MB-231 *in vitro*. Dans notre étude, les cellules MDA-MB-231 présentent une IC₅₀ de l'ordre de 900 µM. Leur transfection transitoire par 0,8 µg de lipoplexes pcDNA-tk entraîne une diminution de l'IC₅₀ qui passe de 900 µM à 100 µM. Ceci démontre la fonctionnalité du gène que nous avons cloné. Cependant la concentration de GCV nécessaire pour obtenir 50% de mortalité reste élevée. D'après la classification donnée par Sturtz et *al*, les cellules MDA-MB-231, sont insensibles au système tk/GCV (Sturtz *et al.*, 1997). De Fatta a obtenu des résultats similaires en terme de sensibilité cellulaire, mais pour lui il s'agit de variations de sensibilité au GCV et non pas au système dans son ensemble. Il émet l'hypothèse d'une implication d'une protéine de la MDR dans cette résistance (DeFatta *et al.*, 2002). En effet, les protéines MRP4 et MRP5 ont pour substrats les nucléosides et leurs analogues sous forme monophosphates (Leonessa and Clarke, 2003). Le GCV, analogue nucléosidique, est monophosphaté par la thymidine kinase de l'hsv1. Il rentre alors dans la catégorie de substrats des deux protéines. La faible efficacité du système hsv1-tk peut aussi s'expliquer par le choix du système de vectorisation. En effet, les liposomes cationiques utilisés ont une grande affinité pour les cellules endothéliales, et la transfection *in vitro* de cellules cancéreuses par ce système n'est peut être pas optimale.

La diminution de l'IC₅₀ observée après transfection dans notre étude, n'est pas seulement due à l'action du système tk/GCV. En effet une mortalité de 40% est observée pour 1 µg de lipoplexes en l'absence de GCV. A ces concentrations aucune toxicité n'est obtenue pour les liposomes vides. De plus, la transfection des cellules MDA-MB-231 par 0,8 µg de lipoplexes pcDNA3.1+ provoque une diminution de l'IC₅₀ de 900 à 500 µM. L'efficacité du système tk/GCV doit donc être jugée sur la différence d'IC₅₀ entre les cellules transfectées par les lipoplexes pcDNA3.1+ (cellules contrôles) et les cellules transfectées par les lipoplexes pcDNA-tk (cellules traitées). L'efficacité propre au système tk/GCV n'est plus de 9 fois (IC₅₀ de 900 à 100 µM), mais de 5 fois (IC₅₀ de 500 à 100 µM).

La toxicité des lipoplexes *in vitro* est liée au rapport de charge entre les différents lipides cationiques, entrant dans la composition des liposomes, et les acides nucléiques (Dass, 2002). La concentration de lipoplexes joue aussi un rôle important, du fait de la quantité d'ADN apportée. C'est alors la toxicité propre de l'ADN qui est en cause. Nous avons montré que la toxicité est dose dépendante avec une toxicité maximale à 1 µg d'ADN. De plus, la

toxicité augmente avec le nombre de transfections (Dutour, communication personnelle). Enfin, l'administration de lipoplexes *in vitro*, provoque des modifications importantes au niveau des cellules, avec une réduction importante du nombre de mitoses, l'apparition de nombreuses vacuoles au niveau cytoplasmique (Lappalainen *et al.*, 1994), et les lipoplexes peuvent également modifier l'activité de certaines protéines (Aberle *et al.*, 1998).

In vitro, malgré une faible efficacité du système hsv1-tk/GCV, une inhibition de la croissance tumorale a tout de même été observée. Cette activité anti proliférative propre au système, méritait d'être testée *in vivo*.

IV.2. Etudes *in vivo*

- Le système hsv1-tk/GCV

Le système tk/GCV a largement été décrit *in vivo*, et les principaux vecteurs de transfert utilisés, tout comme *in vitro*, sont les rétrovirus et les adénovirus (Chhikara *et al.*, 2001, Engelmann *et al.*, 2002, Ezzeddine *et al.*, 1991, Fukui *et al.*, 2001, Hasegawa *et al.*, 1993, Kasid *et al.*, 1986, Kwon *et al.*, 2003, Mavria and Porter, 2001, Wei *et al.*, 1998). Mais les risques liés à l'utilisation des vecteurs viraux ont entraîné l'utilisation de liposomes cationiques, malgré la faible efficacité de transfert qui leur est habituellement attribuée. Dans un liposome cationique, l'ADN chargé négativement est compacté dans une capsule lipidique chargée positivement. Le complexe qui en résulte est chargé positivement et est appelé lipoplexe. Ce processus permet, de protéger l'ADN des nucléases endogènes, donc une expression plus durable du transgène et de transfert des quantités d'ADN plus importantes. De plus, les lipides entrant dans la composition des liposomes sont très peu immunogéniques et n'induisent pas ou peu de toxicité *in vivo*. Toutes ces caractéristiques font des liposomes de bons vecteurs pour la thérapie génique *in vivo*. Et de plus, Princen et son équipe ont obtenu la même efficacité du système tk/GCV en utilisant un système de transfection soit viral (rétrovirus) et non viral (liposomes cationiques) (Princen *et al.*, 2000).

Malgré sa faible efficacité *in vitro*, nous avons testé le système tk/GCV sur le modèle animal précédemment mis au point. Les résultats obtenus sont assez surprenants, puisque à la fin de la première semaine de traitement le groupe traité par les injections intraveineuses de lipoplexes pcDNA-tk suivies d'injection de GCV est le seul à présenter une régression des

volumes tumoraux de l'ordre de 10% par rapport à la semaine précédente. Cette régression vient du fait que les cellules ciblées par les liposomes sont les cellules endothéliales des néo-vaisseaux tumoraux et non pas les cellules MDA-MB-231. Les liposomes cationiques ont la particularité, du fait de leur charge positive, de se fixer préférentiellement aux cellules endothéliales (McLean *et al.*, 1997, Thurston *et al.*, 1998). De plus les liposomes de la société Munichbiotech ont une affinité accrue pour les cellules endothéliales des néo-vaisseaux sanguins tumoraux. Ils ont récemment montré qu'après injection, les liposomes sont retrouvés principalement au niveau de la tumeur, avec absence de localisation dans le tissu musculaire environnant, et une très faible fixation des liposomes au niveau pulmonaire (Krasnici *et al.*, 2003). Cependant après la seconde semaine de traitement, une reprise de la croissance est observée. Les tumeurs semblent échapper à l'effet anti-angiogénique induit par le ciblage des cellules endothéliales. Cette reprise peut être expliquée par les phénomènes de mimétisme vasculogénique que nous discuterons dans le paragraphe consacré à l'endostatine.

Un effet anti-tumoral important est noté pour les groupes contrôles ayant reçu des injections intraveineuses de lipoplexes quels qu'ils soient (lipoplexes pcDNA3.1+, lipoplexes pcDNA3.1+/GCV, lipoplexes pcDNA-tk), avec cependant une diminution plus importante pour les lipoplexes pcDNA-tk. L'injection de lipoplexes pcDNA3.1+ suivie ou non d'injections de GCV provoque une diminution du volume tumoral d'environ 50% par rapport aux animaux n'ayant reçu aucun traitement. En revanche l'injection de lipoplexes pcDNA-tk suivie ou non d'injections de GCV entraîne une inhibition de l'ordre de 65%. Cet effet anti-tumoral est dû à la toxicité propre des lipoplexes. Bien que les liposomes cationiques présentent un très faible pouvoir immunogénique (aucune diminution des volumes tumoraux n'a été observée pour les animaux traités par les liposomes vides) (Dass, 2002), l'association liposomes/ADN, induit une réaction inflammatoire non négligeable. Cette réaction inflammatoire est provoquée par la sécrétion de cytokines telles que le $TNF\alpha$, l' $INF\ \gamma$ ou l'IL-12, en réponse aux séquences CpG non méthylées situées sur les plasmides d'origine virale ou bactérienne. L'injection intraveineuse d'ADN nu n'induit pas la production de cytokine, car il est rapidement dégradé par les nucléases endogènes (Ogris and Wagner, 2002), il n'a donc pas le temps de provoquer une réaction inflammatoire. L'effet antitumoral de cette production de cytokines est loin d'être négligeable, car elle a un grand intérêt dans la mise au point de protocoles d'immunothérapie (Krieg *et al.*, 1999). Siders et son équipe, montrent en 2002, que l'injection de lipoplexes ne contenant aucune séquence codante, mais uniquement un

plasmide, inhibe la croissance tumorale de mélanomes murins M3. De plus, cette injection de lipoplexes protège l'animal contre l'envahissement de novo par le même type cellulaire et n'a aucun effet sur d'autres lignées chez des animaux immunocompétents (Siders *et al.*, 2002). Il semble que notre modèle soit un fort inducteur de cytokines. En effet, une étude menée sur des leucocytes porcins montre que le plasmide pcDNA3.1+ induit une forte production de cytokines, et que cette production est augmentée lorsque le plasmide est administré sous forme de liposomes cationiques (Magnusson *et al.*, 2001). L'inhibition plus importante obtenue pour les lipoplexes pcDNA-tk (15% supplémentaire par rapport à pcDNA3.1+), vient probablement du fait que la séquence du gène hsv1-tk possède à elle seule 122 séquences CpG (www.invivogen.com). Les deux composants de notre système sont donc fortement susceptibles d'engendrer la production de cytokines, qui dans le cas de notre modèle animal est potentialisée par la présence de CysA. En effet, cette dernière bien qu'immunomodulateur a la capacité d'augmenter la production de l'IL-12 liée à la présence de séquences CpG, et de plus elle inhibe la production d'IL-10 qui est notamment un antagoniste de l'IL-12 (Redford *et al.*, 1998). Enfin, certains auteurs ont émis l'hypothèse qu'une production élevée de cytokines peut être à l'origine des décès obtenus après l'injection intraveineuse de lipoplexes, sans aucune relation avec la présence d'endotoxines bactériennes résiduelles de l'amplification du plasmide (Li *et al.*, 1999).

