Université de BORDEAUX

# U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2017 N°46

Mémoire de DES « Innovation Pharmaceutique et Recherche » tenant lieu de

Thèse d'Exercice en vue de l'obtention du

## DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement par


## Augustin LE NAOUR

Né le 13 janvier 1987 à Marmande


**Titre de la Thèse :**

# Le rôle des cellules stromales mésenchymateuses dans la résistance des cancers ovariens aux chimiothérapies

Le 09 juin 2017 à BORDEAUX

**Directrice de Thèse :**

## Madame le Professeur Bettina COUDERC

***Président du Jury :***

**M. le Professeur Nicolas SEVENET**, Professeur de l'Université de Bordeaux, Praticien-Hospitalier

***Membres du Jury :***

**Mme le Professeur Bettina COUDERC**, Professeur de l'Université Toulouse III

**M. Gwénaël FERRON**, Docteur en médecine, chirurgien oncologue

**M. Vincent SERVANT**, Docteur en pharmacie, Praticien-Hospitalier

Université de BORDEAUX

# U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2017 N°46

Mémoire de DES « Innovation Pharmaceutique et Recherche » tenant lieu de

Thèse d'Exercice en vue de l'obtention du

## DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement par


## Augustin LE NAOUR

Né le 13 janvier 1987 à Marmande


**Titre de la Thèse :**

# Le rôle des cellules stromales mésenchymateuses dans la résistance des cancers ovariens aux chimiothérapies

Le 09 juin 2017 à BORDEAUX

**Directrice de Thèse :**

## Madame le Professeur Bettina COUDERC

***Président du Jury :***

**M. le Professeur Nicolas SEVENET**, Professeur de l'Université de Bordeaux, Praticien-Hospitalier

***Membres du Jury :***

**Mme le Professeur Bettina COUDERC**, Professeur de l'Université Toulouse III

**M. Gwénaël FERRON**, Docteur en médecine, chirurgien oncologue

**M. Vincent SERVANT**, Docteur en pharmacie, Praticien-Hospitalier

# Remerciements

Je tiens à remercier le Pr. **Nicolas Sévenet** de m'avoir fait l'honneur de présider ma thèse.

**Monsieur Vincent Servant** m'a fait l'honneur de participer au jury de la soutenance; je le remercie profondément.

Je remercie également le chirurgien **Gwénaël Ferron.** Ton goût pour la recherche, ta gentillesse, ton humour et ton accessibilité font qu'il est toujours appréciable d'échanger avec toi, que ce soit pour le côté professionnel et médical, où tu es un puits de connaissances, ou pour tout autre type de sujets.

Je tiens à remercier tout particulièrement la directrice de cette thèse, le **Pr. Bettina Couderc**. Bettina, sans flatterie, personne ne peut rêver mieux comme directrice de thèse que toi. Toujours agréable, souriante, drôle, on ne s'ennuie jamais avec toi. Tu m'as fait confiance et tu m'as laissé une grande liberté, tout en m'apportant toutes tes connaissances, tes réflexions, ta science et ton aide. Je ne pourrais jamais te remercier assez pour tout ce que tu as fait pour moi. J'espère qu'on pourra continuer à travailler ensemble de près ou de loin. Mon rêve serait d'être dirigé tout au long de ma carrière professionnelle par des personnes comme toi, mais malheureusement, tu es inimitable !

Je remercie les directeurs d'équipes qui m'ont accueilli durant ma thèse. Merci aux Professeurs **Hervé Avet-Loiseau, Etienne Chatelut et Jean-Pierre Delord** de m'avoir laissé toute liberté pour avancer sur notre thématique, pour leurs conseils et leur aide.

Je remercie toute l'équipe de pharmaco dirigée par Etienne Chatelut (**Ben, Fabienne, Isa H, Isa L, Sabrina, Sotheara, Thierry, Mélanie, Cécile**). Une mention particulière bien sûr pour **Quentin, Diane et Benoît**. Ces pauses-café me manqueront avec les mots-croisés et l'humour toujours limite. Benoît, tu es un peu mon mentor, tu m'as accompagné et aidé lors de mon M2, toujours dans la bonne humeur et avec beaucoup de pédagogie. J'espère trouver des personnes comme vous dans mes futures expériences professionnelles.

Je remercie également l'équipe 13 du CRCT dirigée par Hervé Avet-Loiseau. Merci de nous avoir bien intégrés lorsque nous vous avons rejoint il y a un an. Merci à **Andréa** (pour tes expressions pas toujours bien maitrisées), **Céline, Christophe, Hélène, Jill, Julien C, Julien** (Minikeum, je ne te remercie pas pour ton image de « face de bouc » ;)), **Laure, Léa, Ludovic, Manon, Marianne, Marie** (MVMJJ, nos chambrages quotidiens vont me manquer), **Nadège** (pour la solidarité Lot-et-Garonnaise), **Sab** (la syndicaliste qui veut faire diminuer la consommation de gel), **Sahar, Seb** (Gégé !), **Virginie**.

Je remercie l'équipe d'Agnès Coste de me recevoir toujours avec gentillesse et bonne humeur lorsque je viens faire des manips. Merci beaucoup **Agnès** pour tes conseils, ta gentillesse et j'espère pouvoir continuer à travailler avec toi et ton équipe. Je remercie bien sûr **Mélissa** d'être toujours aussi sympathique, souriante, serviable. On aura pu se soutenir lorsque nos manips ne fonctionnaient pas mais aussi s'enthousiasmer sur celles qui marchent !! Merci

**Momo**, pour ta joie de vivre communicative et ta gentillesse. Merci à tous les autres membres de l'équipe, **Bernard**, **Julia**, **Khaddouj**, **Lise**, **Mouna**, ***etc***.

Je remercie aussi toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce projet, le professeur **François Couderc** pour sa gentillesse et ses conseils, **Alejandra, Claire, Eliane, Hubert, Muriel, Verena**, ***etc***.

Mes remerciements vont aussi à tous ceux que j'ai rencontrés pendant mon internat, **Alice, Avédis, Camille, Cédric, Chloé, Clothilde, Estelle, Flavie, Gabriel, Laure, Loïc, Magdalena, Marie-Anne, Renaud, Valérie, *etc.***

Je remercie bien sûr mes amis « miramontais » **Ben, Ludo, Tebi, Marbout, et Yannou,** pour tous ces bons moments passés qui permettent de bien décompresser. Je suis heureux que l'on soit resté si proches depuis tant d'années.

Merci aux amis du lycée, **Ahmed, Anaïs, Axel, Greg, Julie et Pierro**. Cela me fait énormément plaisir que l'on soit tous resté en contact malgré notre dispersion géographique.

Je remercie également **Cha, Dimi, Fifou, Kékette, Mali, Pizzi, Yannou**, ***etc*.**

Merci à tous mes amis handballeurs et plus particulièrement à ceux de la chinoiserie, **Arnaud, Clacla, Colin, Fab, Flo, G, Hubert, JB, Matt, Momo, Plouf, Poupouy, Sergio**.

Et que dire de mes amis de la fac de pharma de Bordeaux **Alex, Bobo, Borgy, Caro, Ciçou, Elsa, Manu, Sam, Shopie, Thomas**? Merci pour toutes ces années de fac exceptionnelles !!!

Mes remerciements vont également à ma famille. **Papa et maman**, merci pour votre soutien durant toutes ces années, mais ça y est j'arrive à la fin des études (enfin presque, il y aura encore une autre thèse …). Vous êtes des modèles pour moi. Et même si chez les Le Naour il ne faut pas montrer ses sentiments, je vous aime. Je ne pourrais jamais vous remercier assez pour tout ce que vous avez fait pour moi. **Julien** et **Lisa,** merci pour tous ces moments partagés. Vous êtes des personnes au top, je suis fier de mon frère et de ma sœur ! **Mamie Lili**, grâce à toi, et **papi** qui me manque, je ne risquais pas de mourir de faim pendant mes années d'études, en repartant toujours avec des provisions et des bons plats (pâtés, compotes, œufs, quiches, …). Sans oublier **Papi Robert, Mamie Yvette** et **toute notre immense famille (Aurore, Baguepi, oncles, tantes, cousins, cousines, *etc*.)**, je vous remercie pour ces bons moments lors des repas de famille.

Merci également à ma belle-famille de m'avoir accueilli si gentiment dans votre famille. Merci à **Aymeric, Claudine, Coco, Dan, Dodo, J-P, Jim, Kévin, Kro, Logan, Maud, Océane, Pascal, Pauline, Sandrine, mamie Suzon, Tatie, mon p'tit Titi, Seb, Sisi, Véro, Yaya, et à bébé Axel.**

Je terminerai, en remerciant les personnes de mon microenvironnement. Merci **Marion** de m'accompagner et de me soutenir tous les jours. Et surtout, tu as porté la plus belle chose qui me soit jamais arrivé, notre petit **Evan**, qui a révolutionné notre vie en la remplissant de bonheur. Je vous remercie tous les deux de remplir ma vie de joie et d'amour chaque jour.

# Le rôle des cellules stromales mésenchymateuses dans la résistance des cancers ovariens aux chimiothérapies

Résumé de la thèse : ..... 3
Nomenclature des gènes ..... 3
Titre et résumé de la thèse en anglais : ..... 4
Role of mesenchymal stromal cells in chemoresistance of ovarian tumor cells ..... 4
Discipline : ..... 4
Mots clés : ..... 4
Intitulé et adresse du laboratoire : ..... 4
Tableau des acronymes et abréviations ..... 5
I) INTRODUCTION ..... 9
A) Les médicaments antitumoraux ..... 9
1) Les chimiothérapies cytotoxiques ..... 9
2) Les thérapies ciblées ..... 16
3) Les médicaments ciblant les cellules du microenvironnement tumoral ..... 30
B) La résistance aux chimiothérapies ..... 42
1) Résistance pharmacocinétique ..... 42
2) Résistance pharmacodynamique ..... 42
3) Résistances en amont de la cible ..... 42
4) Résistances au niveau de la cible ..... 43
5) Résistances en aval de la cible ..... 43
C) Les cellules stromales mésenchymateuses ..... 44
1) Caractéristiques des cellules stromales mésenchymateuses ..... 44
2) Cellules stromales mésenchymateuses et cancer ..... 45
D) Rôle des cellules stromales mésenchymateuses dans la résistance des cellules tumorales aux chimiothérapies ..... 47
1) Mécanismes de résistance nécessitant un contact direct avec les cellules tumorales 48
2) Mécanismes de résistance liés à la sécrétion de facteurs solubles ..... 57
II) RESULTATS ..... 72
A) Isolement et identification de cellules du microenvironnement tumoral ovarien ..... 73
1) Isolement de cellules du microenvironnement tumoral ovarien ..... 73
2) Etude de marqueurs exprimés par les cellules isolées ..... 74

B) Rôle *in vitro* des CA-MSC sur la sensibilité de cellules tumorales ovariennes au carboplatine ..... 75

C) Mise en place d'un modèle de CA-MSC « induites » ..... 77

1) Méthode permettant l'obtention de CA-MSC « induites »..... 77

2) Etude de l'effet des facteurs sécrétés par des CA-MSC « induites » sur la sensibilité des cellules tumorales ovariennes au carboplatine ..... 79

D) Rôle *in vivo* des MSC dans la résistance des cellules tumorales ovariennes au carboplatine ..... 80

1) Modèle expérimental d'adénocarcinome ovarien totalement murin ..... 80

2) Modèle expérimental d'adénocarcinome ovarien réalisé chez la souris avec des CTO et des MSC humaines..... 82

III) DISCUSSION ET PERSPECTIVES ..... 84

IV) BIBLIOGRAPHIE ..... 86

## Résumé de la thèse :

Le cancer ovarien est la première cause de décès par cancers gynécologiques. A ce jour, le traitement le plus efficace consiste en une exérèse la plus complète possible de la tumeur associée à une chimiothérapie à base de sels de platine et de taxanes. Cependant, la survie globale des patientes à 5 ans reste faible (proche de 40%) en raison d'un fort taux de récidive et du développement d'une résistance aux traitements. En plus des résistances intrinsèques des cellules tumorales ovariennes (CTO), les interactions entre les cellules cancéreuses et leur microenvironnement semblent être impliquées dans la progression de la maladie et l'acquisition de cette chimiorésistance.

Parmi les cellules du microenvironnement tumoral, les cellules stromales mésenchymateuses (MSC) ont été décrites comme pouvant induire une résistance vis-à-vis de nombreuses chimiothérapies, et dans de nombreux cancers. Parmi les mécanismes impliqués dans la résistance des cellules tumorales induite par les MSC, l'implication de la sécrétion de facteurs, tels que le SDF-1, IL-6, *etc*., par les MSC a été démontrée.

Nous avons pu isoler des MSC à partir de biopsies issues de patientes atteintes de cancer ovarien. Ces MSC associées au cancer (CA-MSC) ont la capacité d'induire une résistance au traitement par carboplatine des CTO. Afin de mieux comprendre les mécanismes conduisant des MSC physiologiques à sécréter des facteurs pro-tumoraux dans un contexte de cancer ovarien, nous avons mis en place un modèle à partir de MSC issues de donneurs sains. Ces MSC « physiologiques » ont été cultivées dans du milieu contrôle ou du milieu mimant un environnement ovarien. Pour mimer cet environnement tumoral ovarien, des sécrétions de CTO ou de l'ascite de patientes atteintes de cancer ovarien ont été utilisées. Nous avons observé que la présence d'un environnement tumoral ovarien modifie le phénotype de MSC physiologiques, en entraînant notamment la sécrétion par ces CA-MSC « induites » de facteurs chimioprotecteurs pour les CTO.

L'effet pro-tumoral des MSC dans un contexte de cancer ovarien a également été observé dans deux modèles expérimentaux murins de cancers ovariens, l'un totalement murin et l'autre murin/humain.

## Nomenclature des gènes

La nomenclature des gènes utilisée dans ce manuscript respecte la nomenclature du « hugo gene nomenclature committee » selon la publication :

Hester M. Wain, Elspeth A. Bruford, Ruth C. Lovering, Michael J. Lush, Mathew W. Wright and Sue Povey. Guidelines for Human Gene Nomenclature. Genomics 79(4):464-470 (2002) et ses mises à jour post-publication.

## Titre et résumé de la thèse en anglais :

### Role of mesenchymal stromal cells in chemoresistance of ovarian tumor cells

Ovarian cancer is the leading cause of gynecological cancer death. To date, the most effective treatment consists in a most complete excision of the tumor, associated with chemotherapies using platinum salts and taxanes. However, the overall survival of patients remains low due to a high rate of recurrence and development of resistance to treatment. In addition to the intrinsic resistance of ovarian tumor cells (CTO), interactions between cancer cells and the microenvironment seem to be involved in the progression of the disease and the acquisition of this chemoresistance.

Among cells of the tumor microenvironment, mesenchymal stromal cells (MSC) have been described as being able to induce resistance against many chemotherapies, and in many cancers. Among mechanisms involved in MSC-induced tumor cell resistance, the involvement of secreted factors, such as SDF-1, IL-6, *etc*., by MSC has been demonstrated.

We were able to isolate MSC from ovarian cancer. These cancer-associated MSC (CA-MSC) have the ability to induce resistance to carboplatin in CTO. In order to better understand mechanisms leading to the secretion by MSC of pro-tumor factors in the context of ovarian cancer, we have developed a model based on MSC from healthy donors. These "physiological" MSC have been grown in control medium or in a medium that mimic an ovarian environment. To mimic this ovarian tumor environment, CTO secretions or ascites from patients with ovarian cancer were used. We have observed that the presence of an ovarian tumor environment modifies the phenotype of physiological MSC, leading in particular to the secretion by these "induced" CA-MSC of chemoprotective factors for CTO.

The pro-tumor effect of MSC in an ovarian cancer context was also observed in two murine experimental models of ovarian cancers, one completely murine and the other murine / human.

## Discipline :

Cancérologie, biologie cellulaire et biologie moléculaire

## Mots clés :

Cancer, Traitements, Ovaire, Chimiorésistance, Cellules Stromales Mésenchymateuses, Microenvironnement Tumoral, Résistance, Cancer Ovarien

## Intitulé et adresse du laboratoire :

Institut Universitaire du Cancer Toulouse – Oncopole
1, avenue Irène Joliot-Curie 31059 TOULOUSE Cedex 9
INSERM U1037 : Equipe 13 du Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT)

## Tableau des acronymes et abréviations

| acronymes et abréviations | Définition |
|---|---|
| ***ABL*** | Abelson |
| **ADCC** | Cytotoxicité à médiation Cellulaire Dépendante des Anticorps |
| **ADN** | Acide DésoxyriboNucléique |
| **ADP** | Adénosine DiPhosphate |
| **ADPh** | Phagocytose cellulaire Dépendante des Anticorps |
| **ALK** | Anaplastic Lymphoma Kinase |
| **AMM** | Autorisation de Mise sur le Marché |
| **ARN** | Acide RiboNucléique |
| **ARNm** | Acide RiboNucléique messager |
| ***ATF2*** | Activating Transcription Factor 2 |
| **AT-MSC** | Cellules Souches/Stromales Mésenchymateuses dérivées du Tissu Adipeux |
| **ATP** | Adénosine TriPhosphate |
| **ATU** | Autorisation Temporaire d'Utilisation |
| **BAD** | Bcl-2-Associated Death promoter |
| **Bcl-2** | B-cell lymphoma-2 |
| **Bcl-xL** | B-cell lymphoma-extra Large |
| ***BCR*** | Breakpoint cluster region |
| **BER** | Réparation par Excision de Bases |
| **bFGF** | basic-Fibroblast Growth Factor |
| **BH3** | Bcl-2 Homology 3 |
| **BIM** | Bcl-2 Interacting Mediator of cell death |
| **BiTE** | Bispecific T cell Engager |
| **BM** | Bone Marrow = moelle osseuse |
| **BMP** | Bone Morphogenetic Protein |
| ***BRCA*** | BReast and ovarian CAncer susceptibility protein |
| **Breg** | Lymphocytes B régulateurs |
| ***BTG2*** | B-cell Translocation Gene 2 |
| **BTK** | tyrosine kinase de Bruton |
| **CA-MSC** | Cellules Souches/Stromales Mésenchymateuses Associées au Cancer |
| **CAF** | Fibroblaste associé au cancer |
| **CCL5** | Chemokine (C–C motif) Ligand 5 |
| **CCNDBP1** | Cyclin D-Type Binding-Protein 1 |
| **CDC** | Cytotoxicité Dépendante du Complément |
| **CDK** | Cyclin-Dependent Kinases |
| **cIAP** | cellular-Inhibitor of Apoptosis Protein |
| **COX** | Cyclooxygenase |
| **CSF-1** | Colony Stimulating Factor 1 |
| **CSF-1R** | Récepteur au Colony Stimulating Factor 1 |
| **CTLA4** | Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4 |
| **CXCL** | Chemokine (C-X-C motif) Ligand |

| | |
|---|---|
| **CXCR** | Chemokine (C-X-C motif) Receptor |
| **CYP17** | 17alpha-hydroxylase/C17,20-lyase |
| ***DDIT3*** | DNA-Damage-Inducible Transcript 3 |
| **DM1** | N2'-Deacetyl-N2'-(3-mercapto-1-oxopropyl)-Maytansine |
| **EGF** | Epidermal Growth Factor |
| **EGFR** | Epidermal Growth Factor Receptor |
| **EML4** | Echinoderm Microtubule-associated protein-Like 4 |
| **EpCAM** | Molécule d'Adhésion Cellulaire Epithéliale |
| **ERCC1** | Excision Repair Cross-Complementation group 1 |
| **ERK** | Extracellular signal-Regulated Kinases |
| **FGF** | Fibroblast Growth Factor |
| **FKBP12** | FK506 Binding Protein 12 |
| ***FLT-3*** | Fms-Like Tyrosine kinase 3 |
| **FSH** | Hormone FolliculoStimulante Hypophysaire |
| **5-FU** | 5-Fluoro-Uracile |
| **GADD** | Growth Arrest and DNA Damage |
| **GDF-15** | Growth Differentiation Factor 15 |
| **GnRH** | Hormone entraînant la libération de Gonadotrophines |
| **HDAC** | Histones Désacétylases |
| **HER** | Human Epidermal growth factor Receptor |
| **hERG1** | human Ether-à-go-go Related Gene 1 |
| **HIF-1α** | Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha |
| **hMSC** | Cellules Souches/Stromales Mésenchymateuses humaines |
| **Hospicells** | Assimilées à des CA-MSC isolées de patientes atteintes d'adénocarcinome ovarien |
| **HS-5** | Lignée cellulaire stromale immortalisée issue de moelle osseuse avec une morphologie et un phénotype de MSC |
| **hTERT** | human Telomerase Reverse Transcriptase |
| **Ig** | Immunoglobuline |
| **IGF** | Insulin-like Growth Factor |
| **IGFR** | Insulin-like Growth Factor Receptor |
| **IKZF1** | Ikaros |
| **IKZF3** | Aiolos |
| **IL** | InterLeukine |
| **IMiD** | Médicaments Immuno-Modulateurs |
| **ITK** | Inhibiteur de Tyrosine Kinase |
| **JAK** | Janus Kinase |
| **JAK1** | Janus Kinase 1 |
| **JAK2** | Janus Kinase 2 |
| **LAL** | Leucémies Aiguës Lymphoblastiques |
| **LAM** | Leucémies Aiguës Myéloïdes |
| **LEF1** | Lymphoid Enhancer-binding Factor 1 |
| **LH** | Hormone Lutéinisante Hypophysaires |
| **LH-RH** | Hormone entraînant la Libération de gonadotrophines |
| **LMC** | Leucémie Myéloïde Chronique |