Dans notre étude, les tumeurs semblent capables de pouvoir reprendre leur croissance tumorale malgré le ciblage des cellules endothéliales. L'utilisation de lipoplexes pouvant cibler directement les cellules tumorales grâce à un couplage à des anticorps ou des fragments d'anticorps spécifiques des cellules tumorales pourrait être une alternative. L'utilisation de lipoplexes couplés à des anticorps anti HER2 permet de cibler les cellules de cancer du sein exprimant HER2 (Park *et al.*, 1995). Plus récemment, l'utilisation de lipoplexes couplés à la région variable d'un anticorps anti récepteur de la transferrine, permet d'augmenter l'efficacité de transfection du gène p53, chez des souris « nude » porteuses de cancer du sein métastatique (Xu *et al.*, 2001). Mais l'insensibilité de nos cellules au système hsv1-tk/GCV ne serait pas surmontée par un ciblage spécifique des cellules MDA-MB-231. En revanche il existe une autre catégorie de liposomes, dits liposomes polycationiques, dont le plus utilisé est le polyéthylèneimine (PEI). Il s'agit d'un polymère synthétique permettant le transfert d'ADN *in vitro* et *in vivo* (Ogris and Wagner, 2002). Iwai et son équipe ont montré l'efficacité des

PEI associés à un plasmide dérivé du virus d'Epstein Barr, pour augmenter la sensibilité de certaines cellules au système hsv1-tk/GCV (Iwai *et al.*, 2002).

Le système hsv1-tk/GCV a montré *in vivo*, une efficacité supérieure à celle observée *in vitro*. Cette différence s'explique par le fait que dans notre étude, le système hsv1-tk/GCV a été utilisé comme une stratégie antiangiogénique du fait du ciblage des cellules endothéliales. De plus l'effet observé n'est pas uniquement dû au gène suicide, mais aussi à un effet immunothérapeutique causé par les lipoplexes. Un tel système pourrait être intéressant en clinique humaine, avec toutefois un certain nombre de modification à apporter comme par exemple le contrôle de la réaction inflammatoire pour éviter tout effet secondaire.

- L'endostatine

Folkman et son équipe sont les premiers à avoir démontré l'efficacité *in vitro* et *in vivo* de l'endostatine en obtenant la régression complète chez l'animal de nombreuses tumeurs, et depuis de nombreuses études utilisant l'endostatine comme stratégie antiangiogénèse ont été réalisées (Calvo *et al.*, 2002, Folkman, 1995, O'Reilly *et al.*, 1997, Peroulis *et al.*, 2002, Ye *et al.*, 2002).

Le problème majeur que nous avons rencontré lors de notre étude, est la grande hétérogénéité des volumes tumoraux des différents groupes, du fait que les animaux ont été traités juste une semaine après l'injection des cellules tumorales. Le traitement a débuté si tôt, pour être sûr que l'endostatine soit efficace. En effet, l'endostatine agit très précocement dans le processus d'angiogénèse. La prolifération des cellules endothéliales sous l'action des facteurs pro-angiogéniques provoque la dégradation de la membrane basale tumorale. Il s'en suit l'organisation des cellules en capillaires. L'endostatine est efficace jusqu'à ce stade, car ensuite les cellules mésenchymateuses se différencient en péricytes, qui forment alors un mur vasculaire autour des capillaires : les vaisseaux sanguins sont matures. L'action de l'endostatine sur les cellules endothéliales est diminuée et n'a plus d'influence sur la vascularisation de la tumeur.

Dans notre modèle, nous avons obtenu, après deux semaines de traitement, une diminution du volume tumoral de 65% dans le groupe traité par des injections intraveineuses de lipoplexes pSecEndostatine par rapport aux animaux témoins, n'ayant reçu aucune injection. Nous n'avons pas pu comparer ces résultats aux animaux du groupe contrôle,

puisque qu'ils sont morts dans les 24 heures qui ont suivi la première injection, probablement dû à la présence d'endotoxines bactériennes. Le groupe traité a donc été comparé au groupe contrôle lipoplexes pcDNA3.1+ réalisé en même temps. Ce groupe contrôle présente une diminution du volume tumoral de 50% par rapport au groupe témoin. Sur les 65% d'inhibition de croissance du groupe endostatine, seul 15% sont donc directement imputable à l'endostatine elle-même. Au bout des deux semaines de traitement nous n'avons donc pas observé de régression complète des tumeurs. La question qui se pose est donc de savoir si l'effet observé est bien dû à l'action de l'endostatine ou si nous nous trouvons dans la même situation que pour le système tk/GCV. Le gène de l'endostatine que nous avons utilisé a été cloné au laboratoire et utilisé dans d'autres études. Administré sous forme de lipoplexes, il a permis l'obtention de très bons résultats sur d'autres modèles animaux, tels que l'ostéosarcome ou le mélanome (communications personnelles). La faible efficacité de l'endostatine dans notre cas ne semble donc pas due au mode d'administration, mais plutôt au modèle animal et plus particulièrement à la lignée cellulaire utilisée. Jin et son équipe ont montré que l'injection d'endostatine directement dans des tumeurs générées par l'injection de cellules MDA-MB-231, n'a que très peu d'effet sur la croissance tumorale (Jin *et al.*, 2001). Cette faible efficacité de l'endostatine a aussi été prouvée pour d'autres lignées cellulaires (Eisterer *et al.*, 2002, Pawliuk *et al.*, 2002). Une hypothèse assez controversée a été émise par Maniotis en 1999. Selon lui, certaines cellules tumorales ont la capacité de développer des pseudo vaisseaux sanguins sans faire intervenir les cellules endothéliales et donc sans déclencher la néo-angiogenèse, on parle alors de néo-vasculogenèse (Folberg *et al.*, 2000, Maniotis *et al.*, 1999). De telles cellules présentent à leur surface un grand nombre de marqueurs normalement spécifiques des cellules endothéliales (récepteur de la thrombine, TIE2, CD31, récepteur à l'endothéline-B et VEGF). Cette hypothèse a été reprise par Hendrix, qui montre que les cellules MDA-MB-231, présentent à leur surface une grande majorité des marqueurs spécifiques des cellules endothéliales. La présence de ces marqueurs pourrait donc leur permettre de mimer la synthèse de néo-vaisseaux sanguins (Hendrix *et al.*, 2000). Elles pourraient alors se passer de l'angiogenèse telle qu'elle est décrite actuellement, pour se développer.

L'endostatine a montré ici son efficacité anticancéreuse dans un modèle de cancer du sein. cette efficacité se définit en terme d'inhibition de la croissance tumorale. En effet, une différence significative de 65% est observée entre le groupe traité par l'endostatine et le

groupe témoin. Cependant, comme pour l'étude du gène suicide, la diminution du volume tumorale est aussi en partie due à l'effet thérapeutique des lipoplexes en eux-mêmes.

V. Perspectives

Au cours de nos études, aussi bien *in vitro* que *in vivo*, nous avons rencontré un certain nombre de problèmes, qui mettent en avant les limites de notre modèle.

L'insensibilité des cellules MDA-MB-231 au système hsv1-tk, va dans le sens des études existantes, montrant des variations de sensibilité des cellules tumorales au GCV. Une hypothèse émise est la possible implication de certaines protéines de la MDR (MRP4 et/ou MRP5). La détermination de l'expression de ces protéines, ou des ARNm correspondants pourrait prédire la réponse des cellules testées, au système hsv1-tk/GCV. Une étude plus approfondie, par PCR quantitative par exemple, pourrait nous informer sur le taux d'expression des ARNm, et nous permettre de déterminer si le taux de réponse des cellules est en relation avec le taux des ARNm des protéines MRP4 et/ou MRP5. De telles expérimentations pourraient s'avérer utiles, sur d'autres lignées cellulaires avant de tester *in vitro* et *in vivo* l'effet du système hsv1-tk/GCV.

Nous avons déterminé pour les cellules MDA-MB-231, le statut MRP1. Cette détermination par RT-PCR, nous renseigne sur le fait que les cellules expriment le gène, mais en aucun cas sur le taux d'expression de ce dernier. L'étude de ces cellules, par western blot, immunohistochimie ou encore par PCR quantitative, pourrait permettre la mise en relation de cette expression de MRP1 avec le taux de fixation du ^{99m}Tc -MIBI dans les cellules. Ceci pourrait donner une idée du comportement des cellules vis-à-vis des molécules de chimiothérapie, qui sont des substrats de cette protéine.

Le modèle animal ne présente de métastases pulmonaires. Ceci ne nous permet pas de juger de l'efficacité totale de nos deux systèmes de thérapie génique. En effet, le système hsv1-tk/GCV et l'endostatine ont la capacité de réduire voir même d'inhiber l'apparition des métastases pulmonaires. Il serait donc intéressant d'utiliser d'autres lignées cellulaires avec un pouvoir métastatique plus élevé. Les cellules humaines MDA-MB-435, possédant des caractéristiques proches des cellules que nous avons étudiées, ont la capacité de provoquer des métastases pulmonaires dans 80% des cas lorsqu'elles sont injectées en sites orthotopiques chez la souris « nude ». Pour augmenter encore ce taux de métastases, les

cellules pourraient être injectées dans une mamelle thoracique, mieux vascularisée. Cependant le choix de ce site d'injection ne nous permettrait pas de réaliser les imageries au 18(F)-FDG. En effet le site d'implantation trop proche d'un des sites de fixation physiologique du traceur (le cœur), pourrait gêner l'interprétation des résultats. Les cellules humaines pourraient aussi être remplacées par des cellules d'origine animale, telle que les cellules JYG-A, à fort pouvoir métastatique. L'utilisation de cellules animales, notamment de rat, permettrait la suppression de la cyclosporine A (CysA) pour notre modèle. Il est envisageable que l'utilisation d'animaux non immunodéprimés par la CysA, pourrait influencer la tolérance aux injections répétées de lipoplexes. Les décès que nous avons constatés pour des animaux immunodéprimés par la CysA, n'avaient pas été observés pour des animaux immunocompétents traités de la même manière. La production de cytokines liée aux séquences CpG et à la présence de la CysA nous semble être une des raisons de ce manque de tolérance aux lipoplexes. La comparaison des taux de cytokines chez des animaux immunodéprimés et immunocompétents, ayant reçu les mêmes injections de lipoplexes, pourrait apporter une réponse sur le rôle de la CysA dans cette toxicité. Dans le cas où les cellules humaines restent le modèle d'étude, nous pourrions diminuer les doses de CysA dans le but d'obtenir les conditions permettant une croissance correcte des tumeurs et un taux de production de cytokines plus faible.