| | |
|---|---|
| **LLC** | Leucémie Lymphoïde Chronique |
| **LTc** | Lymphocytes T cytotoxiques |
| **MAPK** | Mitogen-Activated Protein Kinase |
| ***MARCKS*** | Myristoylated Alanine-Rich protein Kinase C Substrate |
| **MC** | Milieu Conditionné |
| **Mcl-1** | Myeloid cell leukemia 1 |
| **M-CSF** | Macrophage- Colony Stimulating Factor |
| **MDR** | Multi-Drug Resistance |
| **MEK** | Mitogen-activated protein kinase kinase |
| **miARN** | micro Acide RiboNucléique |
| **MM** | Myélome Multiple |
| **MMP** | MétalloProtéase Matricielle |
| **MS-5** | Lignée cellulaire stromale murine ayant une morphologie mésenchymateuse et capable de se différencier en adipocyte |
| **MSC** | Cellules Souches/Stromales Mésenchymateuses |
| **mTOR** | Mammalian Target Of Rapamycin |
| **MUC-1** | Mucine 1 |
| **NF-κB** | Nuclear Factor-kappa B |
| **NHEJ** | Jonction des Extrémités Non Homologues |
| **NK** | Natural Killer |
| **NPM** | Nucleophosmin |
| **ORF** | Open Reading Frame |
| $p210^{BCR\text{-}ABL}$ | Protéine de fusion de 210 KiloDaltons obtenue après juxtaposition du gène Abelson (*ABL*) à une partie du gène *BCR* (breakpoint cluster region) |
| **PARP** | Poly(ADP-Ribose) Polymérase |
| **PGE2** | ProstaGlandine E2 |
| **PD-1** | Programmed cell Death-1 |
| **PDGF** | Platelet-Derived Growth Factor |
| **PDGFR** | Platelet-Derived Growth Factor Receptors |
| **PD-L1** | Programmed cell Death- Ligand 1 |
| **Pgp** | P-glycoprotéine |
| **PI3K** | PhosphoInositide 3-Kinases |
| ***PIK3CA*** | Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3 -Kinase Catalytic Subunit Alpha |
| **PIP3** | phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate |
| **qRT-PCR** | quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction |
| **RANK** | Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B |
| **RANKL** | Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand |
| **RAR** | Récepteur à l'Acide Rétinoïque |
| **RASGRP1** | RAS Guanyl Releasing Protein 1 |
| **Rel** | V-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog |
| **RTK** | Récepteur à activité Tyrosine Kinase |
| **S1P** | Sphingosine-1-Phosphate |

| | |
|---|---|
| **SCF** | Skp, Cullin, F-box containing complex |
| **SDF-1** | Stromal cell-Derived Factor 1 |
| **siRNA** | small interfering RiboNucleic acid |
| **SKP2** | S-phase Kinase-associated Protein 2 |
| **Smac** | Second mitochondria-derived activator of caspases |
| **STAT** | Signal Transducers and Activators of Transcription |
| **TAF** | Fibroblastes Associés aux Tumeurs |
| **TAM** | Macrophages Associés aux Tumeurs |
| **TCR** | Récepteur aux cellules T |
| **TGF-β** | Transforming Growth Factor beta |
| **TNF** | Facteur de Nécrose Tumorale |
| **Treg** | Lymphocyte T régulateur |
| **TXAS** | ThromboXane A Synthase |
| **TYK2** | Tyrosine Kinase 2 |
| **VCAM-1** | Vascular Cell Adhesion Molecule-1 |
| **VEGF** | Vascular Endothelial Growth Factor |
| **VEGFR** | Récepteur au VEGF |
| **VLA4** | Very Late Antigen-4 |
| **Wnt** | Wingless-type MMTV integration site family |
| **XIAP** | X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein |

# I) INTRODUCTION

## A) Les médicaments antitumoraux

### 1) Les chimiothérapies cytotoxiques

En plus de la chirurgie, qui reste dans beaucoup de cancers le seul traitement permettant une rémission complète, et de la radiothérapie, les thérapeutiques incluent l'utilisation de chimiothérapies agissant efficacement sur les cellules tumorales. Ces médicaments traditionnels sont divisés en deux classes : les agents cytotoxiques ou cytostatiques et les thérapies ciblées.

Les agents cytotoxiques ciblent les cellules ayant un taux de division rapide. Ils sont séparés en plusieurs classes selon leurs structures chimiques et leur mécanisme d'action (Tableau 1).

#### *a) Les agents alkylants*

Les agents alkylants sont des molécules fortement électrophiles capables d'interagir avec des composés possédant des radicaux nucléophiles tels que les groupements -SH, -OH, - COOH ou –NH2 retrouvés notamment dans les acides nucléiques. Les agents alkylants représentent la plus ancienne classe de médicaments anticancéreux. Le développement de ces médicaments est dû à la constatation des effets du gaz moutarde utilisé lors de combats. Ces molécules peuvent alkyler, c'est-à-dire ajouter un groupement hydrocarboné, de façon covalente au niveau des bases de l'ADN (acide désoxyribonucléique). La liaison covalente peut être monovalente ou bivalente et, dans ce cas, entraîner des ponts intra ou inter-brins. Cette alkylation, qui se fait préférentiellement sur les guanines, induit une cytotoxicité notamment sur les cellules ayant un fort taux de multiplication comme les cellules tumorales. En effet, les agents alkylants altèrent des processus indispensables à la division cellulaire, en particulier la réplication et la transcription, conduisant à un arrêt du cycle cellulaire. De plus, les lésions induites par cette alkylation produisent souvent des cassures simple ou double-brins induisant l'entrée en apoptose de la cellule. Ces agents alkylants sont subdivisés en 8 sous-classes.

- Les moutardes à l'azote, tels que la chlorméthine, le melphalan, le chlorambucil et la méchlorétamine, induisent préférentiellement des liaisons inter-brins.
- La sous-classe des oxazaphosphorines est composée du cyclophosphamide et de l'ifosfamide. Ces molécules exercent leur action cytotoxique majoritairement par formation de ponts inter-brins.
- Le témozolomide et la dacarbazine sont des composés monovalents (pas de formation de pont intra ou inter-brins) qui appartiennent à la sous-classe des triazènes et hydrazines, formant des adduits sur l'ADN responsables de leur activité cytotoxique.

- Les molécules appartenant aux éthylène-imines, comme le thiotépa, l'altrétamine et la mitomycine C, forment des ponts intra ou inter-caténaires au niveau de l'ADN induisant la mort cellulaire.
- La sous-classe des nitroso-urées, comprenant la carmustine, la lomustine, la fotémustine, la bendamustine et la streptozocine, peut former des ponts inter-brins induisant une cytotoxicité.
- Les alkyles alcanes sulfonates, ou moutardes soufrées, sont représentés par le busulfan et le pipobroman. Ils exercent leur activité cytotoxique en formant des ponts intra ou inter-caténaires.
- Les sels de platine, ou les organoplatines, tels que le cisplatine, le carboplatine ou l'oxaliplatine, sont des agents alkylants exerçant leur activité cytotoxique par formation de ponts intra ou inter-brins.

### *b) Les antimétabolites*

Les molécules de la famille des antimétabolites interfèrent avec la synthèse de l'ADN. Par inhibition enzymatique, par déplétion en acides aminés ou en se comportant comme leurre, les antimétabolites vont affecter la phase S du cycle cellulaire et empêcher la mitose.

#### (i) Les analogues de l'acide folique

L'acide tétrahydrofolique est un co-facteur indispensable à la synthèse des bases puriques (adénine, guanine) et de la thymidine (base pyrimidinique) passant par la thymidylate synthase. Cet acide tétrahydrofolique est obtenu après plusieurs réductions de l'acide folique. Ainsi, la synthèse de l'ADN et de l'ARN (acide ribonucléique) nécessitent l'activité de la dihydrofolate réductase qui permet de réduire l'acide dihydrofolique en acide tétrahydrofolique.

Les médicaments anti-foliques inhibent de façon compétitive soit la dihydrofolate réductase, comme le méthotrexate, soit la thymidylate synthase, pour le raltitrexed, voire inhibent ces deux enzymes pour le pémétrexed. Ces molécules interrompent la synthèse d'ADN et d'ARN conduisant à l'apoptose des cellules cibles.

#### (ii) Les enzymes entraînant une déplétion en acides aminés

Les médicaments empêchant la synthèse protéique, qui elle-même conduit à l'inhibition de la synthèse d'ADN, peuvent être classés parmi les antimétabolites.

L’asparagine est un acide aminé qui est nécessaire à la synthèse protéique. Dans certains cancers, notamment certaines leucémies, une diminution de l’expression de L-asparagine-synthétase est observée dans les cellules tumorales, les rendant dépendantes à l’asparagine exogène.

La L-asparaginase est une enzyme qui catalyse la désamination de l'asparagine exogène en acide aspartique et ammoniaque. L'asparagine est incorporée dans la plupart des protéines, et son absence conduit à une inhibition de la synthèse protéique entraînant le blocage de la synthèse de l'ARN et de l'ADN. Ainsi, la L-asparaginase induit un arrêt de la prolifération cellulaire.

### (iii) Les anti-pyrimidiques

Les bases pyrimidiques, la cytosine, l’uracile et la thymine, sont essentielles à la synthèse d’ADN. Les anti-pyrimidiques sont des analogues des bases pyrimidiques. Ainsi, ils peuvent agir comme des leurres biochimiques en prenant la place des bases pyrimidiques sur l’ADN ou l’ARN en cours de synthèse. Leur fixation a un effet terminateur de chaîne, inhibant ainsi la réplication et la transcription. Ils inhibent la phase S du cycle cellulaire.

La cytarabine (cytosine-arabinoside ou Ara-C) est un analogue nucléosidique de la cytidine qui nécessite une phosphorylation pour être active et incorporée à l’ADN. Cette activation se fait notamment par la tumeur. La gemcitabine est un analogue de la dé-oxy-cytidine qui nécessite d’être phosphorylée avant d’être active. De même, l’azacitidine ou la décitabine (son dérivé déoxy) sont également des analogues de la cytidine.

En plus de son implication dans la synthèse d’ARN, l’uracile est également un précurseur de la thymine, via la thymidilate synthase. Ainsi, le 5-fluoro-uracile (5-FU) et sa pro-drogue, la capécitabine, ont un mécanisme d’action un peu plus complexe en agissant également sur le métabolisme de l’acide folique.

### (iv) Les anti-puriques

Les bases puriques, l’adénine et la guanine, sont des composants primordiaux d’ADN et d’ARN. Comme les anti-pyrimidiques, des analogues des bases puriques ont été développés pour agir comme des leurres biochimiques.

La cladribine, la fludarabine, la clofarabine et la pentostatine sont des analogues nucléosidiques de l’adénosine alors que la mercaptopurine, la nélarabine et la thioguanine sont des analogues de la guanine. Ces médicaments nécessitent une activation au niveau tumoral, généralement par phosphorylation, pour être actifs.

### *c) Les agents scindants*

Certains antibiotiques cytotoxiques comme la bléomycine sont capable de modifier la structure tertiaire de l'ADN. Ces modifications peuvent conduire à des cassures simple ou double-brins de l'ADN. Ces médicaments conduisent à un effet cytostatique voire cytotoxique vis-à-vis des cellules cibles.

### *d) Les inhibiteurs de topoisomérases*

Au cours de la réplication, le déplacement de la fourche de réplication entraîne des tensions au niveau de la partie encore enroulée de l'ADN de plus en plus fortes et conduit à des surenroulements. Le degré de surenroulement peut induire des cassures de l'ADN d'où l'action des topoisomerases I et II dans sa régulation.

#### (i) Les inhibiteurs de la topoisomérase I

La topoisomérase I est une enzyme capable de réguler le surenroulement de l'ADN en entraînant des cassures simple-brins transitoires. Cette enzyme se lie au squelette phosphate d'un des brins d'ADN. Après hydrolyse, le brin d'ADN va pouvoir se désenrouler en faisant le tour de l'autre brin puis la topoisomérase I permet la religation du brin d'ADN.

Les inhibiteurs de topoisomérase I, le topotécan et l'irinotécan, stabilisant le complexe covalent topoisomérase I / ADN (ayant une cassure mono-brin), induisent des lésions mono-caténaires et inhibent la religation de l'ADN. Ces inhibiteurs agissent donc au niveau de la phase S du cycle cellulaire.

#### (ii) Les inhibiteurs de la topoisomérase II ou agents intercalants

La topoisomérase II est également impliqué dans la régulation de la torsion et du surenroulement de l'ADN. Elle induit des cassures double-brins de l'ADN afin de réguler la torsion et l'enroulement de l'ADN. Les inhibiteurs de topoisomérase II vont se placer dans le sillon de l'ADN et former un complexe avec la topoisomérase II et l'ADN, entraînant un blocage de la transcription et de la réplication de l'ADN. Les inhibiteurs de topoisomérase II peuvent être séparés en sous-classes. Les anthracyclines, telles que la daunorubicine, la doxorubicine, l'épirubicine, l'idarubicine et la pirarubicine, peuvent s'intercaler dans l'ADN entraînant une détorsion qui conduit au recrutement de la topoisomérase II. Les épipodophylotoxines, tels que l'étoposide et le teniposide sont également des inhibiteurs de la

topoisomérase II. Enfin, la dactinomycine, l'amsacrine ou les anthracènediones, comme la mitoxantrone, sont des intercalants rattachés aux inhibiteurs de topoisomérases II.

### *e) Les poisons du fuseau mitotique*

Lors de la mitose, un système dynamique permet la migration des chromatides, c'est le fuseau mitotique. Il permet la séparation des chromosomes fils vers chacun des deux pôles de la cellule. Ce fuseau est constitué d'un réseau dynamique de microtubules émanant du centrosome. La polymérisation et la dépolymérisation des microtubules permettent la régulation de la longueur des fuseaux. L'équilibre, entre la tubuline sous forme d'hétérodimères et la forme polymérisée des microtubules, est extrêmement sensible. Les poisons du fuseau mitotique, utilisés en oncologie, vont empêcher la migration correcte des chromatides en inhibant soit la polymérisation soit la dépolymérisation des microtubules.

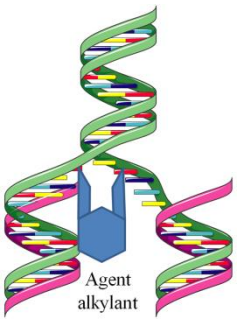
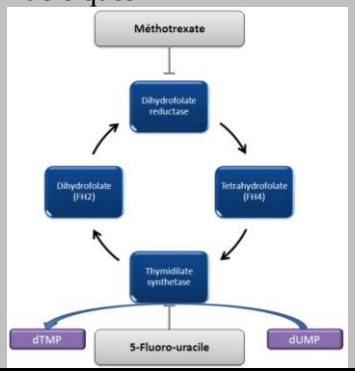
#### (i) Les inhibiteurs de la polymérisation des microtubules, les vinca-alcaloïdes

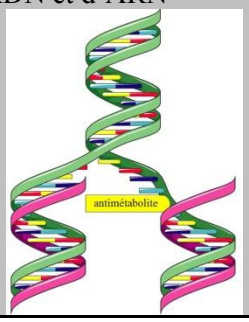
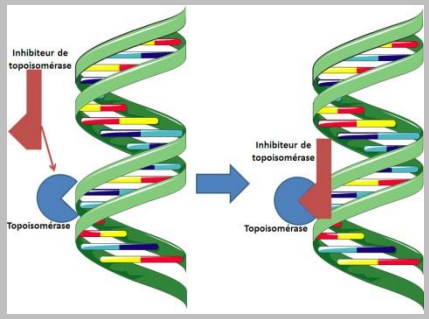
Les vinca-alcaloïdes sont des alcaloïdes isolés de différentes pervenches tropicales. Ces molécules inhibent la formation correcte du fuseau et bloquent les cellules en mitose. Ces antimitotiques empêchent ainsi la division cellulaire en inhibant la polymérisation des microtubules. La vincristine, la vindésine, la vinflumine, la vinorelbine et la vincaleucoblastine sont des vinca-alcaloïdes de l'arsenal thérapeutique antitumoral. Ces médicaments empêchent la migration des chromosomes, bloquant la mitose en métaphase et entraînant la mort cellulaire.

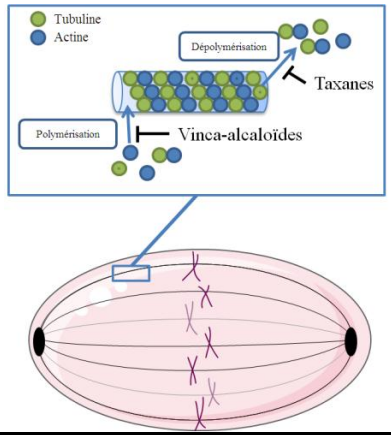
#### (ii) Les inhibiteurs de la dépolymérisation des microtubules, les taxanes

A l'inverse des vinca-alcaloïdes, les taxanes inhibent la dépolymérisation des microtubules du fuseau mitotique. Les taxanes, tels que le paclitaxel, le docétaxel et le cabazitaxel, dérivent de composés issus d'un arbre, l'if. Les taxanes entraînent la formation de microtubules plus stables qui formeront à leur tour des fuseaux mitotiques plus stables qui ne pourront pas se désassembler durant l'anaphase. Ces antimitotiques conduisent à la mort cellulaire.

Tableau 1: Les différentes classes de médicaments cytotoxiques et leur mécanisme d'action

<table>
<tr><th colspan="4">Les différentes classes des agents cytotoxiques</th></tr>
<tr><th colspan="2">Classe des agents cytotoxiques</th><th>Exemples</th><th>Mécanisme d'action</th></tr>
<tr><td rowspan="7">Les agents alkylants</td><td>Moutardes azotées</td><td>chlorméthine<br>melphalan<br>chlorambucil<br>méchlorétamine</td><td rowspan="7">• Formation des liaisons covalentes avec l'ADN<br>• Interférence avec des processus essentiels à la division cellulaire comme la réplication ou la transcription.<br>• Entrave au dédoublement des deux brins d'ADN<br>• Transcription arrêtée au niveau de l'agent alkylant<br>• arrêt de la division cellulaire<br><br></td></tr>
<tr><td>Oxazaphosphorines</td><td>cyclophosphamide<br>ifosfamide</td></tr>
<tr><td>Ethylène-imines</td><td>thiotépa<br>(aziridines)<br>altrétamine<br>mitomycine C</td></tr>
<tr><td>Alkyles alcanes sulfonates</td><td>busulfan<br>pipobroman</td></tr>
<tr><td>Triazènes et hydrazines</td><td>dacarbazine<br>témozolomide</td></tr>
<tr><td>Nitroso-urées</td><td>carmustine<br>lomustine<br>streptozocine<br>fotémustine<br>bendamustine</td></tr>
<tr><td>Sels de platine<br>ou Organoplatines</td><td>cisplatine<br>carboplatine<br>oxaliplatine</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Les anti-métabolites</td><td>Analogues de l'acide folique</td><td>méthotrexate<br>raltitrexed<br>pemetrexed</td><td>• Inhibition de la dihydrofolate reductase<br>• Inhibition de la synthèse de l'acide folinique indispensable pour la synthèse des bases nucléiques<br><br></td></tr>
<tr><td>Enzyme hydrolysant les acides aminés</td><td>L-asparaginase</td><td>• Hydrolyse de la L-asparagine en acide aspartique et ammoniaque<br>• Déplétion en L-asparagine des cellules tumorales exprimant peu la L-asparagine-synthétase<br>• Inhibition de la synthèse protéique<br>• Arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et apoptose</td></tr>
</table>

<table>
<tr><td rowspan="2"></td><td>Anti-pyrimidiques</td><td>5-FU<br>capecitabine<br>gemcitabine<br>cytarabine<br>tipiracil</td><td rowspan="2">• Analogues des bases puriques ou pyrimidiques : substances leurres<br>• Effet terminateur de chaînes d’ADN<br>• Perturbation des enzymes comme l’ADN polymérase<br>• Inhibition de la synthèse d’ADN et d’ARN<br></td></tr>
<tr><td>Anti-puriques</td><td>fludarabine<br>pentostatine<br>cladribine<br>6-thioguanine<br>6-mercaptopurine</td></tr>
<tr><td colspan="2">Agent scindant</td><td>bléomycine</td><td>Chélateur provoquant la formation de radicaux libres qui altèrent l’ADN<br></td></tr>
<tr><td rowspan="5">Les inhibiteurs de topoisomérases (I ou II)</td><td>Inhibiteurs de la topoisomérase I</td><td>topotécan<br>irinotécan</td><td rowspan="5">• Inhibition des topoisomérases I ou II<br>• Formation d’un complexe au niveau de la fourche de réplication de l'ADN<br>• Inhibition des coupures simple-brins (I) ou bicaténaires (II) nécessaires à la transcription de l’ADN<br>• Arrêt du cycle cellulaire<br></td></tr>
<tr><td>Anthracyclines : inhibiteurs de la topoisomérase II</td><td>daunorubicine<br>doxorubicine<br>épirubicine<br>idarubicine<br>pirarubicine</td></tr>
<tr><td>Anthracènediones : inhibiteurs de la topoisomérase II</td><td>mitoxantrone</td></tr>
<tr><td>Epipodophyllotoxines : inhibiteurs de la topoisomérase II</td><td>étoposide<br>teniposide</td></tr>
<tr><td>Intercalants rattachés aux inhibiteurs de la topoisomérase II</td><td>dactinomycine<br>amsacrine</td></tr>
</table>

<table>
<tr><td rowspan="2">Les poisons du fuseau mitotique</td><td>Inhibiteurs de la polymérisation des microtubules : vinca-alcaloïdes</td><td>vincristine<br>vindésine<br>vinflumine<br>vinorelbine,<br>vincaleucoblastine</td><td rowspan="2"><ul><li>Antimitotiques</li><li>Inhibition de la formation du fuseau mitotique (vinca-alcaloïdes) ou stabilisent les microtubules (taxanes)</li><li>Désorganisation lors de la mitose</li><li>Pas de division cellulaire</li></ul>
</td></tr>
<tr><td>Inhibiteurs de la dépolymérisation des microtubules : taxanes</td><td>paclitaxel<br>docetaxel<br>cabazitaxel</td></tr>
</table>

### 2) Les thérapies ciblées

Les agents cytotoxiques ne sont pas spécifiques des cellules tumorales et agissent également sur les cellules saines qui se divisent. Ainsi, des molécules de « nouvelle génération » sont désormais développées dans le but de cibler plus spécifiquement les caractéristiques des cellules tumorales afin d'améliorer l'efficacité du traitement et surtout de réduire l'apparition d'effets indésirables.