Dans l'étude *in vivo* du système hsv1-tk/GCV, le gène cloné pourrait être remplacé par un gène dit « humanisé », sur lequel les séquences CpG sont neutralisées par méthylation. L'amélioration du protocole d'injection devrait aussi donner de meilleurs résultats en terme de tolérance. Des cures répétées constituées par une injection unique de lipoplexes hsv1-tk, suivie de 7 jours de GCV seront notamment testées en terme d'efficacité thérapeutique et de tolérance.

L'utilisation de l'endostatine a elle aussi montré ses limites, concernant son efficacité propre. Les résultats obtenus sont probablement dus au couplage de l'effet antiangiogénique de l'endostatine et de l'effet immunothérapeutique des lipoplexes. Il pourrait être intéressant, après le traitement par des lipoplexes endostatine, d'administrer aux animaux des molécules de chimiothérapie (sous forme classique ou sous forme de liposomes), dans le but de potentialiser l'effet anticancéreux déjà obtenu.

Enfin, des études complémentaires concernant les cellules MDA-MB-231 sont à envisager, afin de déterminer si elles possèdent effectivement les caractéristiques de cellules endothéliales. En effet, si ces cellules possèdent réellement la capacité de générer des vaisseaux sanguins sans faire appel aux cellules endothéliales, nous pourrions déterminer la proportion de ces vaisseaux sanguins par rapport aux néo-vaisseaux classiquement décrits, et ainsi évaluer l'effet thérapeutique des stratégies antiangiogéniques actuelles.

Toutes ces études auront pour but de perfectionner le plus possible notre modèle animal d'une part, et les stratégies thérapeutiques étudiées d'autre part, afin d'envisager la réalisation d'essais cliniques.

CONCLUSION

Le cancer du sein, est dans les pays développés la première cause de mortalité par tumeur maligne chez la femme. Les stratégies thérapeutiques disponibles à l'heure actuelle sont très efficaces lorsque la maladie est diagnostiquée précocement. En revanche, plus le stade est avancé, plus le pronostic est défavorable est le cancer du sein entraîne alors le décès de la patiente par des processus bien souvent de processus métastatiques. Une meilleure connaissance des gènes et la mise en place de la thérapie génique, permettent de nouveaux espoirs en terme de guérison. Cependant, beaucoup reste à faire, avant de pouvoir appliquer la thérapie génique à l'homme. L'un des facteurs limitant de la thérapie génique est le choix du vecteur, qui permettra de véhiculer le gène d'intérêt à la cellule cible. Longtemps utilisés, les vecteurs viraux, présentent un certain nombre d'inconvénients. Malgré une grande efficacité de transfert *in vitro*, et des résultats concluants chez l'animal, les vecteurs viraux présentent une forte immunogénicité, et ont la capacité d'induire d'autres pathologies. Le développement des techniques non virales, comme par exemple les liposomes cationiques, apparaît comme une alternative aux techniques virales.

Nous avons, lors de notre étude, testé deux protocoles de thérapie génique sur un modèle animal d'adénocarcinome mammaire humain, mis au point par nos soins. Ce modèle présente un grand nombre des caractéristiques du cancer du sein tel qu'il se présente chez la femme. Cependant, il ne présente pas de métastases pulmonaires, ce qui est son caractère limitant. Les études anatomopathologiques ainsi que les suivis en imagerie médicale réalisés sur les animaux nous ont permis une bonne connaissance du modèle, nécessaire pour la réalisation de la suite des expérimentations. Même si notre modèle reste à perfectionner, notamment par l'utilisation de cellules aux caractéristiques voisines des nôtres, il constitue un modèle appréciable en matière de manipulation, ce qui n'est pas le cas des animaux « nude ».

Nous avons testé deux stratégies thérapeutiques différentes : l'utilisation d'un système de gène suicide (hsv1-tk/GCV) et une stratégie antiangiogénèse (l'endostatine), toutes deux médiées par des liposomes cationiques. Les liposomes que nous avons utilisés étant spécifiquement dirigés contre les cellules endothéliales des néo-vaisseaux sanguins, nous avons donc, dans les deux cas, ciblé l'angiogénèse tumorale. *In vitro*, le système hsv1-tk/GCV a montré une efficacité relative, due certainement à une insensibilité au GCV des cellules utilisées. De manière très surprenante, ce même système a provoqué chez l'animal une réduction de 65% des volumes tumoraux en comparaison avec les animaux témoins. De la

même manière, l'injection d'endostatine provoque 65% d'inhibition tumorale. Même si ces résultats sont à confirmer en renouvelant l'expérimentation, ils constituent une perspective plus qu'encourageante en matière de traitement du cancer du sein.

L'efficacité obtenue est d'une grande importance, mais il faut rappeler que la thérapie génique n'a pas pour but de remplacer les thérapeutiques existantes, mais de les améliorer. Les stratégies antiangiogéniques pourraient donc être utilisées en première ligne, pour diminuer la vascularisation tumorale et de ce fait affaiblir la tumeur. Cette dernière serait alors plus sensible à l'administration de molécules de chimiothérapie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Aberle, A. M., Tablin, F., Zhu, J., Walker, N. J., Gruenert, D. C. and Nantz, M. H. (1998). "A novel tetraester construct that reduces cationic lipid-associated cytotoxicity. Implications for the onset of cytotoxicity." Biochemistry **37**(18): 6533-40.

Ahmad, I., Longenecker, M., Samuel, J. and Allen, T. M. (1993). "Antibody-targeted delivery of doxorubicin entrapped in sterically stabilized liposomes can eradicate lung cancer in mice." Cancer Res **53**(7): 1484-8.

Amano, S., Inoue, T., Tomiyoshi, K., Ando, T. and Endo, K. (1998). "In vivo comparison of PET and SPECT radiopharmaceuticals in detecting breast cancer." J Nucl Med **39**(8): 1424-7.

Anderson, T. J., Ferguson, D. J. and Raab, G. M. (1982). "Cell turnover in the "resting" human breast: influence of parity, contraceptive pill, age and laterality." Br J Cancer **46**(3): 376-82.

Andre, T., Chastre, E., Kotelevets, L., Vaillant, J. C., Louvet, C., Balosso, J., Le Gall, E., Prevot, S. and Gespach, C. (1998). "[Tumoral angiogenesis: physiopathology, prognostic value and therapeutic perspectives]." Rev Med Interne **19**(12): 904-13.

Arteaga, C. L. and Holt, J. T. (1996). "Tissue-targeted antisense c-fos retroviral vector inhibits established breast cancer xenografts in nude mice." Cancer Res **56**(5): 1098-1103.

Asano, M., Yukita, A., Matsumoto, T., Kondo, S. and Suzuki, H. (1995). "Inhibition of tumor growth and metastasis by an immunoneutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor121." Cancer Res **55**(22): 5296-301.

Augeron, C. and Labois, C. L. (1984). "Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate." Cancer Res **44**(9): 3961-9.

B

Balakrishnan, A., Yang, J., Beattie, C. W., Das Gupta, T. K. and Nandi, S. (1987). "Estrogen receptor in dissociated and cultured human breast fibroadenoma epithelial cells." Cancer Lett **34**(3): 233-42.

Bandyopadhyay, A., Zhu, Y., Cibull, M. L., Bao, L., Chen, C. and Sun, L. (1999). "A soluble transforming growth factor beta type III receptor suppresses tumorigenicity and metastasis of human breast cancer MDA-MB-231 cells." Cancer Res **59**(19): 5041-6.

Barba, D., Hardin, J., Sadelain, M. and Gage, F. H. (1994). "Development of anti-tumor immunity following thymidine kinase-mediated killing of experimental brain tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(10): 4348-52.

Berghammer, P., Obwegeser, R., Mulauer-Ertl, S., Karanikas, G., Wiltschke, C., Kubista, E., Sinzinger, H. and Zielinski, C. (1999). "^{99m}Tc-tetrofosmin scintigraphy and breast cancer." Gynecol Oncol **73**(1): 87-90.

Bi, W. L., Parysek, L. M., Warnick, R. and Stambrook, P. J. (1993). "In vitro evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSV tk retroviral gene therapy." Hum Gene Ther **4**(6): 725-31.

Boehm, T., Folkman, J., Browder, T. and O'Reilly, M. S. (1997). "Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance." Nature **390**(6658): 404-7.

Bosch, I. and Croop, J. (1996). "P-glycoprotein multidrug resistance and cancer." Biochim Biophys Acta **1288**(2): F37-54.

Boudreau, N. and Myers, C. (2003). "Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment." Breast Cancer Res **5**(3): 140-6.

Bradshaw, D. M. and Arceci, R. J. (1998). "Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance." J Clin Oncol **16**(11): 3674-90.