Les chimiothérapies de « nouvelle génération » sont souvent appelées thérapies ciblées. L'approche est différente des cytotoxiques, en partant de la lésion au niveau moléculaire pour arriver au traitement. L'hypothèse émise est que la cellule tumorale, présentant une anomalie moléculaire, dépend fortement de la persistance de cette anomalie moléculaire pour survivre. Ces thérapies ciblent ces aberrations moléculaires trouvées dans une tumeur. Ainsi, ces molécules pourraient être utilisées de manière plus individualisée en fonction des anomalies détectées dans la tumeur (par exemple, l'utilisation d'imatinib dans la leucémie myéloïde chronique (LMC) présentant une translocation *BCR-ABL*, conduisant à la présence d'une protéine de fusion de 210 kilo-daltons obtenue après juxtaposition du gène Abelson (*ABL*) à une partie du gène Breakpoint cluster region (*BCR*)).

Ainsi, plusieurs classes de thérapies ciblées ont été développées. Elles sont réparties selon leur mécanisme d'action et leur cible.

### *a) Les petites molécules ciblant les anomalies des cellules tumorales*

#### (i) Voie de signalisation des MAP-kinases

Dans de nombreux cancers, une activation aberrante de la voie de signalisation des « mitogen-activated protein kinases » (MAPK) est observée. L'activation de cette voie entraîne une cascade de phosphorylation des kinases Ras/Raf/MEK/ERK. Cette voie est impliquée dans de nombreux mécanismes comme la croissance, la prolifération, la différenciation, la migration et l'apoptose, faisant d'elle une cible thérapeutique intéressante. Les inhibiteurs de sérine/thréonine kinases ou de tyrosine kinases se fixent sur les sites de liaison à l'ATP empêchant ainsi l'activation de ces kinases[1,2,3].

- Les inhibiteurs de Raf

Une des causes de l'activation constitutive de la voie des MAP-kinases est une mutation au niveau des gènes qui codent pour Raf, Ras, ou pour des protéines situées en aval de Ras. Dans environ 70% des mélanomes, la mutation de *B-RAF V600E* est retrouvée et conduit à une activation constitutive des protéines B-Raf, capable d'entraîner la prolifération cellulaire en l'absence de facteurs de croissance.

Le vémurafénib et le dabrafénib sont des inhibiteurs de la sérine-thréonine kinase B-Raf. Ainsi, sur des cellules présentant cette mutation *V600E de B-RAF*, ils inhibent la phosphorylation de ERK et ont un effet anti-prolifératif. Ce médicament a permis d'améliorer la prise en charge de patients atteints de mélanomes avec la mutation *V600E de B-RAF*[4].

Le sorafénib est un inhibiteur de multiples kinases. Il inhibe l'activité de nombreuses cibles, C-Raf, B-Raf, V600E B-Raf, c-KIT, FLT-3, VEGFR-2, VEGFR-3 et PDGFR-ß. Le ciblage de ces différentes kinases entraîne une diminution de la prolifération cellulaire. Le sorafénib semble agir sur un large spectre de cellules tumorales, notamment grâce à son effet sur de multiples cibles[4].

De même, le régorafénib est aussi un inhibiteur ciblant de multiples kinases, KIT, Ret, C-Raf, B-Raf, V600E B-Raf, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 et TIE2[4].

- Les inhibiteurs de MEK

Les mutations activatrices de *B-RAF* entraînent la phosphorylation de MEK. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs de MEK semble intéressante dans les cancers avec une mutation de *B-RAF*.

Le tramétinib est un inhibiteur allostérique, réversible et sélectif de l'activation du signal régulé par MEK. L'activation de MEK induite par B-Raf ainsi que l'activité kinase de MEK

sont inhibées par le tramétinib. Des modèles expérimentaux ont montré une diminution de la phosphorylation de ERK et des effets anti-tumoraux sur des animaux porteurs d'un mélanome avec une mutation *V600 de B-RAF*[4].

Le cobimetinib est également un inhibiteur allostérique, réversible et sélectif de MEK1 et 2 entraînant le blocage de la voie des MAP-Kinases avec une inhibition de la phosphorylation de ERK1/2. En conséquence, le cobimetinib inhibe la prolifération cellulaire[4].

### (ii) Voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR

En réponse à différents stimuli, les phosphoinositide-3-kinases (PI3K) phosphorylent les groupements hydroxyles en position 3 du cycle inositol de différents phosphoinositides, générant ainsi des phosphatidylinositol 3-phosphates, phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphates, et phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphates (PIP3). La formation de PIP3 conduit à la phosphorylation en aval de la protéine Akt puis de mTOR. L'activation de cette voie coordonne de nombreux processus cellulaires incluant la survie, la croissance et la migration cellulaire. De multiples altérations moléculaires de cette voie PI3K/Akt/mTOR peuvent être retrouvées dans les cellules cancéreuses. Ainsi, elle est impliquée dans le développement et la progression tumorale.

- Le ciblage des PI3K

Il existe plusieurs classes de PI3K mais il semble que seules les aberrations de signalisation de classe I sont impliquées dans les cancers humains. Ces protéines de classe I sont des hétérodimères composés d'une ou plusieurs sous-unité(s) régulatrice(s) et d'une sous-unité catalytique. Il existe 4 isoformes de la sous-unité catalytique : p110α, p110β, p110δ et p110γ.

La première génération d'inhibiteurs pan-PI3K (p110α, p110β, p110δ et p110γ) avait une activité limitée[3] et il semble plus intéressant d'utiliser des molécules isoformes-spécifiques.

L'idélalisib inhibe l'isoforme p110δ qui est hyperactive dans les tumeurs malignes à cellules B. L'idélalisib inhibe de façon sélective la fixation de l'ATP sur le domaine catalytique de la sous-unité catalytique p110δ, ce qui entraîne une inhibition de la phosphorylation du phosphatidylinositol 3-phosphate et d'Akt. Cette molécule induit l'apoptose des lymphocytes B tumoraux et inhibe également leur prolifération et leur migration[4].

Dans certains cancers, les cellules tumorales peuvent présenter une mutation ou une amplification du gène *PIK3CA* qui code pour la sous unité catalytique p110α des PI3K. L'alpélisib est un inhibiteur de l'isoforme p110α disposant d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU). Sur des cellules mutées au niveau du gène *PIK3CA*, l'alpélisib a permis de réduire de manière dose-dépendante l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR, mise en évidence par une diminution de la phosphorylation d'Akt et de mTOR. Cet inhibiteur

isoforme-spécifique de p110α diminue la prolifération cellulaire et entraîne un arrêt du cycle cellulaire ainsi qu'une apoptose dans des cellules tumorales mutées pour *PIK3CA*[5].

- Le ciblage de mTOR

La voie de signalisation impliquant la sérine-thréonine kinase mTOR peut être perturbée de nombreuses façons au cours du cancer, aussi bien en amont qu'en aval de la molécule. Elle peut être activée, de façon anormale, par une sur-expression ou des mutations des kinases des récepteurs (notamment des récepteurs IGFR ou EGFR). Des mutations des PI3K et d'*AKT* ou des sur-exepressions ont été observées dans certains cancers. Le gène suppresseur *PTEN* peut être inhibé soit par mutation soit par méthylation du promoteur, notamment dans les syndromes de prédisposition tumorale comme le syndrome de Cowden. La protéine mTOR fonctionne comme une sous-unité catalytique et forme 2 complexes dans la cellule, mTOR complex-1 et mTOR complex-2. Les analogues de la rapamycine (rapalogues) ont une activité anti-tumorale dans divers cancers et sont fréquemment associés à d'autres agents anti-tumoraux. Ces analogues se lient au récepteur intracellulaire FKBP12. Ce complexe Rapamycine/FKBP12 se fixe directement sur le domaine FKBP12-Rapamycin Binding de mTOR[4].

L'évérolimus et le temsirolimus sont des inhibiteurs sélectifs de mTOR. L'évérolimus et le temsirolimus se lient à la protéine intracellulaire FKBP12 formant un complexe qui inhibe l'activité du mTOR complex-1. Cette inhibition entrave la synthèse de protéines impliquées dans le cycle cellulaire, l'angiogenèse et la glycolyse. Ainsi, ces 2 médicaments inhibent la croissance et la prolifération des cellules tumorales, des cellules endothéliales, des fibroblastes et des cellules musculaires lisses vasculaires[3].

### (iii) Voie de signalisation Jak/STAT

De nombreux récepteurs, notamment des récepteurs aux cytokines sont liés à une « Janus kinase » (JAK) et peuvent activer, par phosphorylation, les voies de « signal transducers and activators of transcription » (STAT) en aval. Il existe 4 JAK (JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2). Selon le type cellulaire et en fonction du récepteur de cytokines, différentes associations entre les JAK sont retrouvées. Ces voies de signalisations impliquant JAK/STAT peuvent être dérégulées dans les cancers. Par exemple, les néoplasmes myéloprolifératifs présentent des anomalies génétiques, telle que *JAK2-V617F*, entraînant une dérégulation de la voie des récepteurs aux cytokines/JAK2/STAT

Le ruxolitinib est un inhibiteur sélectif de JAK1 et JAK2. Ces kinases sont impliquées dans la signalisation de différents facteurs de croissance et de cytokines qui sont importants pour l'hématopoïèse et la fonction immunitaire. Le ruxolitinib entraîne l'inhibition de la signalisation JAK/STAT et la prolifération sur des cellules d'hémopathies malignes[4].

### (iv) Voies impliquant des molécules à activité tyrosine/kinase

- Les récepteurs à activité tyrosine/kinase

Les voies de signalisation MAP-kinases et PI3K/Akt, présentées ci-dessus, peuvent être activées, en amont, suite à la phosphorylation de récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) tels que les membres de la famille HER (human epidermal growth factor receptor). Cette famille de RTK est composée de 4 membres, EGFR (HER1), HER2, HER3 et HER4.

Lorsque l'« epidermal growth factor » (EGF) se lie à son récepteur (EGFR), ce dernier se dimérise conduisant, via son activité tyrosine/kinase, à l'activation de multiples voies de signalisation telles que PI3K/Akt/mTOR ou MAP-kinases. Ces voies entraînent des signaux de prolifération cellulaire, de survie, de néo-angiogenèse, conduisant à des phénomènes métastatiques, *etc.* L'*EGFR* est considéré comme oncogénique et peut être dérégulé dans les cellules tumorales à cause d'une sur-expression (amplification du gène, altération de la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle) ou d'une activation constitutionnelle (mutation du gène).

Le gefitinib et l'erlotinib sont des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase (ITK) sélectifs de l'EGFR en se liant au niveau de la poche à ATP. Ils inhibent la transduction du signal sur les cellules tumorales mutées pour l'*EGFR*. L'osimertinib est un ITK de l'EGFR porteur de la mutation activatrice (*EGFRm*)[4]. Des anticorps dirigés contre l'EGFR ont également été développés, le cétuximab et le panitumumab, et seront décrits ci-dessous (cf partie I) A) 2) b) (i)).

Dans la même famille de récepteurs, HER2 est également considéré comme un oncogène, notamment dans le cancer du sein où son gène est fréquemment amplifié ou surexprimé. HER2 est un récepteur sans ligand connu qui est capable de s'hétérodimériser avec d'autres récepteurs de cette famille HER ou de se dimériser conduisant à une autophosphorylation de résidus tyrosine. Cette phosphorylation conduit à la transduction du signal via les voies MAP-kinases et PI3K/Akt/mTOR.

Des anticorps ciblant spécifiquement HER2, le trastuzumab et le pertuzumab, ont été développés (cf partie I) A) 2) b) (i)). Des inhibiteurs de tyrosine kinase comme l'afatinib et le lapatinib sont également utilisés en clinique mais ciblent à la fois l'EGFR et HER2[4].

L'afatinib est un inhibiteur sélectif des récepteurs de la famille HER. L'afatinib se lie de manière covalente à tous les homo et hétéro-dimères formés par les membres de la famille HER. Le lapatinib, lui, est spécifique de l'EGFR et de HER2. Ces 2 ITK bloquent ainsi les signaux provenant de ces récepteurs.

- Les protéines de fusion à activité tyrosine kinase

Des anomalies génétiques comme des translocations peuvent être à l'origine du développement de cellules tumorales. Par exemple, dans 95% des LMC, la protéine de fusion $p210^{BCR-ABL}$ (une protéine de fusion de 210 kiloDaltons obtenue après juxtaposition du gène *ABL* à une partie du gène *BCR*), résultant de la translocation (9; 22), est retrouvée.

Les ITK, imatinib, dasatinib, nilotinib, ponatinib et bosutinib, ciblent cette protéine de fusion en inhibant son activité tyrosine kinase. Ces médicaments inhibent sélectivement la prolifération et entraînent une apoptose dans les cellules leucémiques issues de patients atteints de LMC et de leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) dans lesquelles la translocation (9; 22) est retrouvée[4].

D'autres protéines de fusion peuvent être retrouvées dans certains cancers notamment celles impliquant ALK. Plusieurs protéines de fusion contenant une partie d'ALK (exemple : EML4-ALK et NPM-ALK) sont retrouvées dans certains cancers hématologiques et pulmonaires.

Le crizotinib est une petite molécule inhibitrice sélective du RTK ALK et de ses variants oncogéniques (c'est-à-dire variants de fusion *ALK* et certaines mutations d'*ALK*). Le crizotinib a montré une inhibition concentration-dépendante de l'activité kinase de l'ALK, du ROS1 et de c-Met sur des lignées de cellules tumorales présentant des variants de fusion d'ALK[4]. Cela a permis une inhibition de la croissance et a induit l'apoptose dans ces lignées de cellules tumorales. De même, le céritinib et l'alectinib sont des ITK agissant sur la protéine ALK.

- Autres protéines à activité kinase

La tyrosine kinase de Bruton (BTK) est une molécule essentielle des voies de signalisation du récepteur antigénique des cellules B permettant leur mobilité, leur chimiotactisme et leur adhésion. La voie du récepteur antigénique des cellules B est impliquée dans la tumorigenèse de plusieurs hémopathies malignes à cellules B. L'ibrutinib est un ITK qui, par liaison covalente à la BTK, inhibe son activité enzymatique ainsi que la prolifération, la survie, la migration et l'adhésion des cellules B malignes.

La cycline D1 et les « cyclin-dependent kinases 4 et 6 » (CDK4/6) sont situées en aval de multiples voies de signalisation entraînant une prolifération cellulaire. Le palbociclib est un inhibiteur des CDK4/6.

### (v) Profil épigénétique

Même sans anomalie génétique (mutation, amplification, délétion, *etc*.), une cellule peut devenir tumorale suite à des modifications de son profil épigénétique conduisant à une altération de l'expression de ses gènes[6]. Une des modifications épigénétiques possible est la méthylation des gènes régulant leur expression. Dans les cellules tumorales, une hyperméthylation de gènes suppresseurs de tumeur peut être observée, entraînant une inactivation de ces gènes. Ainsi, ces gènes pourraient être réactivés par une hypométhylation.

L'azacitidine et la decitabine sont des agents hypométhylants de l'ADN. Cette hypométhylation de l'ADN est due à l'incorporation de ces médicaments dans l'ADN qui induit l'inactivation des ADN méthyltransférases. Ces molécules sont utilisées dans les syndromes myélodysplasiques ou les leucémies, où elles possèdent un effet cytotoxique sur les cellules hématopoïétiques anormales[4].

En plus de la méthylation, l'inactivation de gènes peut être due à une compaction de l'ADN par l'intermédiaire des histones. La transcription de gènes peut être altérée par un enroulement serré de l'ADN. Le degré de compaction peut être régulé par diverses modifications et notamment par l'acétylation. Les histones acétyl-transférases sont des enzymes responsables de cette acétylation des histones qui est réversible par l'action des histones désacétylases (HDAC). L'acétylation permet un relâchement de la chromatine. Ainsi, l'inhibition d'HDAC permet de relâcher la chromatine et ainsi de favoriser la transcription de gènes de la région concernée.

Le panobinostat et le vorinostat inhibent l'activité enzymatique des HDAC. Ces inhibiteurs induisent donc une augmentation de l'acétylation des histones, conduisant à un arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose de cellules tumorales[4].

### (vi) Voies apoptotiques

Le cancer, mais également la résistance aux chimiothérapies, peuvent résulter d'une incapacité des cellules tumorales à entrer en apoptose. Ce phénomène peut être induit par une sur-expression ou une stabilisation de facteurs de survie intra-cellulaire tels que des membres de la famille de Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) ou de la famille des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) en particulier « cellular IAP » (cIAP) 1, cIAP2, survivine, et « X-chromosome linked IAP » (XIAP). Smac (second mitochondria-derived activator of caspases) est un antagoniste endogène de cIAP1/2 et XIAP. Ainsi, afin de favoriser l'entrée en apoptose des cellules tumorales, des Smac mimétiques ont été développés. Ces molécules encore au stade d'essais cliniques tels que Birinapant, LCL161, Debio1143, GDC0152, HGS1029 et CUDC427 sont capables de se lier à cIAP1/2 et XIAP et d'entraîner leur dégradation.

Dans certaines tumeurs, comme les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC), la sur-expression de Bcl-2 a induit une augmentation de la survie tumorale et a été associée à la résistance à la chimiothérapie.

Le vénétoclax est un inhibiteur sélectif de Bcl-2. Après sa liaison à Bcl-2, des protéines pro-apoptotiques contenant le motif BH3, telle que BIM, sont déplacées, entraînant l'initiation de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, l'activation des caspases et conduisant à l'apoptose. Le vénétoclax a permis d'obtenir un effet cytotoxique dans les cellules tumorales surexprimant Bcl-2.

### (vii) Voies de réparation de l'ADN

Chaque jour, l'ADN subit une multitude de dommages conduisant à des cassures simple ou double-brins, des modifications de bases, *etc*. Plusieurs systèmes de réparation de l'ADN sont retrouvés dans les cellules humaines. Certains cancers héréditaires sont dus à une altération d'un des systèmes de réparation de l'ADN. Par exemple, une mutation de *BRCA1* ou de *BRCA2* sont des prédispositions génétiques aux cancers du sein et de l'ovaire. Les protéines *BRCA1* et *BRCA2* sont impliquées dans le mécanisme de réparation des cassures double-brins de l'ADN par recombinaison homologue. Cette mutation entraîne la production de protéines non-fonctionnelles à l'origine d'une instabilité génétique responsable d'une augmentation du risque de développer un cancer.

Une façon de cibler les cellules tumorales présentant cette anomalie génétique est d'utiliser le principe de létalité synthétique. La létalité synthétique consiste à combiner deux événements non létaux individuellement qui vont, par synergie, entraîner la mort cellulaire. Pour cela, les cibles visées doivent être complémentaires.

Ainsi, dans les cellules mutées pour *BRCA1* ou *BRCA2*, dont le système de réparation des cassures double-brins est altéré, une des stratégies est de bloquer le système de réparation par excision de bases (BER) prenant en charge des cassures simple-brins. En inhibant la Poly(ADP-ribose) polymérase (PARP), le processus de réparation des cassures simple-brins est bloqué. Au cours de la réplication, ces cassures simple-brins deviendront des cassures double-brins lorsque les fourches de réplication rencontreront l'adduit PARP-ADN. Dans des cellules ayant un déficit du système de recombinaison homologue (mutation de *BRCA1* ou *BRCA2* notamment), ces cassures ne seront pas réparées et conduiront à un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et à l'apoptose. En effet, les systèmes alternatifs de réparation de cassures double-brins, comme la « jonction des extrémités non homologues » (NHEJ), sont plus sujettes à erreur et entraînent donc une instabilité génomique conduisant à la mort cellulaire.

L'olaparib est un inhibiteur de PARP qui empêche la dissociation de la PARP et la piège sur l'ADN, inhibant ainsi son rôle dans la réparation de l'ADN. Il est utilisé en association aux sels de platine dans les cancers avec une mutation de *BRCA* (germinale et/ou somatique)[4].

### (viii) La dépendance aux hormones

En fonction du type cellulaire d'origine responsable de l'apparition du cancer, les récepteurs situés à la surface cellulaire peuvent être différents. Ceci implique que les cellules tumorales peuvent réagir différemment aux facteurs présents dans le microenvironnement cellulaire selon leur origine et l'expression de récepteurs. Les cellules tumorales exprimant des récepteurs hormonaux à leur surface vont être stimulées par la fixation des hormones spécifiques de ces récepteurs, entraînant notamment une prolifération cellulaire. Les hormonothérapies utilisent cette caractéristique pour éliminer les cellules tumorales de cancers dits hormono-dépendants. Certains cancers du sein expriment des récepteurs aux œstrogènes et/ou à la progestérone alors que certains cancers de la prostate sont sensibles aux androgènes et plus particulièrement à la testostérone.

- Les anti-androgènes

Les cancers de la prostate sont sensibles aux androgènes. Ils répondent généralement à l'inhibition des voies de signalisation des récepteurs aux androgènes qui doivent être transloqués au niveau du noyau pour interagir avec l'ADN. Ainsi, des traitements anti-androgènes peuvent être indiqués dans ce type de pathologie. Des anti-androgènes non stéroïdiens tels que le flutamide, le nilutamide, le bicalutamide, et l'enzalutamide inhibent la liaison entre les androgènes et leurs récepteurs[4]. Ce blocage des récepteurs androgéniques inhibe la translocation nucléaire des récepteurs activés, et leur fixation à l'ADN. Ainsi, ces médicaments peuvent induire l'apoptose des cellules prostatiques cancéreuses conduisant à une régression tumorale.

- Les inhibiteurs de la biosynthèse d'androgènes

Le cancer de la prostate sensible aux androgènes répond aux traitements qui diminuent les concentrations en androgènes. La biosynthèse des androgènes, au niveau des testicules, des glandes surrénales et des tissus tumoraux prostatiques, nécessite l'expression de l'enzyme 17alpha-hydroxylase/C17,20-lyase (CYP17). L'abiratérone inhibe sélectivement cette enzyme CYP17. Administré en même temps que des analogues de l'« hormone entraînant la libération de gonadotrophines » (GnRH ou LH-RH) (ou que l'orchidectomie), le traitement par abiratérone abaisse la concentration de testostérone sérique à un niveau indétectable, ralentissant la progression tumorale[4].

- Les anti-œstrogènes

Dans les cancers du sein, certaines cellules tumorales expriment les récepteurs aux œstrogènes à leur surface. Des molécules, capables de moduler (tamoxifène, torémifène et raloxifène) ou

de diminuer l'expression (fluvestrant), de façon sélective, de ces récepteurs aux œstrogènes, peuvent être utilisées. Le tamoxifène, le torémifène et le raloxifène peuvent avoir un effet agoniste sur les récepteurs aux œstrogènes de certains tissus, tels que l'endomètre et l'os, mais antagoniste sur les récepteurs des cellules tumorales mammaires. Le fulvestrant diminue significativement l'expression des récepteurs aux œstrogènes dans les tumeurs positives pour ces récepteurs. Ces médicaments anti-œstrogèniques empêchent la fixation des œstrogènes sur leurs récepteurs situés sur les cellules tumorales, bloquant ainsi leur activité pro-tumorale et notamment leurs actions trophiques[4].

- Les inhibiteurs d'aromatase

Chez la femme ménopausée, l'œstradiol résulte principalement de la conversion, dans les tissus périphériques, des androgènes en œstrogènes *via* le complexe enzymatique de l'aromatase. Ainsi, la réduction du taux d'œstradiol induite par l'inhibition de l'aromatase constitue un traitement efficace et sélectif du cancer du sein hormonodépendant chez les femmes ménopausées. Les inhibiteurs sélectifs non stéroïdiens (anastrozole et létrozole) ou stéroïdiens (exemestane) de l'enzyme aromatase induisent une réduction de la biosynthèse des œstrogènes au niveau de tous les tissus, où le complexe inhibiteur/aromatase est présent. Cette hormonothérapie peut être instituée lorsque les cellules tumorales sont dépendantes des œstrogènes. L'élimination de la stimulation des œstrogènes est une condition préalable à une réponse de la tumeur.

- Les analogues ou antagonistes de l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires

Les analogues de l'hormone entraînant la libération de gonadotrophines (GnRH ou LH-RH), telles que la triptoréline, la goséréline et la leuproréline, entraînent une hyperstimulation de l'hypophyse qui, par rétrocontrôle négatif, va inhiber la sécrétion de l'hormone lutéinisante hypophysaire (LH) et de l'hormone folliculo-stimulante hypophysaire (FSH). Par conséquent, ces molécules provoquent la suppression des fonctions testiculaires et ovariennes. La triptoréline, la goséréline et la leuproréline peuvent être utilisées chez l'homme dans les cancers de la prostate où ils entraînent la suppression de la synthèse des stéroïdes testiculaires avec des concentrations plasmatiques de testostérone proches de celles observées chez les hommes ayant subi une castration chirurgicale. Chez la femme, la goséréline et la leuproréline, entraînent, après plusieurs semaines de traitement, des concentrations plasmatiques d'œstradiol comparables à celles observées chez les femmes ménopausées. Ainsi, ces deux molécules sont indiquées dans le traitement du cancer du sein métastatique hormono-dépendant[4].

A l'inverse, le dégarélix est un antagoniste sélectif de la GnRH qui peut réduire la sécrétion de LH et de FSH, et donc la production de testostérone par les testicules *via* sa fixation

compétitive et réversible sur les récepteurs de la GnRH de l'hypophyse. Ainsi, il peut agir sur les cellules tumorales de cancers de la prostate androgéno-dépendants.

#### (ix) Le blocage de différentiation des cellules tumorales

Les cellules tumorales perdent généralement leur rôle et leurs capacités d'origine, notamment par leur dé-différenciation. Par exemple, dans la leucémie aigüe pro-myélocytaire (LAM M3), des anomalies de facteurs de transcription impliqués dans l'hématopoïèse normale peuvent induire un blocage de la différenciation des cellules malignes. La translocation récurrente t(15;17) des LAM M3 touche le récepteur nucléaire alpha à l'acide rétinoïque (RARα), et génére une oncoprotéine de fusion PML- RARα[7]. Les acides rétinoïques, comme l'acide tout trans-rétinoïque (ATRA), induisent une différenciation irréversible de certaines cellules malignes en cellules fonctionnelles matures. Les cellules ainsi traitées acquièrent un aspect cytologiquement normal, de cellules matures, une fonction phagocytaire, et renforcent l'expression du marqueur CD15. Par conséquent, sous l'effet de l'ATRA, les cellules leucémiques s'engagent vers une différenciation terminale et fonctionnelle au terme de laquelle la cellule mature meurt. Il y a donc une induction de la mort cellulaire de ces cellules malignes. Même si, parfois, les cellules n'ont pas acquis toutes les caractéristiques d'une cellule normale, elles ont au moins perdu celles de malignité[7,8]. Une des alternatives à l'ATRA, notamment en cas de résistance, est le trioxyde d'arsenic qui conduit à la lésion ou la dégradation de l'oncoprotéine de fusion PML- RARα[4].

### *b) Les anticorps spécifiques des cellules tumorales*

Les anticorps sont des protéines complexes produites par les plasmocytes et ont un rôle important dans l'immunité adaptative. Ils sont capables de reconnaitre spécifiquement des pathogènes et de les neutraliser. Ils sont composés de 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères, reliées entre elles par des ponts disulfures. En fonction de leurs chaînes lourdes, les anticorps sont divisés en 5 isotypes, les immunoglobulines IgG, IgA, IgM, IgE et IgD.

Les capacités de ciblage spécifique et de neutralisation en font des molécules intéressantes pour l'industrie pharmaceutique. Ainsi de nombreux anticorps sont développés pour traiter de nombreuses pathologies, dont les cancers. L'isotype d'anticorps le plus fréquemment utilisé en clinique est l'IgG[9].

Selon l'anticorps utilisé, différents mécanismes d'action peuvent être impliqués. En plus de leur effet neutralisant, certains peuvent induire la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) et/ou la phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADPh)[9]. En plus de ces effets, ces anticorps peuvent être conjugués à des toxines, des isotopes radioactifs ou des agents

chimiothérapeutiques. On retrouve ainsi plusieurs catégories d'anticorps utilisés en clinique, dont certains exemples sont décrits ci-dessous.

### (i) Les anticorps neutralisants pouvant induire l'ADCC et la CDC

- Ciblage de l'EGFR (HER1 ou c-ErbB-1)

L'EGFR (HER1 ou c-ErbB-1) est un RTK. Il est surexprimé dans de nombreux cancers (colon, ovaire, poumon, tête et cou)[9], faisant de ce récepteur une cible thérapeutique intéressante en oncologie.

Le cétuximab est un anticorps monoclonal IgG1 chimérique (humain/murin) qui se lie spécifiquement au domaine extracellulaire du récepteur du facteur de croissance épidermique humaine (EGFR)[4].

Panitumumab est un anticorps monoclonal IgG2 humanisé anti-EGFR. La nature 100% humaine des anticorps comme le panitumumab entraîne de très faible taux d'anticorps dirigés contre les anticorps humanisés[4].

Ces anticorps, par liaison spécifique à l'EGFR, bloquent la liaison de l'EGF, la dimérisation du récepteur, ainsi que l'activation des voies de signalisation en aval, entraînant l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules tumorales.

- Ciblage de HER2

Le récepteur HER2, ou c-ErbB-2, est un RTK. Son implication dans la tumorigenèse a été rapportée, plus particulièrement dans le cancer du sein où son gène est retrouvé amplifié dans environ 30% des cas. HER2 peut également être sur-exprimé dans certains adénocarcinomes ovariens, prostatiques, gastro-intestinaux et pulmonaires. A l'heure actuelle, aucun ligand n'a été décrit mais il adopterait constitutivement une configuration ouverte favorisant l'hétéro-dimérisation et l'activation des voies de signalisation en aval. Ainsi, la sur-expression de HER2 est responsable d'une augmentation de la transduction du signal et d'une activation des voies PI3K/Akt et des MAP-kinases.

Le trastuzumab est un anticorps monoclonal humanisé de classe IgG1 dirigé contre HER2. Il se fixe au sous-domaine IV du domaine extracellulaire de HER2. Cette liaison empêche le clivage protéolytique de son domaine extracellulaire qui est un mécanisme d'activation de HER2, observé même en l'absence de ligand. Il se lie également aux récepteurs Fcγ et au complément C1q. Ainsi, il inhibe la transmission du signal par la voie PI3K/Akt et agit comme médiateur de l'ADCC dans les cellules tumorales qui sur-expriment HER2.

Le pertuzumab est un anticorps monoclonal humanisé qui cible spécifiquement le domaine de dimérisation extracellulaire de HER2 et ainsi, bloque l'hétérodimérisation ligand-dépendante de HER2 avec d'autres récepteurs de la famille des HER (dont EGFR, HER3 et HER4).

Ces anticorps empêchent donc la fixation et l'activation de ce RTK. Ce blocage du récepteur HER2 inhibe l'activation des voies de signalisation intracellulaire ligand-dépendantes telles que la voie PI3K/Akt et la voie des MAP-kinases. En conséquence, les cellules tumorales vont subir un arrêt de la prolifération cellulaire et entrer en apoptose. De plus, le pertuzumab est un médiateur de l'ADCC[4].

- Ciblage du type cellulaire responsable du cancer

Les stratégies de ciblage des cellules tumorales décrites précédemment visent les propriétés de ces cellules comme le fort taux de division cellulaires (agents cytotoxiques) ou les aberrations moléculaires des tumeurs (thérapies ciblées). Une autre manière de cibler les cellules tumorales est d'étudier l'origine de ces cellules. En effet, il existe des caractéristiques différentes selon le type cellulaire à l'origine de la tumeur, cellules épithéliales (carcinome), cellules du tissu conjonctif (sarcome), cellules du tissu hématopoïétique (leucémies), cellules du tissu lymphoïde (lymphome), cellules du tissu mélanocytaire (mélanome), *etc*.

Dans le cas de lymphomes ou de LLC, les cellules responsables du cancer sont originaires du tissu lymphoïde. Le CD20 est exprimée sur les cellules pré-B et B normales et malignes, mais ne l'est pas sur les cellules souches hématopoïétiques, les cellules pro-B, les plasmocytes normaux et les autres tissus normaux[10]. Ainsi, des thérapies ont été développées ciblant une caractéristique du tissu d'origine, l'expression du CD20.

Le rituximab est un anticorps monoclonal chimérique (humain/murin) de classe IgG1 ciblant le CD20. D'autres anticorps anti-CD20 ont ensuite été développés, l'ofatumumab (IgG1 humain) et l'obinutuzumab (IgG1 humanisée). Ces anti-CD20 agissent en activant l'ADCC, le CDC, et l'apoptose des cellules tumorales *via* la caspase 3.

L'alemtuzumab est un anticorps monoclonal IgG1 humanisé spécifique du CD52, exprimé principalement à la surface des lymphocytes périphériques sanguins B et T normaux et malins, ainsi que des monocytes, thymocytes et macrophages. L'alemtuzumab est utilisé dans les LLC et induit, via l'ADCC et la CDC, la lyse des lymphocytes.

Le daratumumab est un anticorps monoclonal IgG1 humanisé qui se lie spécifiquement au CD38 exprimé en grande quantité à la surface des cellules tumorales du myélome multiple (MM). Une puissante activité inhibitrice de la croissance des cellules tumorales exprimant le CD38 a été démontrée *in vitro* et *in vivo* avec cet anticorps *via* une lyse tumorale médiée par le fragment Fc qui induit l'ADCC, la CDC et une ADPh. En plus d'agir directement sur les cellules tumorales, le daratumumab peut également entraîner la lyse de cellules immunorégulatrices impliquées dans l'échappement des tumeurs à la surveillance immune. En effet, cet anticorps peut entraîner une cytotoxicité sur un sous-ensemble de cellules myéloïdes suppressives (MDSC CD38+), de cellules T régulatrices (Treg CD38+) et de cellules B (Breg CD38+).

### (ii) Les Anticorps conjugués

En plus de leur action neutralisante, et de leur capacité à activer l'ADCC, la CDC et l'ADPh, les anticorps peuvent servir de vecteurs à d'autres thérapies. En effet, leur spécificité vis-à-vis de leur cible rend ces immunoglobulines intéressantes comme guide permettant de délivrer de la radiothérapie ou des molécules cytotoxiques au niveau de la cible.

- Les anticorps conjugués à un isotope radioactif

La radio-immunothérapie permet un traitement de radiothérapie interne. L'anticorps monoclonal joue alors un rôle d'agent de vectorisation, permettant la reconnaissance d'un antigène exprimé par les cellules tumorales. Cet anticorps est couplé à un radionucléide[11].

L'ibritumomab tiuxétan est un anticorps monoclonal murin IgG1 spécifique du CD20 conjugué à l'isotope yttrium-90. Ce radio-isotope est un pur émetteur bêta. La conjugaison de cet anticorps à l'yttrium-90 permet de détruire les cellules cibles mais également les cellules avoisinantes dans un rayon de 5 millimètres. Ainsi, même en l'absence de rôle direct du CD20 dans le développement tumoral, la cellule tumorale ciblée sera traitée par radio-immunologie[4].

- Les anticorps conjugués à un poison du fuseau

Le brentuximab vedotine est un anticorps chimérique IgG1 dirigé contre l'antigène CD30 conjugué à un agent cytotoxique. Le CD30 est exprimé sur les cellules tumorales de lymphome hodgkinien et de lymphome anaplasique à grandes cellules systémiques. L'activité biologique du brentuximab vedotine nécessite plusieurs étapes. Après sa liaison au CD30, le complexe anticorps/CD30 est internalisé et acheminé au compartiment lysosomial. Par clivage protéolytique, la monométhylauristatine E est libérée et va pouvoir se lier à la tubuline. Cette liaison perturbe le réseau de microtubules dans la cellule, induisant l'arrêt du cycle cellulaire et se traduisant par la mort apoptotique des cellules tumorales exprimant l'antigène CD30.

Le gemtuzumab ozogamicin est un anticorps humanisé IgG4 dirigé contre l'antigène CD33 et conjugué à un antibiotique antitumoral cytotoxique, la calichéamicine. Le CD33 est une protéine d'adhésion exprimée à la surface soit des cellules blastiques leucémiques chez 85-90% des patients atteints de leucémie aiguë myéloïde (LAM), soit des cellules immatures normales de la lignée myélomonocytaire. Il n'est pas exprimé sur les cellules souches hématopoïétiques normales, ni sur les cellules non-hématopoïétiques. Comme pour le brentuximab vedotine, la liaison de la partie d'anticorps anti-CD33 de gemtuzumab ozogamicin à l'antigène CD33 entraîne la formation d'un complexe qui va ensuite être internalisé puis transféré au compartiment lysosomial. Ainsi, le dérivé de calichéamicine est libéré à l'intérieur des cellules myéloïdes cibles. Cet agent cytotoxique se lie à l'ADN au niveau du sillon mineur, entraînant la rupture du double-brin d'ADN et la mort de la cellule.

Le trastuzumab emtansine est un anticorps monoclonal humanisé de classe IgG1 ciblant le récepteur HER2 conjugué de façon covalente au DM1 ($N^{2'}$-deacetyl-$N^{2'}$-(3-mercapto-1-oxopropyl)-maytansine), un inhibiteur de microtubules. Ainsi, l'agent cytotoxique DM1 sera préférentiellement libéré dans les cellules tumorales sur-exprimant HER2. Après sa liaison au HER2, le trastuzumab emtansine est internalisé puis dégradé dans le lysosome permettant de libérer des catabolites cytotoxiques contenant du DM1. Le trastuzumab emtansine présente à la fois le mécanisme d'action du trastuzumab (cf partie I) A) 2) b) (i)) et du DM1. Le DM1 est un inhibiteur de la polymérisation de la tubuline. Ainsi, en plus des effets médiateurs de l'ADCC, de la CDC, et inhibiteurs de la transmission du signal par la voie PI3K/Akt induits par le trastuzumab, cet anticorps conjugué entraîne l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M, conduisant à terme à la mort cellulaire par apoptose *via* l'action du DM1.

### 3) Les médicaments ciblant les cellules du microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral joue un rôle primordial dans la carcinogenèse et le développement tumoral[12–14]. Les cellules composant ce microenvironnement peuvent jouer un rôle anti-tumoral (par exemple, certaines cellules du système immunitaire, tels que les lymphocytes T cytotoxiques) ou pro-tumoral (tels que les fibroblastes ou les MSC). La tumeur, par contact direct avec ces cellules du microenvironnement, ou *via* la sécrétion de facteurs, est capable de modifier les cellules stromales, qui pourront alors acquérir des caractéristiques pro-tumorales ou entraîner une immuno-tolérance. De façon comparable à la thérapie ciblée, de plus en plus de molécules sont développées visant des anomalies du microenvironnement tumoral.

#### *a) Les cellules du système immunitaire*

Le rôle physiologique du système immunitaire est la défense de l'organisme contre le « non-soi », comme les pathogènes (bactéries, virus et parasites), les molécules exogènes, les cellules étrangères ou anormales. Ainsi, il présente un rôle anti-tumoral en éliminant les cellules anormales telles que les cellules tumorales. Cependant, au cours du développement tumoral, le système immunitaire peut être régulé, avec l'acquisition d'une immuno-tolérance voire de capacités pro-tumorales. Par conséquent, les cellules immunitaires, ou leucocytes, du microenvironnement peuvent-être ciblées dans les cancers, soit en restaurant leur activité anti-tumorale soit en bloquant leurs fonctions pro-tumorales. A l'heure actuelle, seuls les lymphocytes T cytotoxiques et les macrophages ont des immunothérapies les ciblant spécifiquement pour améliorer le traitement du cancer. D'autres médicaments, moins spécifiques ciblent plusieurs types de cellules immunitaires.

### (i) Les lymphocytes T cytotoxiques

Les lymphocytes T cytotoxiques (LTc), ou lymphocytes T CD8+, sont des cellules impliquées dans l'immunité acquise capables de reconnaitre spécifiquement des antigènes tumoraux. Les LTc exercent une activité anti-tumorale par sécrétion de perforine et de granzyme, entraînant respectivement la formation de pores dans la membrane plasmique et la mort cellulaire par activation des caspases. Ainsi, dans certains cancers, une infiltration de lymphocytes T au niveau tumoral est de bon pronostic[15,16]. Différentes molécules ont donc été développées afin de favoriser le rôle anti-tumoral de ces LTc. Ces immunothérapies semblent être actives sur des cancers accessibles aux cellules lymphocytaires et présentant des antigènes tumoraux, nécessaires à la reconnaissance des cellules tumorales par les LTc. Ainsi, ce type d'immunothérapie semble plus efficace dans les cancers ayant de nombreuses mutations, entraînant la reconnaissance par les LTc de plusieurs antigènes tumoraux.

- Les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires

A l'heure actuelle, les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires suscitent un grand intérêt, consécutif à des résultats prometteurs obtenus dans des pathologies tels que le mélanome ou le cancer du poumon. Ce type d'immunothérapie semble en effet intéressant dans les cancers ayant un nombre important de mutations, tels que le mélanome (où les UV sont capables d'induire de nombreuses mutations) et le cancer pulmonaire (notamment ceux induits par le tabagisme qui conduit à de nombreuses mutations). Un des mécanismes qui conduit à l'échappement tumoral à la surveillance immune est l'expression de molécules inhibitrices des LTc à la surface des cellules tumorales. Le principe de ces inhibiteurs de points de contrôle immunitaires est d'empêcher la transmission d'un signal inhibiteur aux LTc, permettant ainsi de restaurer l'activité anti-tumorale des LTc. Le ciblage des axes « cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 » (CTLA4) / B7 ou Programmed cell Death-Ligand 1 (PD-L1) / Programmed cell Death-1 (PD-1) inhibe ces points de contrôle.