Brisken, C. (2002). "Hormonal control of alveolar development and its implications for breast carcinogenesis." J Mammary Gland Biol Neoplasia **7**(1): 39-48.

C

Cailleau, R., Young, R., Olive, M. and Reeves, W. J., Jr. (1974). "Breast tumor cell lines from pleural effusions." J Natl Cancer Inst **53**(3): 661-74.

Calvo, A., Feldman, A. L., Libutti, S. K. and Green, J. E. (2002). "Adenovirus-mediated endostatin delivery results in inhibition of mammary gland tumor growth in C3(1)/SV40 T-antigen transgenic mice." Cancer Res **62**(14): 3934-8.

Caner, B., Kitapci, M., Aras, T., Erben, G., Ugur, O. and Bekdik, C. (1991). "Increased accumulation of hexakis (2-methoxyisobutylisonitrile)technetium(I) in osteosarcoma and its metastatic lymph nodes." J Nucl Med **32**(10): 1977-8.

Carlsson, G., Gullberg, B. and Hafstrom, L. (1983). "Estimation of liver tumor volume using different formulas - an experimental study in rats." J Cancer Res Clin Oncol **105**(1): 20-3.

Caruso, M., Panis, Y., Gagandeep, S., Houssin, D., Salzmann, J. L. and Klatzmann, D. (1993). "Regression of established macroscopic liver metastases after in situ transduction of a suicide gene." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(15): 7024-8.

Casey, G., Lo-Hsueh, M., Lopez, M. E., Vogelstein, B. and Stanbridge, E. J. (1991). "Growth suppression of human breast cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene." Oncogene **6**(10): 1791-7.

Charissoux, J. L., Grossin, L., Leboutet, M. J. and Rigaud, M. (1999). "Treatment of experimental osteosarcoma tumors in rat by herpes simplex thymidine kinase gene transfer and ganciclovir." Anticancer Res **19**(1A): 77-80.

Chatziioannou, A. F., Cherry, S. R., Shao, Y., Silverman, R. W., Meadors, K., Farquhar, T. H., Pedarsani, M. and Phelps, M. E. (1999). "Performance evaluation of microPET: a high-resolution lutetium oxyorthosilicate PET scanner for animal imaging." J Nucl Med **40**(7): 1164-75.

Chhikara, M., Huang, H., Vlachaki, M. T., Zhu, X., Teh, B., Chiu, K. J., Woo, S., Berner, B., Smith, E. O., Oberg, K. C., Aguilar, L. K., Thompson, T. C., Butler, E. B. and Aguilar-Cordova, E. (2001). "Enhanced therapeutic effect of HSV-tk+GCV gene therapy and ionizing radiation for prostate cancer." Mol Ther **3**(4): 536-42.

Chodosh, L. A., D'Cruz, C. M., Gardner, H. P., Ha, S. I., Marquis, S. T., Rajan, J. V., Stairs, D. B., Wang, J. Y. and Wang, M. (1999). "Mammary gland development, reproductive history, and breast cancer risk." Cancer Res **59**(7 Suppl): 1765-1771s; discussion 1771s-1772s.

Consalvo, M., Mullen, C. A., Modesti, A., Musiani, P., Allione, A., Cavallo, F., Giovarelli, M. and Forni, G. (1995). "5-Fluorocytosine-induced eradication of murine adenocarcinomas engineered to express the cytosine deaminase suicide gene requires host immune competence and leaves an efficient memory." J Immunol **154**(10): 5302-12.

Culver, K. W., Ram, Z., Wallbridge, S., Ishii, H., Oldfield, E. H. and Blaese, R. M. (1992). "In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors." Science **256**(5063): 1550-2.

D

Dass, C. R. (2002). "Cytotoxicity issues pertinent to lipoplex-mediated gene therapy in-vivo." J Pharm Pharmacol **54**(5): 593-601.

Dass, C. R. (2002). "Immunostimulatory activity of cationic-lipid-nucleic-acid complexes against cancer." J Cancer Res Clin Oncol **128**(4): 177-81.

Davis, H. L., Demeneix, B. A., Quantin, B., Coulombe, J. and Whalen, R. G. (1993). "Plasmid DNA is superior to viral vectors for direct gene transfer into adult mouse skeletal muscle." Hum Gene Ther **4**(6): 733-40.

de Boer, A. G., van der Sandt, I. C. and Gaillard, P. J. (2003). "The role of drug transporters at the blood-brain barrier." Annu Rev Pharmacol Toxicol **43**: 629-56.

Dean, M., Hamon, Y. and Chimini, G. (2001). "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily." J Lipid Res **42**(7): 1007-17.

DeFatta, R. J., Chervenak, R. P. and De Benedetti, A. (2002). "A cancer gene therapy approach through translational control of a suicide gene." Cancer Gene Ther **9**(6): 505-12.

DeFatta, R. J., Li, Y. and De Benedetti, A. (2002). "Selective killing of cancer cells based on translational control of a suicide gene." Cancer Gene Ther **9**(7): 573-8.

Del Vecchio, S., Ciarmiello, A., Pace, L., Potena, M. I., Carriero, M. V., Mainolfi, C., Thomas, R., D'Aiuto, G., Tsuruo, T. and Salvatore, M. (1997). "Fractional retention of technetium-99m-sestamibi as an index of P-glycoprotein expression in untreated breast cancer patients." J Nucl Med **38**(9): 1348-51.

Deshane, J., Loechel, F., Conry, R. M., Siegal, G. P., King, C. R. and Curiel, D. T. (1994). "Intracellular single-chain antibody directed against erbB2 down-regulates cell surface erbB2 and exhibits a selective anti-proliferative effect in erbB2 overexpressing cancer cell lines." Gene Ther **1**(5): 332-7.

Deshane, J., Siegal, G. P., Alvarez, R. D., Wang, M. H., Feng, M., Cabrera, G., Liu, T., Kay, M. and Curiel, D. T. (1995). "Targeted tumor killing via an intracellular antibody against erbB-2." J Clin Invest **96**(6): 2980-9.

Ding, I., Sun, J. Z., Fenton, B., Liu, W. M., Kimsely, P., Okunieff, P. and Min, W. (2001). "Intratumoral administration of endostatin plasmid inhibits vascular growth and perfusion in MCA-4 murine mammary carcinomas." Cancer Res **61**(2): 526-31.

Dow, S. W., Fradkin, L. G., Liggitt, D. H., Willson, A. P., Heath, T. D. and Potter, T. A. (1999). "Lipid-DNA complexes induce potent activation of innate immune responses and antitumor activity when administered intravenously." J Immunol **163**(3): 1552-61.

E

Eccles, S. A. (2001). "The role of c-erbB-2/HER2/neu in breast cancer progression and metastasis." J Mammary Gland Biol Neoplasia **6**(4): 393-406.

Eisterer, W., Jiang, X., Bachelot, T., Pawliuk, R., Abramovich, C., Leboulch, P., Hogge, D. and Eaves, C. (2002). "Unfulfilled promise of endostatin in a gene therapy-xenotransplant model of human acute lymphocytic leukemia." Mol Ther **5**(4): 352-9.

El Abdaimi, K., Dion, N., Papavasiliou, V., Cardinal, P. E., Binderup, L., Goltzman, D., Ste-Marie, L. G. and Kremer, R. (2000). "The vitamin D analogue EB 1089 prevents skeletal metastasis and prolongs survival time in nude mice transplanted with human breast cancer cells." Cancer Res **60**(16): 4412-8.

Elshami, A. A., Saavedra, A., Zhang, H., Kucharczuk, J. C., Spray, D. C., Fishman, G. I., Amin, K. M., Kaiser, L. R. and Albelda, S. M. (1996). "Gap junctions play a role in the

'bystander effect' of the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system in vitro." Gene Ther **3**(1): 85-92.

Engelmann, C., Heslan, J. M., Fabre, M., Lagarde, J. P., Klatzmann, D. and Panis, Y. (2002). "Importance, mechanisms and limitations of the distant bystander effect in cancer gene therapy of experimental liver tumors." Cancer Lett **179**(1): 59-69.

Ezzeddine, Z. D., Martuza, R. L., Platika, D., Short, M. P., Malick, A., Choi, B. and Breakefield, X. O. (1991). "Selective killing of glioma cells in culture and in vivo by retrovirus transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene." New Biol **3**(6): 608-14.

F

Fattori, E., La Monica, N., Ciliberto, G. and Toniatti, C. (2002). "Electro-gene-transfer: a new approach for muscle gene delivery." Somat Cell Mol Genet **27**(1-6): 75-83.

Faulds, D. and Heel, R. C. (1990). "Ganciclovir. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cytomegalovirus infections." Drugs **39**(4): 597-638.

Ferguson, D. J. and Anderson, T. J. (1981). "Morphological evaluation of cell turnover in relation to the menstrual cycle in the "resting" human breast." Br J Cancer **44**(2): 177-81.

Folberg, R., Hendrix, M. J. and Maniotis, A. J. (2000). "Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis." Am J Pathol **156**(2): 361-81.

Folkman, J. (1995). "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease." Nat Med **1**(1): 27-31.

Folkman, J. (1995). "Angiogenesis inhibitors generated by tumors." Mol Med **1**(2): 120-2.

Freeman, S. M., Abboud, C. N., Whartenby, K. A., Packman, C. H., Koeplin, D. S., Moolten, F. L. and Abraham, G. N. (1993). "The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified." Cancer Res **53**(21): 5274-83.

Fujiwara, T., Grimm, E. A., Mukhopadhyay, T., Cai, D. W., Owen-Schaub, L. B. and Roth, J. A. (1993). "A retroviral wild-type p53 expression vector penetrates human lung cancer spheroids and inhibits growth by inducing apoptosis." Cancer Res **53**(18): 4129-33.