- Les inhibiteurs ciblant CTLA4

La fixation de molécules B7-1 ou B7-2 (également nommées respectivement CD80 et CD86), présentes sur les cellules présentatrices d'antigènes, au CD28 des LTc permet d'induire un signal activateur, entraînant la stimulation de ces derniers. Cependant, si les ligands B7-1 ou 2 se lient à CTLA4, présente également sur les LTc, un signal inhibiteur est transmis conduisant à un effet immuno-suppressif, notamment en inhibant les fonctions de co-stimulation relayées par le CD28.

L'ipilimumab est un anticorps monoclonal entièrement humain (IgG1) dirigé contre CTLA4. Cet anticorps empêche ainsi la fixation de ligands sur CTLA4, entraînant une augmentation du nombre de cellules T effectrices réactives et également une réduction de la fonction des

cellules T régulatrices. L'augmentation du ratio intra-tumoral cellules T effectrices/cellules T régulatrices ainsi obtenu contribue à une réponse immunitaire anti-tumorale.

- Les inhibiteurs ciblant l'axe PD-L1/PD-1

De manière comparable au CTLA4, le récepteur PD-1 conduit à un signal inhibant les LTc lors de sa liaison avec son ligand, le PD-L1 qui appartient également à la famille B7. Le PD-1 ainsi que son ligand PD-L1 sont donc des cibles potentielles pour empêcher l'inhibition des LTc et induire leur stimulation.

Deux anticorps monoclonaux dirigés contre PD-1, le pembrolizumab et le nivolumab (IgG4 humaines), ont à l'heure actuelle une autorisation de mise sur le marché (AMM) en oncologie. Des anticorps ciblant le ligand de PD-1, des anti-PD-L1, sont en cours de développement. Deux anticorps, l'avelumab et l'atézolizumab, disposent à l'heure actuelle d'une ATU. Ces immuno-thérapies stimulant les LTc entraînent la mort de cellules tumorales.

- Les anticorps avec de multiples cibles spécifiques

Le catumaxomab est un anticorps trifonctionnel. Il permet d'attirer les cellules tumorales à proximité des lymphocytes T cytotoxiques, permettant à ces derniers d'exercer leur activité cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales. Il cible pour cela, deux sites antigéniques différents, un situé sur les cellules tumorales et l'autre sur les lymphocytes. Il se fixe sur la molécule d'adhésion cellulaire épithéliale (EpCAM) qui est surexprimé sur les cellules tumorales de la plupart des carcinomes et également sur l'antigène CD3, qui est exprimé sur les lymphocytes T au niveau du récepteur des cellules T (TCR). Le catumaxomab possède également un domaine fonctionnel Fc qui se lie aux récepteurs Fcγ de type I, IIa et III sur des cellules tels que les macrophages, les cellules NK ou les cellules dendritiques. La réaction immunologique, obtenue après regroupement des cellules tumorales, des lymphocytes T et des cellules accessoires, entraîne la mort des cellules tumorales par ADCC, CDC et ADPh[17].

Une nouvelle classe de médicaments favorise l'activité des lymphocytes T et regroupe les « Bispecific T cell Engagers (BiTE) ». Ces médicaments ont une structure particulière, ils possèdent deux domaines similaires à ceux des anticorps qui se lient à des antigènes spécifiques. Ces deux domaines de liaison sont mono-caténaires et sont réunis par liaison covalente *via* un peptide de liaison. Par conséquent, cet « anticorps » BiTE est complètement dépourvu des régions constantes des anticorps. Ainsi, ces BiTE sont des protéines de fusion relativement petites avec un poids moléculaire beaucoup plus faible qu'un anticorps classique[18,19].

Le blinatumomab est une protéine de fusion recombinante de la classe des BiTE à chaîne simple pouvant avoir une activité contre les cellules leucémiques à précurseur B *via* la mobilisation de lymphocytes T. Il est dirigé spécifiquement contre le CD19, exprimé à la surface des cellules de la lignée B, et le CD3, exprimé à la surface des lymphocytes T. Cette

double spécificité permet de juxtaposer les cellules leucémiques à précurseurs B et les LTc. Ainsi, les LTc peuvent agir sur les cellules B leucémiques même en absence de spécificité de leur TCR vis-à-vis d'un peptide antigénique situé sur les cellules tumorales. En effet, l'activité antitumorale de l'immuno-thérapie par le blinatumomab est due à la formation d'une synapse cytolytique entre le LTc et la cellule tumorale libérant des enzymes protéolytiques, perforine et granzyme, pour tuer les cellules cibles qu'elles soient en prolifération ou quiescentes. Le blinatumomab est associé à une synthèse de protéines cytolytiques, la libération de cytokines inflammatoires et la prolifération des lymphocytes T, et entraîne l'élimination des cellules CD19+ avec une activation des caspases 3 et 7[18,19].

### (ii) Les macrophages et les ostéoclastes

Les monocytes et les macrophages sont des leucocytes qui dérivent de progéniteurs myéloïdes. Après maturation dans la moelle osseuse, les monocytes peuvent passer dans la circulation sanguine à partir de laquelle ils vont pouvoir migrer par extravasation vers divers tissus où ils vont se différencier en macrophages. Ces cellules de l'immunité innée sont capables d'éliminer des pathogènes ou des cellules anormales par phagocytose mais également d'activer le système immunitaire adaptatif en jouant le rôle de cellules présentatrices d'antigènes. Les ostéoclastes, comme les macrophages, sont des cellules issues de la lignée myélocytaire. Les ostéoclastes sont généralement considérés comme les macrophages des os. Les caractéristiques communes des macrophages et des ostéoclastes font que les traitements ciblant les macrophages ou les ostéoclastes affectent ces 2 types cellulaires. Dans un contexte tumoral, les monocytes circulants peuvent être recrutés au niveau de la tumeur grâce à des facteurs sécrétés par les cellules tumorales ou par d'autres cellules du microenvironnement tumoral[20–22]. Si dans les stades précoces de l'oncogenèse il est décrit que les macrophages ont un phénotype M1 avec une activité plutôt anti-tumorale, ils acquièrent un phénotype différent appelé M2 dans les stades plus avancés de la maladie. Dans ce cas, ils participent au développement tumoral[20,23]. Les polarisations M1 et M2 des macrophages doivent être considérées comme les extrémités d'un continuum d'état d'activation, et l'état exact de différentiation est fonction de la composition des signaux locaux qui vont pouvoir « éduquer » les macrophages[20,23–25]. Dans de nombreux cancers, une forte densité de macrophages associés aux tumeurs (TAM) est corrélée à un mauvais pronostic[24].

Le CSF-1 (colony stimulating factor 1), ou M-CSF, est un facteur de croissance nécessaire à la différenciation et à la survie des macrophages. Duluc *et al*. ont montré que ce facteur était capable de polariser les macrophages vers un phénotype M2d, pro-tumoral[26]. A l'heure actuelle, des molécules dirigées contre le RTK de CSF-1 (CSF-1R), comme le pexidartinib (ITK)[27] ou l'emactuzumab (anticorps monoclonal), sont en cours d'évaluation dans des essais cliniques dans de nombreux cancers. De façon moins spécifique, l'imatinib et le sunitinib, qui sont des ITK actifs sur de nombreuses cibles, agissent également sur le CSF-1R.

L'élimination des macrophages de type M2, pro-tumoraux, pourrait permettre une meilleure efficacité des traitements anti-tumoraux associés.

Les bisphosphonates, comme l'acide zolédronique, le clodronate ou le risedronate, utilisés pour traiter l'ostéoporose, agissent sur les ostéoclastes. Ils inhibent de façon importante la résorption ostéoclastique osseuse mais le mécanisme précis n'est pas encore bien défini. Les bisphosphonates possèdent également des propriétés anti-tumorales avec un effet pro-apoptotique sur les cellules tumorales ainsi qu'un effet cytostatique synergique en association à d'autres médicaments anti-tumoraux. L'altération du microenvironnement médullaire, par l'inhibition de la résorption ostéoclastique observée *in vivo*, entraîne un environnement moins favorable à la croissance des cellules tumorales. Ainsi, ils pourraient également être utilisés pour éliminer les macrophages dont l'infiltration est de mauvais pronostic dans de nombreux cancers.

De même, le dénosumab, qui est un anticorps monoclonal IgG2 humain, agit sur les ostéoclastes. Cet anticorps se lie spécifiquement sur RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand). Le dénosumab bloque ainsi l'axe RANKL/RANK, réduisant le nombre et la fonction des ostéoclastes. L'inhibition de cet axe entraîne la diminution de la résorption et de la destruction osseuse induite par un cancer. Bien qu'il soit plutôt indiqué pour les tumeurs osseuses à cellules géantes (de type ostéoclastique) ou pour prévenir des complications osseuses, le dénosumab pourrait également agir sur les macrophages et empêcher leurs effets pro-tumoraux[4].

### (iii) Le système immunitaire en général

Une stratégie différente des inhibiteurs de points de contrôle immunitaires est d'utiliser des médicaments capables de stimuler directement le système immunitaire. Ces immuno-stimulants visent à inhiber l'immuno-tolérance observée dans de nombreux cancers et à restaurer l'effet anti-tumoral des cellules immunitaires.

- Les cytokines

L'interleukine 2 (IL-2) est une protéine naturelle de l'organisme. L'IL-2 active des récepteurs situés sur les membranes plasmiques de nombreuses cellules immunitaires tels que les NK, les lymphocytes T et B. L'IL-2 joue le rôle de facteur de croissance pour les lymphocytes T et permet leur transformation en LTc qui sécrètent de l'interféron γ, lequel stimule les macrophages. L'aldesleukine est de l'IL-2 recombinante ayant un effet biologique comparable à cette lymphokine naturelle. Bien que les mécanismes précis de ce médicament ne soient pas encore connus, l'aldesleukine entraîne une immuno-stimulation en produisant de multiples effets immunologiques dose-dépendants. Cette immuno-thérapie permet, dans des modèles *in vivo*, de diminuer la croissance de la tumeur et sa dissémination.

L’interféron-α est une protéine naturelle, produite notamment par les cellules immunitaires. Il joue un rôle dans la défense immunitaire contre les pathogènes ou les cellules anormales comme les cellules tumorales. L’interféron-α, après sa fixation à son récepteur, conduit à une cascade de réactions intracellulaires entraînant des activités immuno-modulatrices comme l'augmentation de l'activité phagocytaire des macrophages et l'augmentation de la cytotoxicité spécifique des LTc sur des cellules tumorales. Ainsi, des interféron-α 2a et interféron-α 2b sont disponibles dans l’arsenal anti-tumoral grâce à leurs propriétés semblables à celles de l’interféron-α naturel humain. Les mécanismes précis permettant l’activité anti-tumorale des interféron-α 2a et interféron-α 2b ne sont pas encore bien définis, néanmoins ces molécules semblent agir directement sur les cellules tumorales, en plus de leur action sur le système immunitaire. En effet, des expériences *in vitro* ont montré une activité anti-prolifération de l’interféron-α sur diverses lignées de cellules tumorales humaines avec une diminution significative de la synthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines. De même, ces molécules ont un effet anti-prolifératif dans des modèles expérimentaux *in vivo* de souris immunodéprimées développant des tumeurs. Toutefois, le rôle immuno-stimulant de ces molécules semble être un rôle majeur dans l’activité anti-tumorale de ces médicaments.

- Les vaccins anti-tumoraux

Une autre façon de stimuler le système immunitaire est de mettre au point des vaccins qui vont induire une élimination sélective des cellules cancéreuses. Les cibles thérapeutiques peuvent être des antigènes associés aux tumeurs. La mucine 1 (MUC-1) est une cible thérapeutique envisagée pour le développement d’un vaccin permettant de lutter contre divers cancers d’origine épithéliale. La MUC-1 est une protéine transmembranaire retrouvée à la surface des cellules épithéliales. Cette protéine a pour rôles la lubrification et la protection des cellules épithéliales. Elle est surexprimée dans de nombreux cancers épithéliaux. MUC-1 régule l'expression de gènes aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel. Elle favorise la croissance tumorale, la dissémination métastatique et la résistance au traitement[28]. La MUC-1 associée aux tumeurs diffère de celle exprimée dans les cellules normales, à la fois dans ses caractéristiques biochimiques et sa distribution cellulaire. En effet, le profil de glycosylation est différent sur les MUC-1 retrouvées dans les cancers par rapport aux MUC-1 normales. Ainsi, sa sur-expression et sa forme particulière dans les cancers font de cette protéine une cible intéressante pour développer des vaccins. Le TG4010 est un vaccin qui cible cet antigène associé aux tumeurs MUC-1. Le TG4010 est une suspension de « virus of Ankara » atténué recombinant, contenant des séquences codant l'antigène MUC-1 humain et la cytokine IL-2 humaine. Les essais cliniques utilisant cette molécule ont montré une amélioration de l’effet du traitement en combinaison avec la chimiothérapie, comparé à la chimiothérapie seule chez des patients atteints de cancers pulmonaires non à petites cellules. Ces études ont montré des réponses de cellules T spécifiques à MUC-1[29].

- Les médicaments immuno-modulateurs

La classe des médicaments immunomodulateurs (IMiD) comme la thalidomide, le lénalidomide et le pomalidomide, entraîne une altération de la production de cytokines, une régulation de la co-stimulation des lymphocytes T ainsi qu'une augmentation de la cytotoxicité des cellules NK[30]. En effet, ces médicaments entraînent une diminution de la sécrétion de TNF-α, IL-1, IL-6, IL-12, et de protéines pro-angiogéniques comme le bFGF (basic-Fibroblast Growth Factor) et le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)[31]. La cible des IMiD semble être une protéine E3 ubiquitine ligase, le céréblon. En présence des IMiD, le céréblon se lie aux protéines substrats telles que les protéines ikaros (IKZF1) et aiolos (IKZF3), qui sont des facteurs de transcription spécifiques des cellules B, ce qui entraîne leur ubiquitination puis leur dégradation par le protéasome. Ce mécanisme conduit à des effets cytotoxiques et immuno-modulateurs[4,32]. Les protéines ikaros et aiolos sont sur-exprimées dans les tumeurs malignes lymphoïdes B notamment dans le myélome multiple (MM). Les IMiD modifient le ratio lymphocytaire T circulant chez le sujet sain, diminuant les cellules T « helper » et augmentant les LTc. Ces IMiD augmenteraient le nombre et l'activité cytotoxique des cellules NK, impliquées dans l'immunité anti-tumorale. En plus de leur rôle immunomodulateur, les IMiD pourraient avoir un rôle anti-tumoral direct en bloquant la prolifération tumorale par arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou en induisant l'apoptose[4,31,32].

Tableau 2 : Molécules ciblant les cellules immunitaires développées en oncologie

# Ciblage du microenvironnement immunitaire

| Cellules ciblées | Cibles | Mécanisme d'action | Molécules / médicaments |
|---|---|---|---|
| **Lymphocytes T cytotoxiques** | CTLA4 | • Inhibe la fixation de ligands sur CTLA4<br>• Bloque la transmission du signal inhibiteur de CTLA4<br>• Augmentation du nombre de cellules T effectrices<br>• Réduction de la fonction des cellules T régulatrices<br>• Réponse immunitaire anti-tumorale | ipilimumab |
| **Lymphocytes T cytotoxiques** | PD-1 | • Inhibe la fixation de PD-L1 sur PD-1<br>• Bloque la transmission du signal inhibiteur de PD-1<br>• Augmentation du nombre de cellules T effectrices<br>• Réduction de la fonction des cellules T régulatrices<br>• Réponse immunitaire anti-tumorale | nivolumab<br>pembrolizumab |
| **Lymphocytes T cytotoxiques** | PD-L1 | • Inhibe la fixation de PD-L1 sur PD-1<br>• Bloque la transmission du signal inhibiteur de PD-1<br>• Augmentation du nombre de cellules T effectrices<br>• Réduction de la fonction des cellules T régulatrices<br>• Réponse immunitaire anti-tumorale | avelumab<br>atézolizumab (ATU) |
| **Lymphocytes T cytotoxiques** | EpCAM<br>CD3 | • Anticorps trifonctionnel possédant un fragment Fc et ciblant :<br>- EpCAM: exprimé sur cellules épithéliales dont carcinomes<br>- CD3 : exprimé sur les LTc au niveau du TCR<br>• Regroupement cellules tumorales, LTc et cellules accessoires<br>• Mort des cellules tumorales par ADCC, CDC et ADPh | catumaxomab |
| **Lymphocytes T cytotoxiques** | CD19<br>CD3 | • Protéine de fusion recombinante de la classe des BiTE ciblant :<br>- CD19 : exprimé à la surface des cellules de lignée B<br>- CD3 : exprimé sur les LTc au niveau du TCR<br>• Elimination des cellules B leucémiques CD19+ | blinatumomab |
| **Macrophages** | CSF-1R | • Inhibition du CSF-1R ayant une activité tyrosine kinase<br>• Inhibe la différentiation M2d et la survie des macrophages<br>• Inhibition de l'effet pro-tumoral des macrophages | emactuzumab<br>pexidartinib<br>(essais cliniques) |
| **Macrophages / ostéoclastes** | RANKL | • Liaison de l'anticorps sur RANKL<br>• Blocage de l'axe RANKL/RANK<br>• Réduction du nombre et de la fonction des ostéoclastes<br>• Diminution de la résorption et de la destruction osseuse due au cancer<br>• Possible inhibition des macrophages et de leurs effets pro-tumoraux | dénosumab |
| **Macrophages / ostéoclastes** | | • Inhibition de la résorption ostéoclastique osseuse<br>• Effet pro-apoptotique sur les cellules tumorales<br>• Effet cytostatique synergique en association à certains antitumoraux<br>• Entraîne un environnement moins favorable à la croissance tumorale<br>• Elimination des macrophages | bisphosphonates |
| **Multiples cellules immunitaires** | Récepteurs de l'IL-2 | • Fixation de l'IL-2 sur ses récepteurs situés sur les cellules immunitaires tels que les NK, les lymphocytes T et B entraînant leur activation<br>• Rôle de facteur de croissance pour les lymphocytes T et permet leur transformation en LTc qui sécrètent de l'interféron γ, lequel stimule les macrophages<br>• Immuno-stimulation en produisant de multiples effets immunologiques dose-dépendants<br>• Diminution de la croissance et de la dissémination tumorale | aldesleukine (IL-2) |
| **Multiples cellules immunitaires** | Récepteurs de l' interféron-α | • Fixation de l'interféron-α sur son récepteur<br>• Augmentation de l'activité phagocytaire des macrophages<br>• Augmentation de cytotoxicité spécifique des LTc sur cellules tumorales<br>• Activité antiprolifératives directe de l'interféron-α sur diverses lignées de cellules tumorales humaines | interféron-α 2a<br>interféron-α 2b |
| **Multiples cellules immunitaires** | MUC-1 | • Vaccin contenant des séquences codant :<br>- l'antigène MUC1 : retrouvé à la surface des cellules épithéliales. et sur-exprimé dans de nombreux cancers épithéliaux<br>- la cytokine IL-2 immunostimulante<br>• Réponse anti-tumorale de cellules T spécifiques à MUC-1 | vaccins : TG4010 (essais cliniques) |
| **Multiples cellules immunitaires : cellules NK, Lymphocytes T cytotoxiques et « helper », *etc*.** | Céréblon | • Liaison du céréblon à ikaros et aiolos<br>• Dégradation d'ikaros et aiolos par le protéasome<br>• Effets cytotoxiques et immuno-modulateurs *via* :<br>- altération de la production de cytokines<br>- régulation de la co-stimulation des LTc<br>- augmentation de la cytotoxicité des cellules NK | thalidomide<br>lénalidomide<br>pomalidomide |

### *b) Les cellules endothéliales*

Les cellules endothéliales sont les cellules qui tapissent la face interne des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Ces cellules sont donc importantes pour l'intégrité des vaisseaux sanguins et lymphatiques mais également pour la formation de nouveaux vaisseaux. Ainsi, elles sont déterminantes pour l'angiogenèse et la lymphangiogenèse qui sont les processus conduisant à la création de nouveaux vaisseaux, respectivement sanguins et lymphatiques, à partir de vaisseaux pré-existants. Ces deux phénomènes sont impliqués dans le développement tumoral. La voie la plus connue dans ces phénomènes est celle du « vascular endothelial growth factor » (VEGF) et de son récepteur, le VEGFR. Le VEGF peut être sécrété par les cellules tumorales. Plusieurs isoformes de VEGF sont retrouvées chez l'homme, le VEGF-A, le VEGF-B, le VEGF-C et le VEGF-D. Le VEGF-A est le plus décrit dans l'angiogenèse alors que le VEGF-C et le VEGF-D semblent également impliqués dans la lymphangiogenèse. Ces facteurs de croissance se fixent sur leurs récepteurs, le VEGFR-1, le VEGFR-2 et le VEGFR-3. Le VEGFR-1 est un récepteur leurre et la fixation du VEGF sur ce récepteur n'induit pas d'effet pro-angiogénique. Au contraire, la fixation du VEGF sur le VEGFR-2 stimule l'angiogenèse, augmente la perméabilité vasculaire et transmet des signaux de prolifération, migration et de survie. Enfin, le VEGFR-3 semble plus particulièrement impliqué dans la lymphangiogenèse.

#### (i) Les cellules endothéliales vasculaires

L'angiogenèse a de multiples rôles physiologiques notamment dans le développement embryonnaire, le cycle menstruel, la croissance osseuse, *etc*. Cependant, ce processus joue aussi un rôle dans certaines conditions pathologiques, par exemple en favorisant la cicatrisation. L'angiogenèse est également importante dans le développement tumoral. En effet, la tumeur a besoin d'oxygène et de nutriments pour proliférer. L'oxygénation des tissus ne peut pas se faire au-delà de 200 micromètres (environ 5 rangées de cellules), rendant nécessaire la création de nouveaux vaisseaux pour alimenter la tumeur. Dans le cas des cancers, la nécessité d'un « switch angiogénique » semble indispensable au développement tumoral. Ce switch angiogénique correspond à un déséquilibre en faveur des molécules pro-angiogéniques (tels que le VEGF, le FGF, le PDGF, *etc*.) au dépend de molécules anti-angiogéniques (telles que l'endostatine, la tumstatine, *etc*.). Ainsi, afin de limiter cette néo-angiogenèse, des médicaments ont été développés pour éviter la création de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de cellules endothéliales. L'axe le plus ciblé est celui du VEGF / VEGFR et plus particulièrement VEGF-A / VEGFR-2.

Deux médicaments ayant une AMM ciblent le VEGF. Il s'agit du bévacizumab, qui est un anticorps monoclonal humanisé, ou de l'aflibercept qui est un récepteur leurre soluble constitué de fragments issus des VEGFR-1/2 (où peuvent se fixer le VEGF-A), fusionnés au fragment Fc de l'IgG1 humaine. Le bévacizumab et l'aflibercept vont ainsi se fixer au VEGF et empêcher sa fixation sur le VEGFR. La neutralisation de l'activité biologique du VEGF

entraîne une importante activité anti-tumorale en induisant la régression de certains vaisseaux tumoraux existants et en inhibant la formation de nouveaux vaisseaux tumoraux, inhibant ainsi la croissance tumorale. Les vaisseaux tumoraux étant anormaux et anarchiques, les anti-VEGF permettent également une normalisation transitoire des vaisseaux tumoraux, conduisant à une meilleure diffusion dans la tumeur des médicaments cytotoxiques qui peuvent leur être associés durant cette période.

D'autres médicaments anti-angiogéniques ciblent le VEGFR-2. Le ramucirumab est un anticorps monoclonal humain qui cible spécifiquement le VEGFR-2. Il empêche ainsi la fixation du VEGF sur le VEGFR-2 et inhibe l'activation de cette voie. Les autres médicaments ciblant le VEGFR-2 sont des ITK du récepteur mais ne sont pas spécifiques de ce récepteur car ils ciblent de nombreuses autres kinases. Le sorafenib, le sunitinib, le pazopanib, l'axitinib, le vandétanib, le nintédanib, le régorafénib, le lenvatinib et le cabozantinib sont des inhibiteurs multicibles notamment de l'activité tyrosine kinase du récepteur VEGFR-2[4].

A titre d'exemple, le Sorafenib est une petite molécule inhibitrice des RAF-kinases, qui sont des sérine/thréonine-kinases, mais également de c-KIT, FLT-3, PDGFR-β, VEGFR-2 et VEGFR-3, qui sont des RTK.

### (ii) Les cellules endothéliales lymphatiques

La lymphangiogenèse correspond à la croissance de nouveaux vaisseaux lymphatiques à partir de vaisseaux pré-existants. Elle permet la nutrition des tissus par apport des graisses absorbées au niveau de l'intestin grêle. La lymphe peut être assimilée à du sang dépourvu de globules rouges, plus pauvre en nutriments et plus riche en déchets que le sang. Dans un contexte tumoral, les cellules cancéreuses sont généralement séquestrées et détruites dans les ganglions lymphatiques qu'elles traversent. Cependant, dans certaines circonstances, les cellules peuvent se développer dans les ganglions et former des foyers tumoraux secondaires[33]. Les vaisseaux lymphatiques sont tapissés de cellules endothéliales lymphatiques. La voie impliquant le VEGF-C/D et le VEGFR-3 est la plus décrite dans la lymphangiogenèse.

Les anti-VEGFR3 disposant d'une AMM à l'heure actuelle sont des ITK du récepteur mais ciblent également d'autres kinases. Le sorafenib, le sunitinib, le pazopanib, le lenvatinib, l'axitinib, le nintédanib, le régorafénib et le cabozantinib sont des anti-lymphangiogénique ciblant le VEGFR3 mais qui inhibent également de nombreuses autres cibles.

### *c) Les fibroblastes associés au cancer*

Les fibroblastes sont des cellules d'origine mésenchymateuse appartenant au tissu conjonctif. Ils ont une morphologie fusiforme et un rôle de soutien pour les différents tissus. Ils sont impliqués en particulier dans l'homéostasie de la matrice extracellulaire en régulant sa synthèse (production de collagène, élastine, fibronectine et laminine) ou sa dégradation (synthèse de métalloprotéases matricielles (MMP)). Les fibroblastes jouent également un rôle dans la réparation de lésions tissulaires. Le cancer étant souvent comparé à une blessure qui ne guérie pas, les fibroblastes semblent donc être des cellules du microenvironnement tumoral intéressantes à étudier.

Dans le contexte du cancer, les fibroblastes adoptent un phénotype particulier nommé « fibroblastes associés au cancer » (CAF). Ces CAF possèdent des caractéristiques phénotypiques différentes des fibroblastes normaux. En effet, les CAF expriment une forme particulière d'actine, l'actine des muscles lisses alpha (α-SMA), comme les myofibroblastes. Les CAF expriment aussi des protéines tels que « fibroblast activation protein » (FAP), « platelet-derived growth factor receptor » (PDGFR) ou encore le récepteur au facteur de croissance des fibroblastes (FGFR). Ces modifications phénotypiques semblent induites par les cellules tumorales. Les CAF sont décrits comme pro-tumoraux. En effet, ils peuvent jouer un rôle pro-angiogénique et favoriser à la fois la croissance tumorale et la dissémination métastatique (par dégradation de la MEC *via* la sécrétion de MMP). Dans de nombreux cancers, une forte proportion de CAF est de mauvais pronostic et peut entraîner la formation de fibrose.

Le ciblage des CAF semble intéressant pour améliorer le traitement de certains cancers. A l'heure actuelle, aucun médicament disposant d'une AMM n'est spécifique des fibroblastes. Cependant, des inhibiteurs agissant sur l'activité du FGFR sont utilisables en oncologie. Le nintédanib, le régorafénib, le ponatinib, le lenvatinib, le lucitanib et le dovitinib inhibent le FGFR, mais toutes ces molécules inhibent également d'autres cibles.

Des traitements plus spécifiques des fibroblastes sont en cours de développement et pourraient permettre d'améliorer la prise en charge de certains cancers. A titre d'exemple, une molécule, le RO6874281, formée d'une protéine de fusion recombinante composée d'un anticorps monoclonal humain dirigé contre FAP liée à une forme modifiée d'interleukine-2, est en essai clinique de phase I ciblant les CAF. Une autre molécule, le RO6874813, est également en essai clinique de phase I. Le RO6874813 est un anticorps bispécifique qui cible simultanément la FAP des CAF et le récepteur de mort DR5 sur les cellules tumorales. Enfin, un anticorps monoclonal F19 ciblant spécifiquement FAP est également en essai clinique de phase I[34].

Tableau 3 : Molécules ciblant les cellules stromales non-immunitaires développées en oncologie

# Ciblage du microenvironnement non-immunitaire

| Cellules ciblées | Cibles | Mécanisme d'action | Molécules / médicaments |
|---|---|---|---|
| **Cellules endothéliales vasculaires** | VEGF-A | • Fixation de l'anticorps au VEGF-A et inhibition de sa fixation au VEGFR<br>• Régression des vaisseaux tumoraux et inhibition de la formation de nouveaux vaisseaux tumoraux<br>• Inhibition de la croissance tumorale<br>• Normalisation des vaisseaux tumoraux, conduisant à une meilleure diffusion intra-tumorale des médicaments cytotoxiques associés | bévacizumab |
| **Cellules endothéliales vasculaires** | VEGF-A | • Récepteur leurre soluble constitué de fragments issus des VEGFR-1/2, fusionnés au fragment Fc de l'IgG1<br>• Fixation au VEGF -A et inhibition de sa fixation au VEGFR<br>• Régression des vaisseaux tumoraux et inhibition de la formation de nouveaux vaisseaux tumoraux,<br>• Inhibition dei la croissance tumorale<br>• Normalisation des vaisseaux tumoraux, conduisant à une meilleure diffusion intra-tumorale des médicaments cytotoxiques associés | aflibercept |
| **Cellules endothéliales vasculaires** | VEGFR2 | • Fixation au VEGF R2 et inhibition de la fixation du VEGF sur le VEGFR2<br>• Inhibition de l'activation de la voie VEGF/VEGFR2<br>• Inhibition de l'angiogenèse | ramucirumab |
| **Cellules endothéliales vasculaires** | VEGFR2 | • Inhibition de multiples kinases dont l'activité tyrosine kinase du VEGFR3<br>• Inhibition de l'angiogenèse | sorafenib, sunitinib, pazopanib, axitinib, vandétanib, nintédanib, régorafénib, lenvatinib et cabozantinib |
| **Cellules endothéliales lymphatiques** | VEGFR3 | • Inhibition de multiples kinases dont l'activité tyrosine kinase du VEGFR3<br>• Inhibition de la lymphangiogenèse | sorafenib, sunitinib, pazopanib, lenvatinib, axitinib, nintédanib, régorafénib et cabozantinib |
| **Fibroblastes** | FGFR | • Inhibition de multiples kinases dont l'activité tyrosine kinase du FGFR<br>• Inhibition de la voie FGF/FGFR en inhibant l'activité du facteur de croissance transmise par cette voie | nintédanib, régorafénib, ponatinib, lenvatinib, lucitanib et dovitinib |
| **Fibroblastes** | FAP | • Fixation des anticorps sur la FAP des CAF<br>• Diminution des CAF potentiellement pro-tumoraux | RO6874281, RO6874813, anticorps F19 (essais cliniques) |

## B) La résistance aux chimiothérapies

### 1) Résistance pharmacocinétique

De nombreux médicaments sont distribués dans le corps et par conséquent au niveau tumoral *via* le sang. Ainsi, une résistance impliquant la pharmacocinétique peut se produire dans les cas où la tumeur est inaccessible pour les médicaments anti-tumoraux du fait d'une faible vascularisation ou d'un débit sanguin insuffisant et d'une pression interstitielle élevée[35–38]. Il peut y avoir également des difficultés d'accès en terme de localisation, par exemple quand le médicament nécessite un passage de la barrière hémato-encéphalique[39]. Un autre facteur influençant est la variation interindividuelle. En effet, les paramètres pharmacocinétiques comme l'absorption, la distribution, le métabolisme ou l'excrétion influencent significativement l'efficacité ou la toxicité des médicaments. Au niveau interindividuel, ces paramètres peuvent varier selon des facteurs génétiques, l'âge, le sexe, le poids, l'état des fonctions rénale et hépatique ou en fonction de l'administration (moment, durée, *etc*.)[40–42]. Tous ces facteurs peuvent conduire à une résistance aux chimiothérapies chez certains patients (par exemple, inactivation de médicaments par un métabolisme plus rapide).

### 2) Résistance pharmacodynamique

La résistance pharmacodynamique peut impliquer différents mécanismes, chacun comprenant différents processus. Un de ces mécanismes est d'empêcher le médicament d'atteindre sa cible thérapeutique. D'autres mécanismes pharmacodynamiques liés à la résistance peuvent être dus à une modification au niveau de la cible (par des changements dans les niveaux d'expression ou de mutations de gènes). Enfin, certains mécanismes se situent post-cible, inhibant l'effet des médicaments[43–45].

### 3) Résistances en amont de la cible

Il existe plusieurs façons d'empêcher un médicament d'atteindre sa cible thérapeutique. Ceux-ci incluent le passage de la membrane cellulaire par le médicament, comme une diminution de l'expression des transporteurs impliqués dans l'entrée du médicament dans la cellule. En outre, l'efflux des médicaments est également impliqué. En effet, la sur-expression des protéines d'efflux, par exemple les protéines de « multi drug resistance » (MDR) ou la P-glycoprotéine (Pgp), entraînent un flux plus important de médicament du cytoplasme des cellules cancéreuses vers l'environnement extracellulaire et une concentration intracellulaire insuffisante pour permettre un effet sur sa cible. Ces mécanismes de résistance pré-cible impliquent également une activation ou une inactivation du médicament[43–45]. Ainsi, une réduction de l'activation métabolique des pro-médicaments peut entraver l'acquisition de leur

potentiel anti-tumoral, tels que la cytarabine, le 5-FU, le méthotrexate, la doxorubicine, *etc*. De même, une augmentation de l'inactivation d'un médicament, peut-être non spécifique (comme par le glutathion ou les métallothionéines) ou spécifique (tels que le 5-FU par la dihydropyrimidine déshydrogénase, la cytarabine par la cytidine désaminase et la bléomycine par hydrolase). Ces mécanismes peuvent ainsi conférer une résistance aux médicaments[43–45].

### 4) Résistances au niveau de la cible

Nous pouvons observer une résistance médiée par des modifications de la cible. Ces dernières peuvent être induites par des changements qualitatifs. On peut citer le cas de la β-tubuline de classe III (une protéine des microtubules de la famille de la tubuline) qui est exprimée au détriment de sa forme classique, ce qui conduit à une résistance aux médicaments dirigée contre la tubuline comme les taxanes et les vinca-alcaloïdes[46]. Les changements de la topoisomérase II (cette enzyme est capable de provoquer des cassures double-brins pour moduler les sur-enroulements de l'ADN) confèrent une résistance aux anthracyclines et une activité enzymatique accrue de la thymidylate synthetase (enzyme impliquée dans la synthèse de thymine) résultant en une résistance au 5-FU. Les modifications quantitatives de la cible, qui peuvent être soit liées à une augmentation de son expression due soit à une sur-expression, soit à une amplification, ou dans certains cas une diminution de son expression, peuvent également altérer l'efficacité du médicament. Dans le cas des molécules de liaison à l'ADN, une sur-expression des mécanismes de réparation de l'ADN (par exemple, une augmentation de l' « excision repair cross-complementation group 1 » (ERCC1) conférant une résistance aux agents alkylants ou aux composés de platine) est impliquée dans des mécanismes de résistance situés au niveau de la cible[43–45].

### 5) Résistances en aval de la cible

Même si le médicament atteint correctement sa cible, plusieurs mécanismes de résistance peuvent se produire à ce stade. L'un d'eux consiste en une résistance à l'entrée de la cellule en apoptose. En effet, certaines chimiothérapies conduisent les cellules à entrer en apoptose après avoir atteint leur cible. Cependant, les cellules peuvent être résistantes à cette voie de mort cellulaire par l'expression accrue de protéines anti-apoptotiques (cellular-inhibitor of apoptosis protein (cIAP)-1/2, X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL), *etc*.), par une perte de fonction de p53 (facteur de transcription impliqué dans la régulation de l'apoptose), mais aussi par d'autres mécanismes telle que l'activation de voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire[43–45]. Une modification du cycle cellulaire peut également être impliquée dans la résistance post-cible. En effet, en particulier pour les agents cytotoxiques ciblant les cellules à division rapide, le ralentissement ou l'arrêt du cycle cellulaire comme l'état de quiescence

et/ou de sénescence peut conduire à une résistance au traitement malgré le fait que les médicaments atteignent leurs cibles[43–45].

Ces dernières années, de nombreux travaux montrent que la résistance aux médicaments implique non seulement des changements génétiques des cellules cancéreuses, mais aussi des modifications phénotypiques des cellules induites par le microenvironnement de la tumeur. En effet, il a été suggéré que les interactions entre les cellules tumorales et, à la fois la matrice extracellulaire et les cellules stromales sont importantes dans l'acquisition de la chimiorésistance. Parmi les cellules du microenvironnement, les cellules stromales mésenchymateuses (MSC) sont capables d'induire une résistance aux médicaments dans de nombreux cancers (Tableaux 4 à 9). Cette résistance peut être induite par:

- La sécrétion de facteurs solubles par les MSC elles-mêmes ou directement par les cellules tumorales sous l'influence des MSC lors de leurs interactions
- Un échange de protéines membranaires entre les MSC et les cellules tumorales conduisant à l'acquisition de nouvelles propriétés par les cellules tumorales
- Le contact direct entre les MSC et les cellules tumorales

Ensemble, ces processus d'interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement entraînent l'activation de plusieurs voies de signalisation.

## C) Les cellules stromales mésenchymateuses

### 1) Caractéristiques des cellules stromales mésenchymateuses

Les MSC appartiennent à une population cellulaire hétérogène de cellules multipotentes capables de se différencier, *in vitro*, en cellules de lignées mésodermiques, tels que des adipocytes, des ostéoblastes, des chondrocytes, des fibroblastes et des structures vasculaires et péri-vasculaires. Les MSC possèdent des propriétés caractéristiques des cellules souches en ce qui concerne leurs propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation[47]. Les MSC présentent une adhérence au plastique et expriment plusieurs marqueurs de surface tels que CD73, CD90 et CD105. En revanche, elles n'expriment pas les marqueurs hématopoïétiques tels que CD11b, CD14, CD19, CD45 ou HLA-DR[48]. Bien qu'elles aient d'abord été identifiées comme une sous-population de cellules de moelle osseuse à potentiel ostéogénique, les MSC peuvent provenir de différents tissus. En effet, les MSC peuvent être obtenues non seulement à partir de la moelle osseuse (BM-MSC), mais aussi à partir du tissu adipeux (AT-MSC) et d'une variété d'autres tissus, y compris le placenta, la peau, le cordon ombilical, le sang, *etc*[49–52]. Les MSC jouent un rôle majeur dans l'homéostasie et la régénération tissulaire. Elles participent à la réparation des tissus par leur tropisme spécifique vers les sites de blessures, où elles peuvent se différencier en cellules mésodermiques[53–55] et peuvent contribuer à la guérison des tissus principalement par la sécrétion de facteurs paracrines[56–62]. Les MSC servent également de cellules de niche pour d'autres types cellulaires en régulant des

processus régénératifs telles que l'expansion des cellules hématopoïétiques et la régulation des cellules souches hématopoïétiques. De plus, les MSC jouent un rôle dans la tolérance immunitaire, par leurs effets immunosuppresseurs sur les lymphocytes T et les cellules dendritiques[63,64], empêchant ainsi une réaction immune dans des conditions physiologiques et pathologiques. Enfin, leur capacité à sécréter divers facteurs neurotrophiques et anti-inflammatoires, ainsi que leur capacité à se différencier en phénotype neuronal, pourraient conférer des effets neuroprotecteurs dans des modèles de sclérose latérale amyotrophique, de sclérose en plaques, de maladie de Parkinson et de glaucome[65–71]. Pour toutes ces raisons, les MSC représentent une population cellulaire hétérogène qui pourrait être très adaptée aux thérapies cellulaires en médecine régénérative[72–74].

### 2) Cellules stromales mésenchymateuses et cancer

Une caractéristique majeure des MSC est leur potentiel à migrer vers les sites de blessures. Les MSC peuvent ainsi être étroitement associées à des tumeurs malignes solides et hématologiques, et peuvent être recrutées sur les sites tumoraux ou, au contraire, attirer des cellules tumorales dans la moelle osseuse[75].

#### *a) Attraction des cellules tumorales sur la moelle osseuse ou constitution de niche métastatique*

Uchiyama *et al*. ont décrit que les MSC dérivées de la moelle osseuse (BM-MSC) peuvent affecter le développement de cellules hématopoïétiques *via* des interactions cellule-cellule directes et/ou par la libération de facteurs de croissance et de différenciation. Ils ont montré que l'adhésion des lignées de cellules de myélome à des MSC permettait un contact cellule-cellule facilitant la stimulation de la sécrétion d'IL-6 par les MSC, par un mécanisme de croissance paracrine[76]. Les données de la littérature soutiennent le concept que d'autres cellules souches hématologiques participent également activement à constituer une niche permissive pour les cellules métastatiques[77,78]. En résumé, les données montrent que les cellules tumorales pourraient subir une « chimio-attraction » par les MSC.

#### *b) Recrutement des MSC au niveau du site tumoral*

Des BM-MSC sont présentes dans le microenvironnement tumoral[79,80]. Kidd *et al*. ont montré que des MSC injectées par voie intraveineuse dans un animal porteur de tumeur sont attirées par la tumeur[81]. Des travaux ont montré que la chimio-attraction de MSC dépendait, au moins en partie, de plusieurs chimiokines et d'autres cytokines tels que IL-1[82] et SDF-1 (Stromal cell-Derived Factor 1), entre autres[83]. Les MSC sont activement recrutées dans le stroma

tumoral où elles interagissent avec les cellules malignes *via* le contact direct et par la signalisation paracrine. Grâce à de tels échanges, elles affectent sensiblement la biologie et le phénotype des cellules cancéreuses, augmentant leur capacité migratoire et métastatique et conférant une résistance à la chimiothérapie par une augmentation de l'adhérence cellulaire, de l'invasion, de la prolifération et de la chimiorésistance[13,14,78,84–88].

### c) *Phénotype des Carcinoma associated-MSC (CA-MSC)*

Comme mentionné auparavant, la biologie des cellules tumorales est affectée par les MSC. Il est raisonnable de supposer que les cellules tumorales peuvent à leur tour affecter la biologie des MSC. Des différences entre les phénotypes de CA-MSC et de BM-MSC ont été suggérées. Rafii *et al*. ont isolé un nouveau type de cellules stromales, provenant de l'ascite de patientes atteintes de cancer de l'ovaire, qui ont été trouvées étroitement associées aux cellules tumorales[89]. Ils ont défini ces cellules comme des cellules souches mésothéliales (dénommées Hospicells), car elles présentaient un phénotype typique de fibroblaste de par leur morphologie et l'expression de marqueurs tels que CD9, CD10, CD29, CD73, CD146 et CD166, sans expression de CD45 et CD34. Pour savoir si ces cellules dérivaient de MSC, leurs propriétés ont été analysées en utilisant des BM-MSC comme contrôle. Les résultats indiquaient des similitudes entre ces Hospicells et les MSC, les amenant à redéfinir les cellules souches mésothéliales comme des CA-MSC[89–91].