Fukui, T., Hayashi, Y., Kagami, H., Yamamoto, N., Fukuhara, H., Tohnai, I., Ueda, M., Mizuno, M. and Yoshida, J. (2001). "Suicide gene therapy for human oral squamous cell carcinoma cell lines with adeno-associated virus vector." Oral Oncol **37**(3): 211-5.

Fuster, D., Munoz, M., Pavia, J., Palacin, A., Bellet, N., Mateos, J. J., Martin, F., Ortega, M., Setoain, F. J. and Pons, F. (2002). "Quantified 99mTc-MIBI scintigraphy for predicting chemotherapy response in breast cancer patients: factors that influence the level of 99m Tc-MIBI uptake." Nucl Med Commun **23**(1): 31-8.

G

Gabizon, A., Isacson, R., Libson, E., Kaufman, B., Uziely, B., Catane, R., Ben-Dor, C. G., Rabello, E., Cass, Y., Peretz, T. and et al. (1994). "Clinical studies of liposome-encapsulated doxorubicin." Acta Oncol **33**(7): 779-86.

Gambhir, S. S. (2002). "Molecular imaging of cancer with positron emission tomography." Nat Rev Cancer **2**(9): 683-93.

Georges, R. N., Mukhopadhyay, T., Zhang, Y., Yen, N. and Roth, J. A. (1993). "Prevention of orthotopic human lung cancer growth by intratracheal instillation of a retroviral antisense K-ras construct." Cancer Res **53**(8): 1743-6.

Giaccone, G., Linn, S. C. and Pinedo, H. M. (1995). "Multidrug resistance in breast cancer: mechanisms, strategies." Eur J Cancer **31A Suppl 7**: S15-7.

Goodman, M. M., McCullough, J. L., Biren, C. A. and Barr, R. J. (1987). "A model of human melanoma in cyclosporine-immunosuppressed rats." J Invest Dermatol **88**(2): 141-4.

Gould, M. N. (1995). "Rodent models for the study of etiology, prevention and treatment of breast cancer." Semin Cancer Biol **6**(3): 147-52.

Grossin, L., Charissoux, J. L., Teissier, M. P. and Rigaud, M. (1999). "Selective killing of osteosarcoma cells in culture after retroviral mediated gene transfer of a herpes simplex thymidine kinase suicide gene." Anticancer Res **19**(1A): 71-6.

Guild, B. C., Finer, M. H., Housman, D. E. and Mulligan, R. C. (1988). "Development of retrovirus vectors useful for expressing genes in cultured murine embryonal cells and hematopoietic cells in vivo." J Virol **62**(10): 3795-801.

Gusterson, B., Howard, B., Crook, T. and Tennent, B. (1999). "Do we now have a relevant animal model for breast cancer?" Breast Cancer Res **1**(1): 2-4.

H

Hardman, W. E., Avula, C. P., Fernandes, G. and Cameron, I. L. (2001). "Three percent dietary fish oil concentrate increased efficacy of doxorubicin against MDA-MB 231 breast cancer xenografts." Clin Cancer Res **7**(7): 2041-9.

Hasegawa, Y., Emi, N. and Shimokata, K. (1995). "Retroviral transfer of HSV1-TK gene into human lung cancer cell line." J Mol Med **73**(3): 107-12.

Hasegawa, Y., Emi, N., Shimokata, K., Abe, A., Kawabe, T., Hasegawa, T., Kirioka, T. and Saito, H. (1993). "Gene transfer of herpes simplex virus type I thymidine kinase gene as a drug sensitivity gene into human lung cancer cell lines using retroviral vectors." Am J Respir Cell Mol Biol **8**(6): 655-61.

Hendrix, M. J., Seftor, E. A., Kirschmann, D. A. and Seftor, R. E. (2000). "Molecular biology of breast cancer metastasis. Molecular expression of vascular markers by aggressive breast cancer cells." Breast Cancer Res **2**(6): 417-22.

Hersh EM, Akporiaye E, Harris D, Stopeck AT, Unger EC, Warneke JA, Kradjian SA (1994). "Phase I study of immunotherapy of malignant melanoma by direct gene transfer". Hum Gene Ther **5**(11):1371-84.

Hiraga, T., Williams, P. J., Mundy, G. R. and Yoneda, T. (2001). "The bisphosphonate ibandronate promotes apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells in bone metastases." Cancer Res **61**(11): 4418-24.

Holt, J. T., Thompson, M. E., Szabo, C., Robinson-Benion, C., Arteaga, C. L., King, M. C. and Jensen, R. A. (1996). "Growth retardation and tumour inhibition by BRCA1." Nat Genet **12**(3): 298-302.

Hoogenhout, J., Kazem, I., Jerusalem, C. R., Bakkeren, J. A., de Jong, J., Kal, H. B. and van Munster, P. J. (1983). "Growth pattern of tumor xenografts in Wistar rats after treatment with cyclophosphamide, total lymphoid irradiation and/or cyclosporin A." Int J Radiat Oncol Biol Phys **9**(6): 871-9.

Hutchinson, J. N. and Muller, W. J. (2000). "Transgenic mouse models of human breast cancer." Oncogene **19**(53): 6130-7.

Hynes, N. E. and Lane, H. A. (2001). "Myc and mammary cancer: Myc is a downstream effector of the ErbB2 receptor tyrosine kinase." J Mammary Gland Biol Neoplasia **6**(1): 141-50.

I

Indraccolo, S., Gola, E., Rosato, A., Minuzzo, S., Habeler, W., Tisato, V., Roni, V., Esposito, G., Morini, M., Albini, A., Noonan, D. M., Ferrantini, M., Amadori, A. and Chieco-Bianchi, L. (2002). "Differential effects of angiostatin, endostatin and interferon-alpha(1) gene transfer on in vivo growth of human breast cancer cells." Gene Ther **9**(13): 867-78.

Iwai, M., Harada, Y., Tanaka, S., Muramatsu, A., Mori, T., Kashima, K., Imanishi, J. and Mazda, O. (2002). "Polyethylenimine-mediated suicide gene transfer induces a therapeutic effect for hepatocellular carcinoma in vivo by using an Epstein-Barr virus-based plasmid vector." Biochem Biophys Res Commun **291**(1): 48-54.

J

Jin, X., Bookstein, R., Wills, K., Avanzini, J., Tsai, V., LaFace, D., Terracina, G., Shi, B. and Nielsen, L. L. (2001). "Evaluation of endostatin antiangiogenesis gene therapy in vitro and in vivo." Cancer Gene Ther **8**(12): 982-9.

K

- Kamazawa, S., Kigawa, J., Kanamori, Y., Itamochi, H., Sato, S., Iba, T. and Terakawa, N. (2002). "Multidrug resistance gene-1 is a useful predictor of Paclitaxel-based chemotherapy for patients with ovarian cancer." Gynecol Oncol **86**(2): 171-6.
- Kao, C. H., ChangLai, S. P., Chieng, P. U., Yen, R. F. and Yen, T. C. (1998). "Detection of recurrent or persistent nasopharyngeal carcinomas after radiotherapy with 18-fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography and comparison with computed tomography." J Clin Oncol **16**(11): 3550-5.
- Kao, C. H., Tsai, S. C., Liu, T. J., Ho, Y. J., Wang, J. J., Ho, S. T. and ChangLai, S. P. (2001). "P-Glycoprotein and multidrug resistance-related protein expressions in relation to technetium-99m methoxyisobutylisonitrile scintimammography findings." Cancer Res **61**(4): 1412-4.
- Kashles, O., Yarden, Y., Fischer, R., Ullrich, A. and Schlessinger, J. (1991). "A dominant negative mutation suppresses the function of normal epidermal growth factor receptors by heterodimerization." Mol Cell Biol **11**(3): 1454-63.
- Kasid, A., Davidson, N. E., Gelmann, E. P. and Lippman, M. E. (1986). "Transcriptional control of thymidine kinase gene expression by estrogen and antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells." J Biol Chem **261**(12): 5562-7.
- Keen, J. C. and Davidson, N. E. (2003). "The biology of breast carcinoma." Cancer **97**(3 Suppl): 825-33.
- Kepler, D., Leier, I., Jedlitschky, G. and Konig, J. (1998). "ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance protein MRP1 and its apical isoform MRP2." Chem Biol Interact **111-112**: 153-61.
- Kim, K. J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H. S. and Ferrara, N. (1993). "Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo." Nature **362**(6423): 841-4.
- Kim, Y. M., Jang, J. W., Lee, O. H., Yeon, J., Choi, E. Y., Kim, K. W., Lee, S. T. and Kwon, Y. G. (2000). "Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase." Cancer Res **60**(19): 5410-3.
- Kircheis, R., Kichler, A., Wallner, G., Kursa, M., Ogris, M., Felzmann, T., Buchberger, M. and Wagner, E. (1997). "Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery." Gene Ther **4**(5): 409-18.
- Kozak, M. (1987). "At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells." J Mol Biol **196**(4): 947-50.

Krasnici, S., Werner, A., Eichhorn, M. E., Schmitt-Sody, M., Pahernik, S. A., Sauer, B., Schulze, B., Teifel, M., Michaelis, U., Naujoks, K. and Dellian, M. (2003). "Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels." Int J Cancer **105**(4): 561-7.

Krieg, A. M., Yi, A. K. and Hartmann, G. (1999). "Mechanisms and therapeutic applications of immune stimulatory cpG DNA." Pharmacol Ther **84**(2): 113-20.

Krishna, R. and Mayer, L. D. (2000). "Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs." Eur J Pharm Sci **11**(4): 265-83.

Krougliak, V. and Graham, F. L. (1995). "Development of cell lines capable of complementing E1, E4, and protein IX defective adenovirus type 5 mutants." Hum Gene Ther **6**(12): 1575-86.