Il n'y a pas de critères majeurs décrits en termes de phénotype ou de propriétés entre ces CA-MSC (Hospicells) et les BM-MSC, bien que Bochet *et al*. aient signalé que les BM-MSC ou les MSC dérivant du tissu adipeux (AT-MSC), pourraient acquérir un phénotype fibroblastique lors du contact avec la tumeur[92].

### d) *Le rôle pro-tumoral des MSC*

Certaines publications mentionnent un rôle anti-tumoral potentiel des MSC. Takahara *et al*. ont décrit que l'injection d'AT-MSC en même temps que les cellules cancéreuses chez la souris induit un ralentissement de la prolifération tumorale[93]. Cependant, la plupart des données publiées soutiennent un effet pro-tumoral des MSC, principalement par la libération de facteurs d'activation tels que des cytokines et des facteurs de croissance. Les MSC sont capables de stimuler la croissance tumorale *in vivo*, d'augmenter l'angiogenèse et de favoriser le développement des métastases. A titre d'exemple, des expériences ont montré que les MSC contribuaient à la tumorigénicité du cancer de l'ovaire par la production altérée des « bone morphogenetic protein » (BMP), BMP2, BMP4 et BMP6, conduisant à une augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses ovariennes *in vitro* et *in vivo*.

L'effet pro-tumoral des CA-MSC pourrait être attribué à leur effet sur l'angiogenèse par la libération, par elles-mêmes ainsi que par des cellules environnantes comprenant les cellules

tumorales[22], de facteurs pro-angiogèniques tels que l'IL-6, le VEGF, l'IL-8 et l'« hypoxia-inducible factor 1-alpha » (HIF-1α). Les MSC sont également capables d'inhiber la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T. L'abrogation de la réponse immunitaire contribue à l'expansion tumorale[63,64]. Karnoub *et al*. ont démontré que l'injection de BM-MSC et de cellules de cancer du sein a entraîné une augmentation du potentiel métastatique des cellules tumorales par la libération de « chemokine (C–C motif) ligand 5 » (CCL5)[86]. De plus, les MSC peuvent indirectement contribuer à la progression tumorale par leur action sur d'autres cellules stromales à l'intérieur de la tumeur, tels que les macrophages. De tels macrophages activés présentent un phénotype particulier, sécrètent des quantités élevées de VEGF et favorisent ainsi l'angiogenèse[22].

En résumé, les CA-MSC semblent, non seulement favoriser la prolifération des cellules cancéreuses et l'angiogenèse *in vivo*[90], mais elles peuvent également être impliquées dans l'acquisition d'une chimiorésistance démontrée par des cellules cancéreuses traitées par différents agents chimiothérapeutiques. Cette chimiorésistance acquise peut se produire par:

- la libération de facteurs solubles par les MSC (IL-6, IL-8, VEGF)[22,90,91]
- un échange de protéines membranaires entre MSC et cellules tumorales[89]
- l'interaction directe avec les cellules tumorales[89]

### D) Rôle des cellules stromales mésenchymateuses dans la résistance des cellules tumorales aux chimiothérapies

Pour exercer leur rôle chimioprotecteur sur les cellules tumorales, les cellules stromales et les MSC semblent également résister à différents médicaments leur permettant d'agir tout au long du traitement[94]. Cette hypothèse a été étayée par différents rapports montrant une résistance *in vitro* des MSC humaines (hMSC) à des substances chimiothérapeutiques. Compte tenu des effets pro-apoptotiques de la plupart des médicaments cytotoxiques, ces auteurs ont suggéré que la résistance des hMSC contre les dommages génotoxiques provoqués par les médicaments pourrait être associée à leur résistance à l'induction de l'apoptose. Mueller *et al*. ont démontré que les hMSC, isolées à partir des échantillons de moelle osseuse de patients après chimiothérapie à dose élevée ou standard, étaient résistantes à des substances chimiothérapeutiques présentant différents mécanismes d'action (cyclophosphamide, vincristine, cytarabine, mercaptopurine, méthotrexate, asparaginase, doxorubicine, thioguanine, teniposide, idarubicine, melphalan, carboplatine, étoposide, ifosfamide, épirubicine et cladribine). Les hMSC conservent leurs caractéristiques (phénotype, capacité de prolifération et potentiel multipotent de différenciation) en dépit du traitement chimiothérapeutique[94]. Ils ont comparé la réponse *in vitro* des BM-MSC exposées à différents types de chimiothérapies versus non exposées avec la réponse d'une lignée cellulaire de haute sensibilité connue. Les BM-MSC présentaient une sensibilité similaire au cisplatine, à la vincristine et à l'étoposide. Cependant, les hMSC étaient plus résistantes à ces médicaments comparés à une lignée de cellules tumorales et conservaient leurs caractéristiques de cellules

souches après un traitement génotoxique *in vitro*. De même, Beane *et al*. ont pu montrer que les AT-MSC conservaient leur potentiel régénératif après traitement par carboplatine[95]. Le fait que ces cellules soient encore présentes même après le traitement implique qu'elles peuvent effectivement jouer un rôle dans la résistance aux traitements contre le cancer, leur effet chimioprotecteur persistant après plusieurs cycles de chimiothérapies.

Outre leur effet stimulant sur la progression tumorale et l'invasion, plusieurs rapports ont suggéré que les MSC pourraient contribuer à modifier la résistance des cellules tumorales à différents médicaments. Les données *in vitro* et *in vivo* rapportées au cours de la dernière décennie ont mis en évidence l'importance du microenvironnement médullaire et en particulier des MSC dans la protection des cellules tumorales, y compris de la LLC et d'autres cellules leucémiques, de l'apoptose induite par des chimiothérapies[88,96–98]. Cet effet protecteur semble concerner les MSC murines et humaines et être indépendantes de l'origine des cellules tumorales – tumeurs solides ou hématologiques. A titre d'exemple, Kurtova *et al*. ont trouvé que les MSC murines et humaines étaient très efficaces pour protéger les cellules de LLC de plusieurs médicaments cytotoxiques. Le mécanisme impliqué s'est avéré être la résistance aux médicaments médiée par l'adhésion cellulaire, qui est de plus en plus reconnue comme étant la cause de la maladie résiduelle et des rechutes après le traitement classique des hémopathies et d'autres malignités. L'effet protecteur pourrait être obtenu avec un rapport d'une seule MSC pour 100 cellules tumorales[98]. La chimiorésistance conférée par les MSC aux cellules tumorales agit contre un grand nombre de molécules appartenant à différentes sous-classes (taxanes, sels de platine, fludarabine, dexaméthasone, cyclophosphamide, *etc*.), en les protégeant de l'apoptose induite par les cytotoxiques[98]. Bien que les effets des MSC sur la chimiorésistance des cellules tumorales soient principalement décrits dans les cancers hématologiques, les MSC sont également impliquées dans la résistance aux médicaments de cancers solides, comme l'adénocarcinome ovarien et le cancer du poumon, entre autres. Cependant, les mécanismes et les voies cellulaires qui sont activés par les MSC sont différents d'un modèle à l'autre. Les différents mécanismes seront décrits dans ce manuscrit.

### 1) Mécanismes de résistance nécessitant un contact direct avec les cellules tumorales

Dans certains modèles tumoraux, le contact direct des MSC avec les cellules tumorales semble important dans l'acquisition d'une chimiorésistance. Uchiyama *et al*. ont montré que l'adhésion des cellules tumorales aux MSC induisait la sécrétion d'IL-6 par les cellules tumorales. Les auteurs ont caractérisé l'adhésion des cellules tumorales (lignées cellulaires dérivées du myélome) aux MSC en utilisant des essais de fixation au chrome 51 et ont ensuite analysé l'effet de cette adhésion sur la synthèse de l'ADN et la sécrétion d'IL-6 par les cellules tumorales. Ils ont conclu que le contact cellule-cellule facilitait la sécrétion d'IL-6 par les cellules tumorales[76] et que cette sécrétion était impliquée dans l'acquisition de la chimiorésistance[88,97,99–102]. De la même manière, Kurtova *et al*. ont montré que l'effet protecteur conféré par les MSC sur des cellules leucémiques était largement dépendant de leur

contact cellule-cellule direct, car une séparation des cellules par des filtres micropores abrogeait la fonction protectrice des MSC[98].

Enfin, Jin *et al*. ont rapporté un rôle protecteur des MSC sur des cellules leucémiques vis-à-vis de l'imatinib qui impliquait le contact cellule-cellule entre les MSC et les cellules tumorales par l'intermédiaire de l' « integrin-linked kinase ». En fait, ces auteurs ont montré que l'inhibition de cette « integrin-linked kinase » conduisait à une inhibition de la croissance et à une apoptose accrue induites par l'imatinib sur les cellules leucémiques lorsqu'elles sont co-cultivées avec des MSC[103].

### *a) Modification de l'expression de canaux à la surface cellulaire des cellules tumorales*

Le flux de médicaments est une considération importante dans l'efficacité des médicaments anti-tumoraux et concerne à la fois le niveau d'absorption intracellulaire de la molécule, nécessaire pour induire un effet cytotoxique, et son efflux dans le milieu extracellulaire qui diminue efficacement la quantité atteignant la cible et donc son efficacité. De nombreuses pompes ou canaux cellulaires sont impliqués dans des mécanismes de résistance aux médicaments des cellules tumorales. Un mécanisme bien décrit est la sur-expression des protéines impliquées dans la résistance à plusieurs médicaments (protéines de « multidrug resistance (MDR)). Les protéines MDR sont des pompes dépendantes de l'ATP qui peuvent conférer une résistance à de nombreux médicaments, y compris les taxanes, les vinca-alcaloïdes et les anthracyclines[74]. Une augmentation de l'expression de ces pompes et donc de la résistance des cellules tumorales au traitement pourrait être induite par le stroma (Tableau 4).

Rafii *et al*. ont montré que les Hospicells (assimilés aux CA-MSC, isolées de patientes atteintes d'un cancer ovarien) pouvaient interagir directement avec les cellules épithéliales cancéreuses ovariennes. Ils ont démontré que les Hospicells sont spécifiquement associées aux cellules tumorales *via* leurs pseudopodes, par contact membranaire sur une grande surface, et à travers des jonctions serrées comme les desmosomes. Les auteurs ont étudié le rôle potentiel de ces Hospicells dans la chimiorésistance et ont découvert que la co-culture entre Hospicells et cellules épithéliales cancéreuses ovariennes induisait un profil chimio-résistant des cellules tumorales, par l'intermédiaire d'un contact direct cellule-cellule[89]. Ils proposent plusieurs mécanismes responsables de l'acquisition de la chimiorésistance par les cellules cancéreuses, y compris le transfert de molécules par des jonctions gap ou le couplage par des interactions ligand-récepteur. L'analyse morphologique par microscopie électronique des interactions entre CA-MSC et cellules cancéreuses a finalement amené les auteurs à suggérer l'apparition de «synapses oncologiques» (également appelées trogocytose oncologique) comparables aux «synapses immunologiques». Ces interactions ont induit la capture de morceaux de membranes des Hospicells au niveau de la surface des cellules cancéreuses dans un processus actif appelé trogocytose. Ce transfert de protéines membranaires a conduit les cellules tumorales à acquérir de nouvelles protéines à leur surface,

en particulier des protéines MDR, et ainsi de présenter de nouvelles propriétés. Les auteurs ont observé que ces échanges ont permis l'acquisition par les cellules tumorales ovariennes de protéines MDR et de la Pgp, exprimées initialement par les CA-MSC (Hospicells). La co-culture avec ces CA-MSC (Hospicells) a conduit à une augmentation de la résistance des cellules tumorales ovariennes au paclitaxel et au carboplatine. Le blocage des pompes d'efflux a restauré la sensibilité au paclitaxel et au carboplatine[89]. Cette augmentation de protéines MDR semble nécessiter un échange membranaire, soit par contact direct cellule-cellule, soit par l'intermédiaire d'exosomes (cf partie exosomes I) D) 2) g) )[104].

Lis *et al*. ont démontré des changements du profil transcriptomique induits par les MSC sur les cellules cancéreuses[87,105]. Les auteurs ont réalisé un tri cellulaire et une analyse transcriptomique sur des co-cultures de deux lignées cellulaires différentes de cancer de l'ovaire avec des MSC. Après 24 heures, les mono ou co-cultures ont été traitées pendant 24 heures supplémentaires avec du cisplatine à 90 µM et du paclitaxel à 6 nM. Ils ont constaté que les cellules cancéreuses ovariennes OVCAR-3 présentaient des niveaux accrus de « growth arrest and DNA damage » (GADD)[87], dont la carence est connue pour augmenter la sensibilité cellulaire à l'irradiation par des UV ou au cisplatine[106,107]. Cette interaction induit également une augmentation de la transcription de « DNA-damage-inducible transcript 3 » (*DDIT3*), qui peut moduler la régulation de la glycoprotéine P (Pgp)[108]. Dans une autre lignée cellulaire (SKOV-3), les MSC induisaient une variation de l'expression de la fibronectine impliquée dans la résistance au paclitaxel[87].

Les protéines MDR ne sont pas les seules à être potentiellement impliquées dans la résistance aux traitements anticancéreux. Pillozzi *et al*. ont observé une augmentation de l'expression du gène lié à l'éther-à-go-go humain 1 (*ERG1*) à la surface des cellules de LAL lorsqu'elles étaient associées à des MSC. Ces canaux hERG1 semblent jouer un rôle important dans l'acquisition de résistance à la doxorubicine, à la prednisone et au méthotrexate par les cellules tumorales. En effet, l'utilisation de molécules bloquant ces canaux a diminué l'effet chimioprotecteur des MSC[109] (Tableau 4).

Tableau 4: Différents mécanismes de chimiorésistance des cellules tumorales nécessitant un contact direct avec les MSC

## Mécanismes de résistance impliquant un contact direct cellule/cellule

| Mécanismes de résistance | Facteurs secrétés et/ou contact cellule /cellule | Mécanismes de résistance dans les cellules stromales | Mécanismes de résistance dans les cellules tumorales | Cellules stromales utilisées | Origine des cellules tumorales utilisées | Médicaments | Références |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Expression de protéines MDR** | co-culture | Expression de protéines MDR | Acquisition de protéines MDR par trogocytose oncologique | Hospicells | Cellules cancéreuses ovariennes | carboplatine, paclitaxel | Rafii *et al.*[89] |
| **Augmentation de l'expression de hERG1** | co-culture | | Augmentation de l'expression de CXCR4 Augmentation de l'expression de hERG1, Activation des voies de signalisation impliquant PI3K/Akt et ERK1/2 | BM-MSC humaines immortalisées par hTERT | Cellules de LAL | doxorubicine, prednisone, méthotrexate | Pillozzi *et al.*[109] |
| **Résistance aux anticorps médiée par l'adhésion cellulaire** | co-culture | | Expression de VLA4 | HS-5 | Lymphome à cellules B | rituximab, doxorubicine | Mraz *et al.*[110] |
| **Voie de signalisation NF-κB** | co-culture | | Augmentation de RelB nucléaire | BM-cellules stromales humaines* | Cellules de LLC | fludarabine | Xu *et al.*[111] |
| **Voie de signalisation Wnt** | co-culture | Expression de ligands de la voie Wnt | Diminution du clivage de Bcl-2, Augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la voie Wnt | BM-MSC humaines immortalisées par hTERT | Cellules de LAL | cytarabine | Yang *et al.*[112] |
| **Modification du profil transcriptomique** | co-culture | | Modification du profil transcriptomique dans des gènes impliqués dans la chimiorésistance : Augmentation de la transcription des gènes *DDIT3*, *ATF2*, *RASGRP1* et Diminution de la transcription du gène de *BTG2* | BM-MSC de donneurs sains | Cellules cancéreuses ovariennes | | Lis *et al.*[87] |
| **Inconnu** | co-culture | | | BM-MSC humaines immortalisées par hTERT | Cellules LMC | imatinib, nilotinib, dasatinib | Zhang *et al.*[113] |
| **Inconnu** | co-culture | | | BM-MSC de patients volontaires de chirurgie orthopédique | Cellules de carcinome épidermoïde de la tête et du cou | paclitaxel | Scherzed *et al.*[114] |
| **Inconnu** | co-culture | | | BM-MSC | Cellules cancéreuses ovariennes | carboplatine | Lis *et al.*[105] |

BM-cellules stromales∗, probablement des BM-MSC: cellules ayant la morphologie de MSC et positives pour le marqueur de surface CD54.

### *b) Résistance aux médicaments induite par l'adhérence cellulaire*

L'adhérence intercellulaire par des protéines comme VCAM1 et l'intégrine béta 1 joue un rôle dans la résistance aux traitements[115]. L'adhérence des cellules tumorales de myélome à la fibronectine se fait spécifiquement par le VLA4 (Very late antigen 4), appelé également intégrine alpha4 béta1[76]. VLA4 permet l'adhérence des cellules tumorales à la fibronectine et à VCAM1 qui sont responsables de la résistance aux médicaments induite par l'adhérence cellulaire (cell adhesion-mediated drug resistance; CAM-DR)[116]. Cette CAM-DR est responsable par exemple de la résistance au tipifarnib, qui est un inhibiteur de farnésyl transférase[117]. Ce mécanisme a été montré lors de la co-culture de cellules de myélome multiple (MM) avec des cellules stromales de moelle osseuse[117]. Dans les cellules de MM, Sanz-Rodriguez *et al*. ont mis en évidence une up-régulation de VLA4 induite par SDF-1. Ainsi, comme le SDF-1 peut être sécrété par les MSC (cf partie SDF-1 I) D) 2) a) ), ces cellules pourraient être responsables d'une augmentation de l'expression de VLA4 dans les cellules tumorales conduisant à une augmentation de leur résistance à certains traitements. De manière comparable à la CAM-DR, Mraz *et al*. ont pu mettre en évidence un mécanisme de CAM-AR (cell adhesion-mediated antibody resistance) induit par des cellules stromales. Dans leurs expériences, ils ont montré que les cellules stromales isolées de moelle osseuse protégeaient les cellules de lymphome B de l'apoptose induite par le rituximab, nommée CAM-AR mais aussi de l'apoptose induite par la doxorubicine, CAM-DR[110]. L'utilisation d'un anti-VLA4, le natalizumab, diminue de façon importante l'adhérence des lymphocytes B à la fibronectine et réverse partiellement l'effet chimio-protecteur contre la doxorubicine et le rituximab des cellules stromales de moelle osseuse sur les cellules de lymphome B (Tableau 4).

### *c) Acquisition de la résistance via l'activation de la voie NF-κB*

Le facteur de transcription NF-κB est impliqué dans l'inflammation et dans divers processus physiologiques telles que la régulation de la prolifération cellulaire, l'apoptose et la transduction de la signalisation cellulaire. Dans de nombreux cancers, cette voie joue un rôle important dans la tumorigénèse et peut également protéger les cellules cancéreuses de la chimiothérapie et de la radiothérapie[118]. L'activation de cette voie peut induire une résistance aux médicaments aussi bien pour les cancers solides comme le cancer du sein[119,120] que pour les cancers hématologiques[121]. L'activité constitutive de NF-κB/Rel a été démontrée dans plusieurs hémopathies malignes. En relation avec cela, une autre voie activée par NF-κB implique la protéine RelB, dont l'activité est corrélée avec le stade de LLC selon la classification de Binet[111]. Les cellules B de LLC RelA+/RelB+ sont plus résistantes à l'apoptose que les cellules RelA+/RelB-. Au cours de la culture avec des cellules stromales issues de moelle osseuse (probablement pas seulement des BM-MSC mais aussi des fibroblastes et des macrophages), une augmentation de la quantité de RelB est observée dans le noyau des cellules cancéreuses. De plus, la co-culture avec des cellules stromales augmente

la résistance des cellules B de LLC à la fludarabine. RelB pourrait donc être impliquée dans la résistance des cellules tumorales à la fludarabine induite par les cellules stromales[111] (Tableau 4).

### *d) Acquisition de la résistance via l'activation de la voie (Wnt)/β-catenine*

La voie « wingless-type MMTV integration site family » (Wnt)/β-catenine joue un rôle important dans de nombreux processus cellulaires, y compris le développement et le maintien de l'homéostasie tissulaire chez l'adulte. En l'absence d'activation de la voie Wnt, la β-caténine s'associe à un complexe protéique (le complexe cadhérine-caténine), conduisant à son ubiquitination et sa dégradation[122]. L'activation de la voie Wnt inhibe ce complexe et stabilise la β-caténine, permettant sa translocation au niveau du noyau pour remplir son rôle de co-activateur transcriptionnel. Cette voie régule l'expression de nombreux gènes impliqués, entre autres, dans la prolifération, la différenciation, la survie et la polarité cellulaire[123,124]. Par conséquent, et sans surprise, le dysfonctionnement de la voie Wnt/β-caténine peut conduire à des maladies tels que la fibrose, des maladies neurodégénératives et le cancer[124]. Dans les cellules cancéreuses, la voie Wnt/β-caténine est capable de moduler la migration cellulaire, les processus d'invasion et la prolifération[123]. Elle régule également les gènes impliqués dans l'apoptose et participe à la résistance de certains cancers à la chimiothérapie.