Kubista, M., Rosner, M., Kubista, E., Bernaschek, G. and Hengstschlager, M. (2002). "Brcal regulates in vitro differentiation of mammary epithelial cells." Oncogene **21**(31): 4747-56.

Kurdow, R., Boehle, A. S., Ruhnke, M., Mendoza, R., Boenicke, L., Sipos, B., Schniewind, B., Dohrmann, P. and Kalthoff, H. (2003). "Retroviral endostatin gene transfer inhibits growth of human lung cancer in a murine orthotopic xenotransplant model." Langenbecks Arch Surg.

Kursa, M., Walker, G. F., Roessler, V., Ogris, M., Roedl, W., Kircheis, R. and Wagner, E. (2003). "Novel shielded transferrin-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes for systemic tumor-targeted gene transfer." Bioconjug Chem **14**(1): 222-31.

Kwon, G. Y., Jeong, J., Woo, J. K., Choi, H. Y., Lee, M. J., Ko, J. K., Shim, Y. H. and Kim, C. W. (2003). "Co-expression of bfl-1 enhances host response in the herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir gene therapy system." Biochem Biophys Res Commun **303**(3): 756-63.

L

Lambright, E. S., Force, S. D., Lanuti, M. E., Wasfi, D. S., Amin, K. M., Albelda, S. M. and Kaiser, L. R. (2000). "Efficacy of repeated adenoviral suicide gene therapy in a localized murine tumor model." Ann Thorac Surg **70**(6): 1865-70; discussion 1870-1.

Lappalainen, K., Jaaskelainen, I., Syrjanen, K., Urtti, A. and Syrjanen, S. (1994). "Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes." Pharm Res **11**(8): 1127-31.

Lee, C. H., Ni, Y. H., Chen, C. C., Chou, C. and Chang, F. H. (2003). "Synergistic effect of polyethylenimine and cationic liposomes in nucleic acid delivery to human cancer cells." Biochim Biophys Acta **1611**(1-2): 55-62.

Lee, M. J., Straubinger, R. M. and Jusko, W. J. (1995). "Physicochemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of liposomal tacrolimus (FK 506) in rats." Pharm Res **12**(7): 1055-9.

Leonessa, F. and Clarke, R. (2003). "ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer." Endocr Relat Cancer **10**(1): 43-73.

Leslie, E. M., Deeley, R. G. and Cole, S. P. (2001). "Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters." Toxicology **167**(1): 3-23.

Li, P. X., Ngo, D., Brade, A. M. and Klamut, H. J. (1999). "Differential chemosensitivity of breast cancer cells to ganciclovir treatment following adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer." Cancer Gene Ther **6**(2): 179-90.

Li, S., Wu, S. P., Whitmore, M., Loeffert, E. J., Wang, L., Watkins, S. C., Pitt, B. R. and Huang, L. (1999). "Effect of immune response on gene transfer to the lung via systemic administration of cationic lipidic vectors." Am J Physiol **276**(5 Pt 1): L796-804.

Liang, J. A., Shiau, Y. C., Yang, S. N., Lin, F. J., Kao, A. and Lee, C. C. (2002). "Prediction of chemotherapy response in untreated malignant lymphomas using technetium-99m methoxyisobutylisonitrile scan: comparison with P- glycoprotein expression and other prognostic factors. A preliminary report." Jpn J Clin Oncol **32**(4): 140-5.

Lloyd, R. V., Vidal, S., Horvath, E., Kovacs, K. and Scheithauer, B. (2003). "Angiogenesis in normal and neoplastic pituitary tissues." Microsc Res Tech **60**(2): 244-50.

M

Maddahi, J., Kiat, H. and Berman, D. S. (1991). "Myocardial perfusion imaging with technetium-99m-labeled agents." Am J Cardiol **67**(14): 27D-34D.

Magnusson, M., Johansson, E., Berg, M., Eloranta, M. L., Fuxler, L. and Fossum, C. (2001). "The plasmid pcDNA3 differentially induces production of interferon-alpha and interleukin-6 in cultures of porcine leukocytes." Vet Immunol Immunopathol **78**(1): 45-56.

Maniotis, A. J., Folberg, R., Hess, A., SefTOR, E. A., Gardner, L. M., Pe'er, J., Trent, J. M., Meltzer, P. S. and Hendrix, M. J. (1999). "Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry." Am J Pathol **155**(3): 739-52.

Mathiesen, I. (1999). "Electropermeabilization of skeletal muscle enhances gene transfer in vivo." Gene Ther **6**(4): 508-14.

Mavria, G. and Porter, C. D. (2001). "Reduced growth in response to ganciclovir treatment of subcutaneous xenografts expressing HSV-tk in the vascular compartment." Gene Ther **8**(12): 913-20.

- Mayer, L. D., Tai, L. C., Ko, D. S., Masin, D., Ginsberg, R. S., Cullis, P. R. and Bally, M. B. (1989). "Influence of vesicle size, lipid composition, and drug-to-lipid ratio on the biological activity of liposomal doxorubicin in mice." Cancer Res **49**(21): 5922-30.
- McLean, J. W., Fox, E. A., Baluk, P., Bolton, P. B., Haskell, A., Pearlman, R., Thurston, G., Umemoto, E. Y. and McDonald, D. M. (1997). "Organ-specific endothelial cell uptake of cationic liposome-DNA complexes in mice." Am J Physiol **273**(1 Pt 2): H387-404.
- McManaway, M. E., Neckers, L. M., Loke, S. L., al-Nasser, A. A., Redner, R. L., Shiramizu, B. T., Goldschmidts, W. L., Huber, B. E., Bhatia, K. and Magrath, I. T. (1990). "Tumour-specific inhibition of lymphoma growth by an antisense oligodeoxynucleotide." Lancet **335**(8693): 808-11.
- Meschter, C. L., Connolly, J. M. and Rose, D. P. (1992). "Influence of regional location of the inoculation site and dietary fat on the pathology of MDA-MB-435 human breast cancer cell-derived tumors grown in nude mice." Clin Exp Metastasis **10**(3): 167-73.
- Mesnil, M., Piccoli, C., Tiraby, G., Willecke, K. and Yamasaki, H. (1996). "Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(5): 1831-5.
- Miller, F. R. (1981). "Comparison of metastasis of mammary tumors growing in the mammary fatpad versus the subcutis." Invasion Metastasis **1**(4): 220-6.
- Miller, F. R. and McInerney, D. (1988). "Epithelial component of host-tumor interactions in the orthotopic site preference of a mouse mammary tumor." Cancer Res **48**(13): 3698-701.
- Miller, F. R., Medina, D. and Heppner, G. H. (1981). "Preferential growth of mammary tumors in intact mammary fatpads." Cancer Res **41**(10): 3863-7.
- Miller, K. D. (2002). "Issues and challenges for antiangiogenic therapies." Breast Cancer Res Treat **75 Suppl 1**: S45-50; discussion S57-8.
- Mir, L. M. and Orlowski, S. (1999). "Mechanisms of electrochemotherapy." Adv Drug Deliv Rev **35**(1): 107-118.
- Moolten, F. L. (1986). "Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy." Cancer Res **46**(10): 5276-81.
- Moretti, J. L., Duran Cordobes, M., Starzec, A., de Beco, V., Vergote, J., Benazzouz, F., Boissier, B., Cohen, H., Safi, N., Piperno-Neumann, S. and Kouyoumdjian, J. C. (1998). "Involvement of glutathione in loss of technetium-99m-MIBI accumulation related to membrane MDR protein expression in tumor cells." J Nucl Med **39**(7): 1214-8.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.

Mukhopadhyay, T., Tainsky, M., Cavender, A. C. and Roth, J. A. (1991). "Specific inhibition of K-ras expression and tumorigenicity of lung cancer cells by antisense RNA." Cancer Res **51**(6): 1744-8.

Mullen, C. A., Kilstrup, M. and Blaese, R. M. (1992). "Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: a negative selection system." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(1): 33-7.

Murphy, L. C. and Watson, P. (2002). "Steroid receptors in human breast tumorigenesis and breast cancer progression." Biomed Pharmacother **56**(2): 65-77.

N

Nguyen, B., Keane, M. M. and Johnston, P. G. (1995). "The biology of growth regulation in normal and malignant breast epithelium: from bench to clinic." Crit Rev Oncol Hematol **20**(3): 223-36.

O

Ogris, M. and Wagner, E. (2002). "Targeting tumors with non-viral gene delivery systems." Drug Discov Today **7**(8): 479-85.

Ogris, M. and Wagner, E. (2002). "Tumor-targeted gene transfer with DNA polyplexes." Somat Cell Mol Genet **27**(1-6): 85-95.

Olsson, H. (2000). "Tumour biology of a breast cancer at least partly reflects the biology of the tissue/epithelial cell of origin at the time of initiation - a hypothesis." J Steroid Biochem Mol Biol **74**(5): 345-50.

O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R. and Folkman, J. (1997). "Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth." Cell **88**(2): 277-85.

O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Cao, Y., Moses, M., Lane, W. S., Sage, E. H. and Folkman, J. (1994). "Angiostatin: a circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **59**: 471-82.

Oyama, N., Kim, J., Jones, L. A., Mercer, N. M., Engelbach, J. A., Sharp, T. L. and Welch, M. J. (2002). "MicroPET assessment of androgenic control of glucose and acetate uptake in the rat prostate and a prostate cancer tumor model." Nucl Med Biol **29**(8): 783-90.

P

Pandha HS, Martin LA, Rigg A, Hurst HC, Stamp GW, Sikora K, Lemoine NR (1999). "Genetic prodrug activation therapy for breast cancer: A phase I clinical trial of erbB-2-directed suicide gene expression". J Clin Oncol **17**(7):2180-9.

Park, J. W., Hong, K., Carter, P., Asgari, H., Guo, L. Y., Keller, G. A., Wirth, C., Shalaby, R., Kotts, C., Wood, W. I. and et al. (1995). "Development of anti-p185HER2 immunoliposomes for cancer therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1327-31.

Patil, R., Chavez, J. B. and Yee, D. (2000). "Inducible expression of herpes simplex virus thymidine kinase increases sensitivity to ganciclovir but does not enhance bystander effect in breast cancer cells." Breast Cancer Res Treat **62**(2): 109-15.

Pavelic, K. and Gall-Troselj, K. (2001). "Recent advances in molecular genetics of breast cancer." J Mol Med **79**(10): 566-73.

Pawliuk, R., Bachelot, T., Zurkiya, O., Eriksson, A., Cao, Y. and Leboulch, P. (2002). "Continuous intravascular secretion of endostatin in mice from transduced hematopoietic stem cells." Mol Ther **5**(4): 345-51.

Peroulis, I., Jonas, N. and Saleh, M. (2002). "Antiangiogenic activity of endostatin inhibits C6 glioma growth." Int J Cancer **97**(6): 839-45.

Polyak, K. (2001). "On the birth of breast cancer." Biochim Biophys Acta **1552**(1): 1-13.

Prats, E., Aisa, F., Abos, M. D., Villavieja, L., Garcia-Lopez, F., Asenjo, M. J., Razola, P. and Banzo, J. (1999). "Mammography and 99mTc-MIBI scintimammography in suspected breast cancer." J Nucl Med **40**(2): 296-301.

Price, J. E. (1996). "Metastasis from human breast cancer cell lines." Breast Cancer Res Treat **39**(1): 93-102.

Price, J. E., Polyzos, A., Zhang, R. D. and Daniels, L. M. (1990). "Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice." Cancer Res **50**(3): 717-21.

Price, J. E. and Zhang, R. D. (1990). "Studies of human breast cancer metastasis using nude mice." Cancer Metastasis Rev **8**(4): 285-97.

Price, P. (2001). "PET as a potential tool for imaging molecular mechanisms of oncology in man." Trends Mol Med **7**(10): 442-6.

Princen, F., Lechanteur, C., Lopez, M., Gielen, J., Bours, V. and Merville, M. P. (2000). "Similar efficiency of DNA-liposome complexes and retrovirus-producing cells for HSV-tk suicide gene therapy of peritoneal carcinomatosis." J Drug Target **8**(2): 79-89.

R

Redford, T. W., Yi, A. K., Ward, C. T. and Krieg, A. M. (1998). "Cyclosporin A enhances IL-12 production by CpG motifs in bacterial DNA and synthetic oligodeoxynucleotides." J Immunol **161**(8): 3930-5.

Ribas, A., Butterfield, L. H. and Economou, J. S. (2000). "Genetic immunotherapy for cancer." Oncologist **5**(2): 87-98.

Robbins, P. D. and Ghivizzani, S. C. (1998). "Viral vectors for gene therapy." Pharmacol Ther **80**(1): 35-47.

Rochlitz, C. F. (2000). "Gene therapy of cancer." Drugs Today (Barc) **36**(9): 619-29.

Rodrigues, M., Chehne, F., Kalinowska, W., Berghammer, P., Zielinski, C. and Sinzinger, H. (2000). "Uptake of 99mTc-MIBI and 99mTc-tetrofosmin into malignant versus nonmalignant breast cell lines." J Nucl Med **41**(9): 1495-9.

Rosen, E. M., Fan, S., Pestell, R. G. and Goldberg, I. D. (2003). "BRCA1 gene in breast cancer." J Cell Physiol **196**(1): 19-41.

Rubin J, Charboneau JW, Reading C, Kovach JS (1994). "Phase I study of immunotherapy of hepatic metastases of colorectal carcinoma by direct gene transfer". Hum Gene Ther **5**(11):1385-99.

Rudland, P. S., Fernig, D. G. and Smith, J. A. (1995). "Growth factors and their receptors in neoplastic mammary glands." Biomed Pharmacother **49**(9): 389-99.

Runnebaum, I. B. and Kreienberg, R. (1995). "p53 trans-dominantly suppresses tumor formation of human breast cancer cells mediated by retroviral bulk infection without marker gene selection: an expeditious in vitro protocol with implications towards gene therapy." Hybridoma **14**(2): 153-7.

Russo, I. H. and Russo, J. (1998). "Role of hormones in mammary cancer initiation and progression." J Mammary Gland Biol Neoplasia **3**(1): 49-61.

S

Saijo, M., Suzutani, T., Itoh, K., Hirano, Y., Muro, K., Nagamine, M., Mizuta, K., Niikura, M. and Morikawa, S. (1999). "Nucleotide sequence of thymidine kinase gene of sequential acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 isolates recovered from a child with Wiskott-Aldrich syndrome: evidence for reactivation of acyclovir-resistant herpes simplex virus." J Med Virol **58**(4): 387-93.

Samulski, R. J. (1993). "Adeno-associated virus: integration at a specific chromosomal locus." Curr Opin Genet Dev **3**(1): 74-80.

Siders, W. M., Vergillis, K., Johnson, C., Scheule, R. K. and Kaplan, J. M. (2002). "Tumor treatment with complexes of cationic lipid and noncoding plasmid DNA results in the induction of cytotoxic T cells and systemic tumor elimination." Mol Ther **6**(4): 519-27.

Sikic, B. I., Fisher, G. A., Lum, B. L., Halsey, J., Beketic-Oreskovic, L. and Chen, G. (1997). "Modulation and prevention of multidrug resistance by inhibitors of P-glycoprotein." Cancer Chemother Pharmacol **40 Suppl**: S13-9.

Simon, S. M. and Schindler, M. (1994). "Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3497-504.

Sledge, G. W., Jr. (2001). "Breast cancer in the clinic: treatments past, treatments future." J Mammary Gland Biol Neoplasia **6**(4): 487-95.

Smith, I. E. (2002). "New drugs for breast cancer." Lancet **360**(9335): 790-2.

Som, P., Atkins, H. L., Bandoypadhyay, D., Fowler, J. S., MacGregor, R. R., Matsui, K., Oster, Z. H., Sacker, D. F., Shiue, C. Y., Turner, H., Wan, C. N., Wolf, A. P. and Zabinski, S. V. (1980). "A fluorinated glucose analog, 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (F-18): nontoxic tracer for rapid tumor detection." J Nucl Med **21**(7): 670-5.

Sorensen, D. R. and Read, T. A. (2002). "Delivery of endostatin in experimental cancer therapy." Int J Exp Pathol **83**(6): 265-74.

Sparreboom, A., Danesi, R., Ando, Y., Chan, J. and Figg, W. D. (2003). "Pharmacogenomics of ABC transporters and its role in cancer chemotherapy." Drug Resist Updat **6**(2): 71-84.

Stavrovskaya, A. A. (2000). "Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells." Biochemistry (Mosc) **65**(1): 95-106.

Steel, G. G., Courtenay, V. D. and Rostom, A. Y. (1978). "Improved immune-suppression techniques for the exografting of human tumours." Br J Cancer **37**(2): 224-30.

Stewart AK, Lassam NJ, Graham FL, Gauldie J, Addison CL, Bailey DJ, Dessureault S, Dube ID, Gallenger S, Krajden M, Rotstein LE, Quirt IC, Moen R (1997). "A phase I study of adenovirus mediated gene transfer of interleukin 2 cDNA into metastatic breast cancer or melanoma". Hum Gene Ther **8**(11):1403-14.

Straubinger, R. M., Lopez, N. G., Debs, R. J., Hong, K. and Papahadjopoulos, D. (1988). "Liposome-based therapy of human ovarian cancer: parameters determining potency of negatively charged and antibody-targeted liposomes." Cancer Res **48**(18): 5237-45.

Strong, T. V. (2000). "Gene therapy for carcinoma of the breast: Genetic immunotherapy." Breast Cancer Res **2**(1): 15-21.

Sturtz, F. G., Waddell, K., Shulok, J., Chen, X., Caruso, M., Sanson, M., Snodgrass, H. R. and Platika, D. (1997). "Variable efficiency of the thymidine kinase/ganciclovir system in human glioblastoma cell lines: implications for gene therapy." Hum Gene Ther **8**(16): 1945-53.

Sun, S. S., Hsieh, J. F., Tsai, S. C., Ho, Y. J., Lee, J. K. and Kao, C. H. (2000). "Expression of mediated P-glycoprotein multidrug resistance related to Tc-99m MIBI scintimammography results." Cancer Lett **153**(1-2): 95-100.

T

Thurston, G., McLean, J. W., Rizen, M., Baluk, P., Haskell, A., Murphy, T. J., Hanahan, D. and McDonald, D. M. (1998). "Cationic liposomes target angiogenic endothelial cells in tumors and chronic inflammation in mice." J Clin Invest **101**(7): 1401-13.

V

Vieira, J. and Messing, J. (1987). "Production of single-stranded plasmid DNA." Methods Enzymol **153**: 3-11.

Vlachaki, M. T., Chhikara, M., Aguilar, L., Zhu, X., Chiu, K. J., Woo, S., Teh, B. S., Thompson, T. C., Butler, E. B. and Aguilar-Cordova, E. (2001). "Enhanced therapeutic effect of multiple injections of HSV-TK + GCV gene therapy in combination with ionizing radiation in a mouse mammary tumor model." Int J Radiat Oncol Biol Phys **51**(4): 1008-17.

Vrionis, F. D., Wu, J. K., Qi, P., Waltzman, M., Cherington, V. and Spray, D. C. (1997). "The bystander effect exerted by tumor cells expressing the herpes simplex virus thymidine kinase (HSVtk) gene is dependent on connexin expression and cell communication via gap junctions." Gene Ther **4**(6): 577-85.

W

Wackers, F. J., Berman, D. S., Maddahi, J., Watson, D. D., Beller, G. A., Strauss, H. W., Boucher, C. A., Picard, M., Holman, B. L., Fridrich, R. and et al. (1989). "Technetium-99m hexakis 2-methoxyisobutyl isonitrile: human biodistribution, dosimetry, safety, and preliminary comparison to thallium-201 for myocardial perfusion imaging." J Nucl Med **30**(3): 301-11.

Wang, N. P., To, H., Lee, W. H. and Lee, E. Y. (1993). "Tumor suppressor activity of RB and p53 genes in human breast carcinoma cells." Oncogene **8**(2): 279-88.

Wang, Q. and Finer, M. H. (1996). "Second-generation adenovirus vectors." Nat Med **2**(6): 714-6.

Warren, R. S., Yuan, H., Matli, M. R., Gillett, N. A. and Ferrara, N. (1995). "Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis." J Clin Invest **95**(4): 1789-97.

Wazer, D. E. and Band, V. (1999). "Molecular and anatomic considerations in the pathogenesis of breast cancer." Radiat Oncol Investig **7**(1): 1-12.

Wei, M. X., Bougnoux, P., Sacre-Salem, B., Peyrat, M. B., Lhuillery, C., Salzmann, J. L. and Klatzmann, D. (1998). "Suicide gene therapy of chemically induced mammary tumor in rat: efficacy and distant bystander effect." Cancer Res **58**(16): 3529-32.

Wickham, T. J., Carrion, M. E. and Kovesdi, I. (1995). "Targeting of adenovirus penton base to new receptors through replacement of its RGD motif with other receptor-specific peptide motifs." Gene Ther **2**(10): 750-6.

Wickham, T. J., Segal, D. M., Roelvink, P. W., Carrion, M. E., Lizonova, A., Lee, G. M. and Kovesdi, I. (1996). "Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using bispecific antibodies." J Virol **70**(10): 6831-8.

Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. and Felgner, P. L. (1990). "Direct gene transfer into mouse muscle in vivo." Science **247**(4949 Pt 1): 1465-8.

Wu, K., Eng, E., Knox, R. and Chen, S. (2001). "Demonstration of the activation of prodrug CB 1954 using human DT- diaphorase mutant Q104Y-transfected MDA-MB-231 cells and mouse xenograft model." Arch Biochem Biophys **385**(1): 203-8.

X

Xu, H. J., Zhou, Y., Seigne, J., Perng, G. S., Mixon, M., Zhang, C., Li, J., Benedict, W. F. and Hu, S. X. (1996). "Enhanced tumor suppressor gene therapy via replication-deficient adenovirus vectors expressing an N-terminal truncated retinoblastoma protein." Cancer Res **56**(10): 2245-9.

Xu, L., Tang, W. H., Huang, C. C., Alexander, W., Xiang, L. M., Pirollo, K. F., Rait, A. and Chang, E. H. (2001). "Systemic p53 gene therapy of cancer with immunolipoplexes targeted by anti-transferrin receptor scFv." Mol Med **7**(10): 723-34.

Xu, M., Qiu, G., Jiang, Z., von Hofe, E. and Humphreys, R. E. (2000). "Genetic modulation of tumor antigen presentation." Trends Biotechnol **18**(4): 167-72.

Y

Yamaguchi, N., Anand-Apte, B., Lee, M., Sasaki, T., Fukai, N., Shapiro, R., Que, I., Lowik, C., Timpl, R. and Olsen, B. R. (1999). "Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding." Embo J **18**(16): 4414-23.

Ye, C., Feng, C., Wang, S., Liu, X., Lin, Y. and Li, M. (2002). "Antiangiogenic and antitumor effects of endostatin on follicular thyroid carcinoma." Endocrinology **143**(9): 3522-8.

Yoneda, T., Michigami, T., Yi, B., Williams, P. J., Niewolna, M. and Hiraga, T. (2000). "Actions of bisphosphonate on bone metastasis in animal models of breast carcinoma." Cancer **88**(12 Suppl): 2979-88.

Z

Zhou, P., Jiang, W., Zhang, Y. J., Kahn, S. M., Schieren, I., Santella, R. M. and Weinstein, I. B. (1995). "Antisense to cyclin D1 inhibits growth and reverses the transformed phenotype of human esophageal cancer cells." Oncogene **11**(3): 571-80.

Zhu, N., Liggitt, D., Liu, Y. and Debs, R. (1993). "Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice." Science **261**(5118): 209-11.

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau B1 : Facteurs endogènes régulant l'angiogenèse tumorale. | 34 |
| Tableau B2 : Classification TNM de l'UICC..... | 38 |
| Tableau B3 : Classification de l'AJCC. | 39 |
| Tableau B4 : Classification histologique de l'OMS..... | 40 |
| Tableau B5 : Survie à 5 ans en fonction du regroupement des stades de l'UICC (stades de l'AJCC) | 42 |
| Tableau B7 : Gènes de la famille ABC impliqués dans les phénomènes de « multi drug resistance ». | 50 |
| Tableau B8 : Substrats et inhibiteurs de la protéine P-gp. | 51 |
| Tableau B9 : Substrats et inhibiteurs de la protéine MRP1. | 52 |
| Tableau B10 : les essais cliniques de thérapie génique dans le cadre du cancer du sein. | 66 |
| Tableau B11 : Essais cliniques de thérapie génique cloturés du cancer du sein..... | 67 |
| Tableau M1 : Protocole de traitement des animaux répartis dans deux études : thérapie génique par gène suicide, thérapie génique antiangiogénique. | 88 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure B1 : Coupe du sein..... | 26 |
| Figure B2 : Evolution de l'architecture de la glande mammaire. | 26 |
| Figure B3 : Initiation, promotion et progression d'une cellule tumorale : rôle de l'équilibre entre pro et anti-oncogènes. | 29 |
| Figure B4 : Représentation schématique du rôle des protéines p53 et pRb, codées par les anti-oncogènes <i>p53</i> et <i>Rb</i> , dans la régulation de croissance des cellules normales du sein. ... | 30 |
| Figure B5 : Mécanisme de l'angiogenèse tumorale et interaction des différents facteurs impliqués dans le développement de néo-vaisseaux..... | 35 |
| Figure B6 : Schéma d'une sous-unité basique d'une protéine ABC..... | 49 |
| Figure B7 : Schéma de la protéine P-gp..... | 49 |
| Figure B8 : Schéma de la protéine MRP1..... | 52 |
| Figure R1 : Vérification du produit de l'amplification du gène <i>hsv1-tk</i> par PCR..... | 92 |
| Figure R2 : Vérification du sens d'insertion de l'ADNc de <i>hsv1-tk</i> dans le plasmide pcDNA3.1+ | 92 |
| Figure R3 : Alignement de la séquence de l'ADNc cloné du plasmide pcDNA-tk avec la séquence de la banque de données décrite par Saijo..... | 93 |
| Figure R4 : Morphologie des cellules MDA-MB-231 en culture | 95 |
| Figure R5 : Courbes de croissance des cellules MDA-MB-231..... | 96 |
| Figure R6a : Cytotoxicité du GCV sur les cellules MDA-MB-231..... | 98 |
| Figure R6b : Détermination de l'IC ₅₀ du GCV sur les cellules MDA-MB-231.. | 98 |
| Figure R7 : Toxicité des liposomes vides sur les cellules MDA-MB-231..... | 99 |
| Figure R8 : Cytotoxicité des lipoplexes pcDNA3.1+ et pcDNA-tk sur les cellules MDA-MB-231..... | 101 |
| Figure R9 : Effets des lipoplexes sur les cellules MDA-MB-231..... | 102 |
| Figure R10a : Cinétique d'accumulation du 18(F)-FDG dans les cellules MDA-MB-231... .. | 104 |
| Figure R10b : Fixation du ^{99m} Tc-MIBI par les cellules MDA-MB-231..... | 104 |
| Figure R11 : Détermination du statut MDR1 des cellules MDA-MB-231..... | 105 |
| Figure R12 : Détermination du statut MRP1 des cellules MDA-MB-231..... | 105 |
| Figure R13 : Courbe de croissance des cellules MDA-MB-231, injectées dans la mamelle abdominale des rats..... | 107 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure R14 : Tumeur extraite chez l'animal, sept semaines après l'injection de cellules tumorales dans la mamelle. | 107 |
| Figure R15a : Coupe histologique de tumeur mammaire. | 108 |
| Figure R15b : Coupe histologique de tumeur mammaire. | 108 |
| Figure R16 : Coupe histologique de poumons | 109 |
| Figure R17 : Comparaison de l'accumulation de deux traceurs, le 18(F)-FDG (a) et le ^{99m} Tc-MIBI (b) au niveau de la tumeur..... | 111 |
| Figure R18 : Evolution de l'accumulation du 18(F)-FDG pour le même animal en fonction du temps. | 111 |
| Figure R19 : Evolution des volumes tumoraux pour chaque animal | 113 |
| Figure R20 : Evolution des volumes tumoraux pour les différents groupes constituant l'étude hsv1-tk/GCV. | 114 |
| Figure R22 : Comparaison de l'évolution des volumes tumoraux pour les différents groupes composant l'étude hsv1-tk/GCV..... | 116 |
| Figure R23 : Evolution des volumes tumoraux pour les animaux traités par des injections intraveineuses de lipoplexes pSecEndostatine. | 118 |
| Figure R24 : Comparaison de l'évolution des volumes tumoraux au cours des deux semaines de traitements pour l'étude endostatine..... | 119 |
| Figure R25 : Comparaison de l'évolution des volumes tumoraux pour les différents groupes composant l'étude endostatine. | 120 |

ANNEXE