Les MSC peuvent activer cette voie conduisant à la protection des cellules tumorales contre les traitements anti-tumoraux (Tableau 4). Yang *et al*. ont montré que les BM-MSC (lignées cellulaires de MSC humaines, HS-5, et murines, M2-10B4) protégeaient les cellules de LAL contre l'apoptose induite par la cytarabine[112]. Une analyse par qRT-PCR montrait la transcription en ARNm de 16 ligands de la voie de signalisation Wnt dans les MSC. En utilisant des microarrays pour étudier les profils d'expression génique, ils ont observé une augmentation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la voie Wnt (lymphoid enhancer-binding factor 1 (*LEF1*), *MYC* (codant pour un facteur de transcription), cyclin D-type binding-protein 1 (*CCNDBP1*)) dans les cellules de LAL co-cultivées avec des MSC par rapport à des cellules leucémiques cultivées seules. De plus, Xia *et al*. ont montré que la co-culture avec les MSC entraînait une résistance des cellules de LAM à l'apoptose induite par le traitement par la mitoxantrone[125]. L'adhésion aux MSC conduit, dans les cellules de LAM, à une augmentation de l'expression de la protéine c-Myc. La résistance à la mitoxantrone des cellules de LAM n'a pas été observée dans le système en transwell, ce qui démontre la nécessité d'un contact direct cellule-cellule pour que les cellules de LAM acquièrent une résistance[126]. Le ciblage de la voie Wnt semble une alternative intéressante pour prévenir l'effet chimioprotecteur des MSC sur les cellules tumorales. L'utilisation d'un inhibiteur de la β-caténine, impliquée dans la voie Wnt, réduit la résistance, induite par les MSC, de cellules de LAL à la cytarabine, observée *in vitro,* mais permet également de potentialiser son action *in vivo*[112]. L'inhibition de c-Myc en utilisant un siRNA ou un inhibiteur de c-Myc, augmente l'apoptose induite par la mitoxantrone et empêche l'effet chimioprotecteur induit par les MSC dans les cellules de LAM[125].

### *e) Effet des MSC sur la transcription de gènes impliqués dans la résistance au traitement au sein des cellules tumorales*

Les MSC peuvent modifier le profil de transcription des gènes qui prédisent la réponse à certains traitements. Les interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement font partie d'un processus important conduisant à la modification du microenvironnement vers un contexte pro-tumoral (Fig. 2). Les cellules du microenvironnement, y compris les MSC, peuvent alors modifier le phénotype des cellules tumorales, qui seraient alors capables de présenter des changements dans leurs capacités prolifératives, migratoire et métastatique, et d'acquérir une résistance accrue aux traitements[13,84–87,127–129]. En effet, la co-culture de BM-MSC avec des cellules tumorales ovariennes conduit à une modification du profil transcriptomique des cellules tumorales. Les cellules tumorales ovariennes sur-expriment alors les gènes impliqués dans la résistance à de nombreux médicaments antitumoraux (Tableau 4). Ainsi, en présence de BM-MSC, Lis *et al*. ont observé une transcription accrue du gène « activating transcription factor 2 » (*ATF2*) dans les cellules tumorales ovariennes[87]. L'ATF2 est un facteur de transcription impliqué dans les lésions de l'ADN[130]. Il peut induire une résistance aux traitements entraînant des dommages à l'ADN, comme le cisplatine ou l'étoposide, dans des cellules de cancer du sein ou de cancer du poumon non à petites cellules[131]. Il induit également une résistance à la radiothérapie dans les cellules de mélanome[132]. Lis *et al*. ont également observé une augmentation de la transcription du gène « RAS guanyl releasing protein 1 » (*RASGRP1*), qui, lorsqu'il est sur-exprimé, peut provoquer une résistance à l'inhibiteur de MEK[133], et une diminution de la transcription du gène « B-cell translocation gene 2 » (*BTG2*), dont la perte est prédictive de la résistance au tamoxifène[134]. En somme, ces résultats démontrent que l'interaction des cellules tumorales avec les MSC conduit à la transcription de gènes impliqués dans la résistance aux traitements dans les cellules tumorales (Tableau 4).

### *f) Arrêt du cycle cellulaire, état de quiescence*

Une des causes de la chimiorésistance de certaines cellules tumorales et de la récidive tumorale, est la présence de cellules tumorales dans un état de quiescence. En effet, la plupart des molécules cytotoxiques, en particulier les plus anciennes, ciblent des cellules à multiplication rapide telles que les cellules tumorales. Cependant, l'hétérogénéité cellulaire, caractéristique des tumeurs, permet à certaines cellules cancéreuses d'échapper aux traitements cytotoxiques, en particulier celles en état de quiescence, ou avec un taux de multiplication lent. Ces cellules présentent un potentiel de récidive quand elles rentrent dans le cycle cellulaire. L'état de quiescence peut être induit par des signaux externes, en particulier ceux émis par le microenvironnement tumoral. Les MSC peuvent modifier la croissance des cellules tumorales ou provoquer un blocage de ces cellules dans la phase G0 / G1 du cycle cellulaire, ce qui entraîne une sensibilité réduite à la chimiothérapie (Tableau 5).

Nefedova *et al*. ont observé l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules de myélome lors de leur contact direct avec des cellules stromales (telles que des BM-MSC: cellules ayant la morphologie de MSC et étant positives pour le marqueur de surface CD54)[135]. Ils ont également observé une augmentation parallèle de la résistance à la mitoxantrone (inhibiteur de la topoisomérase II), avec une diminution d'environ 50% de cellules en apoptose lorsque les cellules de myélome adhéraient sur des cellules stromales par rapport à celles cultivées seules en suspension. Cette résistance n'était pas due à une diminution de l'entrée de médicaments dans les cellules mais plutôt à l'arrêt du cycle cellulaire. Cet arrêt du cycle pourrait être induit par la sur-expression de l'inhibiteur de « cyclin-dependent kinase » (CDK) $p21^{WAF1}$, qui se lie et inhibe l'activité des complexes cycline/CDK conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. L'inhibiteur de CDK $p27^{Kip1}$, connu pour se lier au complexe cycline E/CDK2 conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire, pourrait également être impliqué. Les MSC peuvent altérer l'expression de $p21^{WAF1}$ et de $p27^{Kip1}$. La sur-expression de ces protéines empêche le passage de la phase G1 à la phase S et provoque donc un blocage du cycle cellulaire[135]. Lwin *et al*. ont observé que l'adhérence des cellules de lymphome du manteau et de lymphome non hodgkinien sur les BM-MSC (HS-5) induisait un arrêt du cycle cellulaire en phase G1[136] par sur-expression des protéines $p21^{WAF1}$ et $p27^{kip1}$. Ces protéines sont régulées au niveau post-transcriptionnel par « S-phase kinase-associated protein 2 » (SKP2), une sous-unité de l'ubiquitine ligase Skp, Cullin, F-box containing complex ($SCF^{Skp2}$). Une diminution de cette ubiquitine ligase conduit à une augmentation de l'expression de $p21^{WAF1}$ et $p27^{kip1}$, conduisant finalement à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. De même, Wei *et al*. ont montré que la culture de cellules de LMC en présence de BM-MSC (que ce soit avec contact direct cellule-cellule (co-culture) soit sans contact direct (système de transwell)) ou en présence de milieu conditionné (MC) par des MSC, induisait une réduction de la prolifération des lignées cellulaires de LMC avec une augmentation du pourcentage de cellules en phase G0 / G1 par rapport aux lignées cellulaires de LMC cultivées seules[137]. Cette inhibition de la prolifération induite par les MSC pourrait jouer un rôle dans la résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose. En effet, la co-culture avec des MSC provoque une diminution du pourcentage de cellules tumorales en apoptose (induite par une privation en sérum) par rapport aux cellules cultivées seules. Le mécanisme à l'origine de cette résistance apoptotique induite par les MSC dans les cellules leucémiques pourrait impliquer l'induction par des MSC d'un état cellulaire proche de la quiescence[137]. Cet effet des MSC sur la régulation du cycle cellulaire des cellules tumorales pourrait être présent dans de nombreux autres cancers. En effet, Ramasamy *et al*. ont observé un arrêt du cycle cellulaire induit par des MSC dans les cellules tumorales d'origine hématopoïétique et non hématopoïétique[138]. Dans cette expérience, la co-culture des cellules cancéreuses avec les BM-MSC a entraîné une réduction de l'apoptose des cellules tumorales en bloquant les cellules tumorales dans la phase G1. Bien que le plus grand effet ait été obtenu par co-culture, l'effet antiprolifératif est dû, au moins en partie, à la sécrétion de facteurs solubles[138]. Des preuves d'un arrêt induit par les MSC en phase G1 impliquant la voie de signalisation Notch ont été présentées par Nefedova *et al*. Cette équipe a utilisé des cellules stromales de moelle osseuse (BM-MSC, fibroblastes et macrophages) de cinq patients exprimant les ligands de la voie Notch, Jagged-1 et delta-1[139]. La co-culture de ces cellules stromales avec des cellules de myélome a induit l'activation de la voie Notch et la résistance au melphalan et à la mitoxantrone. Toutes les lignées de cellules de

myélome évaluées exprimaient Notch-1, sauf une. Les cellules qui n'exprimaient pas Notch-1 mais qui exprimaient Notch-2 et Notch-3 n'ont pas acquis cette résistance. L'addition de peptide Jagged-1 aux cellules de myélome exprimant Notch-1 a également induit cette résistance aux médicaments[140]. Cette activation de Notch-1 associée à la résistance aux médicaments s'accompagne d'un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 et d'une augmentation de l'expression de $p21^{WAF1}$. Ainsi, l'arrêt en phase G1 semble donc induire la présence de cellules quiescentes, difficiles à éliminer par des médicaments cytotoxiques, en particulier ceux agissant sur des cellules se divisant rapidement. En utilisant un autre modèle (LLC), Nwabo Kamdje *et al*. ont montré que les BM-MSC pouvaient réguler et soutenir la survie des cellules de LLC traitées par différentes molécules chimiothérapeutiques tels que le cyclophosphamide, la fludarabine et la bendamustine, ainsi que des corticostéroïdes comme la prednisone et l'hydrocortisone[140,141]. Pour étudier le rôle de la signalisation Notch dans cette chimiorésistance induite par les BM-MSC, ils ont réalisé une co-culture de cellules de LLC et de BM-MSC et ont appliqué des chimiothérapies en présence ou en l'absence d'une combinaison d'anticorps anti-Notch-1, Notch 2 et Notch-4 ou des anticorps inhibiteurs de γ-secrétase XII (XII GSI), permettant d'inhiber la chimiorésistance observée en 3 jours. Ils ont montré que la signalisation *via* Notch avait un rôle direct dans la survie cellulaire des LLC. La présence de BM-MSC, qu'elles soient d'origine allogénique ou autologue, amplifiait le phénomène et induisait un effet anti-apoptotique. L'activation de la voie de signalisation de Notch était observée lors du contact entre les BM-MSC et les cellules de LLC. Les deux types de cellules exprimant les récepteurs et les ligands de la voie Notch, Notch-1, -2 et -4, se sont avérés être impliqués dans la chimiorésistance à l'apoptose induite lors de contacts directs entre les cellules de LLC et des BM-MSC. Cet effet pourrait impliquer au moins en partie Bcl-2, NF-κB et des mécanismes dépendants de p53[141]. Bien que le contact étroit entre les cellules de LLC et les BM-MSC soit véritablement associé à l'acquisition de la chimiorésistance, des facteurs solubles libérés par des MSC, tels que l'IL-7 et le VEGF, pourraient également être impliqués dans ce phénomène[135,139–141].

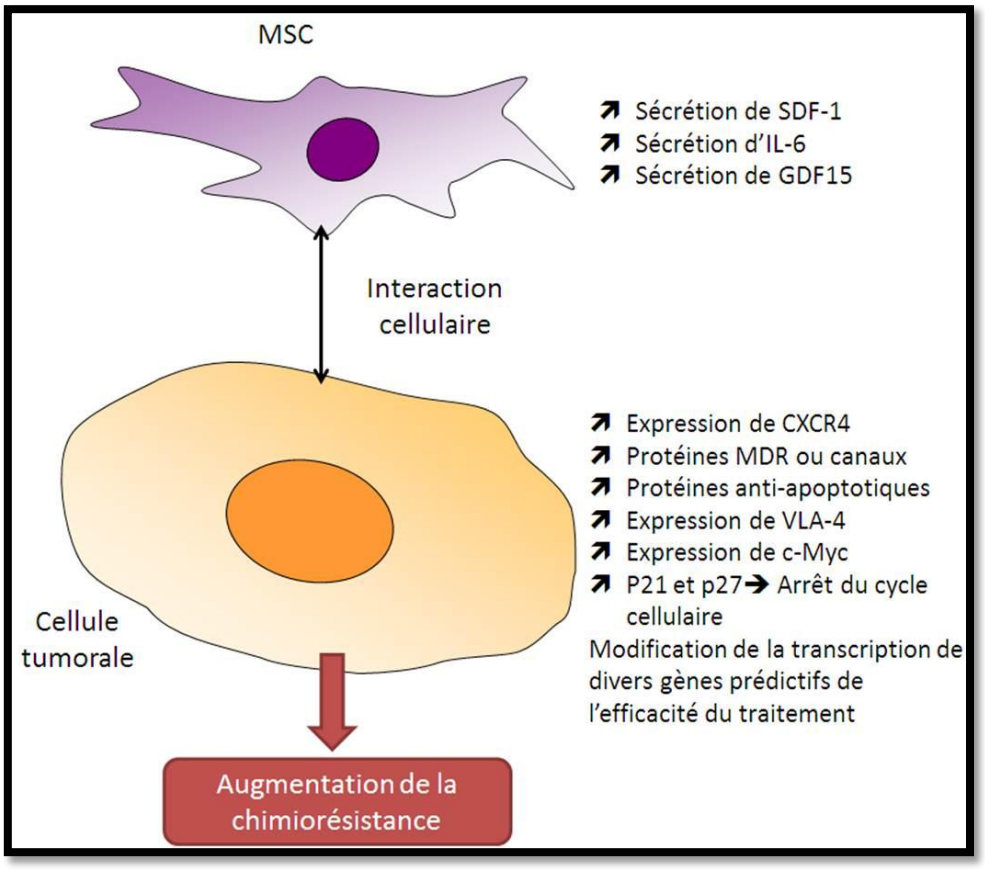
Tableau 5: Résistance des cellules tumorales induite par les MSC par arrêt du cycle cellulaire

| Arrêt du cycle cellulaire | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Facteurs secrétés et/ou co-culture** | **Mécanismes de résistance dans les cellules stromales** | **Mécanismes de résistance dans les cellules tumorales** | **Cellules stromales utilisées** | **Origine des cellules tumorales utilisées** | **Médicaments** | **Références** |
| Co-culture | | Arrêt du cycle cellulaire | Cellules stromales dérivées de BM de donneurs sains | Cellules de myélome | mitoxantrone | Nefedova *et al.*[135] |
| Co-culture | Expression des ligands de la voie Notch: Jagged-1 and Delta-1 | Expression de Notch-1, augmentation de l'expression de p21, arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 | Cellules stromales dérivées de BM de donneurs sains | Cellules de myélome | melphalan, mitoxantrone | Nefedova *et al.*[139] |
| Co-culture | | Surexpression de p21 et p27, arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 | HS-5 | Cellules de lymphome | | Lwin *et al.*[136] |
| Facteurs sécrétés | | arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1, augmentation de la phosphorylation de BAD et AKT | BM-MSC de patients de LLC, LMC et LAM | Cellules de LMC | | Wei *et al.*[137] |
| Co-culture et facteurs sécrétés | | Arrêt du cycle cellulaire en phase G1 | BM-MSC de donneurs sains | Lignée cellulaire immortalisée de lymphocytes T humains, cellules d'adénocarcinome colique, cellules tumorales pulmonaires, cellules B, cellules de LAM et LMC | | Ramasamy *et al.*[138] |
| Co-culture | Expression des ligands de la voie Notch: Jagged-1/-2, Delta like ligands-1/-3/-4 | Expression de Notch-1/-2/-4 | BM-MSC de patients atteints de LLC et de donneurs sains | Cellules de LLC | fludarabine, cyclo-phosphamide, bendamustine | Nwabo Kamdje *et al* [141] |

### 2) Mécanismes de résistance liés à la sécrétion de facteurs solubles

De nombreux facteurs ont été identifiés dans le microenvironnement des tumeurs, et nombre d'entre eux sont décrits comme ayant des propriétés pro-tumorales. Ainsi, certaines de ces molécules pourraient être associées à l'acquisition de chimiorésistance, comme des facteurs solubles tels que l'IL-6, l'IL-8 et le SDF-1. Les cellules tumorales et les cellules stromales, y compris les MSC, sécrètent de nombreux facteurs.

Figure 1 : Les interactions entre les cellules tumorales et les MSC modifient le phénotype de ces deux types cellulaires conduisant à une augmentation de la chimiorésistance tumorale




### *a) Acquisition de résistance impliquant l'axe SDF-1 / CXCR4*

Un des facteurs pertinents dans la chimiorésistance des cellules tumorales induite par les MSC est le stromal cell-derived factor 1(SDF-1), également appelé « chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL12) ». Le SDF-1 se lie à son récepteur, « chemokine (C-X-C motif) receptor 4 » (CXCR4), qui est exprimé par les cellules tumorales. La voie de signalisation de SDF-1 / CXCR4 est impliquée dans le « homing » des cellules de LMC dans la moelle osseuse[96]. Le niveau d'expression de CXCR4 sur des cellules tumorales est corrélé au degré de chimiotactisme induit par SDF-1 ou par des cellules stromales[142]. Corcoran *et al*. ont montré que les lignées de cellules tumorales de sein (MCF-7, T47D et MDA-MB-231), ont une expression de CXCR4 supérieure à celle des lignées de cellules mammaires non tumorales (MCF12A)[143]. Le Knockdown par siRNA de CXCR4 sur les cellules tumorales mammaires réduit leur migration vers les MSC et leur adhérence sur les MSC. Des résultats similaires sont obtenus lors d'un knockdown par siRNA de SDF-1 dans les MSC. L'intérêt de cette voie en oncologie a donc conduit la mise en place d'un nombre croissant d'études consacrées au rôle de l'axe SDF-1 / CXCR4 sur la chimiorésistance (Tableau 6).

Les MSC, par elles-mêmes, sont capables d'induire une sur-expression de CXCR4 à la surface de cellules tumorales. En effet, les BM-MSC provenant de donneurs sains, lorsqu'elles sont injectées dans des souris, sont capables d'interagir avec des cellules tumorales conduisant à la sur-expression de CXCR4[103,109,144,145].

Dans un modèle *in vitro* de LMC, la co-culture de BM-MSC avec des cellules tumorales a induit une résistance à l'imatinib[103,144]. Puisque des niveaux similaires de chimiorésistance des cellules leucémiques ont été obtenus avec le milieu conditionné (MC) par les MSC, cet effet était lié à la sécrétion de facteurs solubles. Cette chimiorésistance était concomitante à l'augmentation de l'expression de CXCR4 dans des cellules tumorales. De plus, cette augmentation de CXCR4 a également été observée dans les cellules tumorales ovariennes (CTO) co-cultivées avec des BM-MSC provenant de donneurs sains ou avec des CA-MSC isolées soit d'ascite de patientes présentant un adénocarcinome ovarien[145] soit du sang de patients atteints de LAL[109].

Kim *et al*. ont montré que les BM-MSC de patients atteints de LAM sécrètent plus de SDF-1 que celles provenant de donneurs sains[146]. Cette augmentation de la sécrétion de SDF-1 est corrélée à l'augmentation de la résistance à la cytarabine présentée par les cellules leucémiques co-cultivées avec des MSC issues de patients atteints de LAM. Cet effet n'a pas été observé lorsque des MSC provenaient de donneurs sains. Lis *et al*. ont démontré la résistance des cellules tumorales ovariennes à l'hyperthermie à 42°C (une thérapie utilisée en association avec la chimiothérapie dans le traitement du cancer des ovaires) induite par les BM-MSC et les CA-MSC (Hospicells)[145]. La co-culture de MSC avec des CTO ou à l'aide de systèmes de transwell a montré que la résistance des cellules tumorales à l'hyperthermie ne nécessite pas d'interaction directe cellule-cellule[145]. Cela indiquait que les facteurs sécrétés par les BM-MSC sont impliqués dans la résistance des cellules cancéreuses à l'hyperthermie. Le SDF-1 pourrait être un bon candidat permettant la médiation de cet effet car l'incubation des CTO avec le SDF-1 augmente leur résistance au traitement par hyperthermie.

Le SDF-1 sécrété par les cellules stromales peut réguler la chimiorésistance par différents mécanismes. Il pourrait activer la voie de signalisation PI3K/Akt (Fig. 1), ou agir par une uprégulation de VLA4 dans les cellules de MM. Cette intégrine sert d'intermédiaire à l'adhésion à la fibronectine et à la VCAM-1[116], toutes deux impliquées dans la résistance aux médicaments médiée par adhésion cellulaire (voir partie I) D) 1) b)).

La protéine de fusion $p210^{BCR\text{-}ABL}$ (une protéine de fusion de 210 kDa obtenue après juxtaposition du gène *ABL* à une partie du gène *BCR*) résultant de la translocation (9; 22) est retrouvée chez presque tous les patients atteints de LMC. Cette protéine kinase anormalement produite diminue la migration de cellules tumorales vers les MSC médiée par la voie SDF-1 / CXCR4[147]. Elle est régulée par l'ITK, l'imatinib, qui restaure la migration des cellules de LMC vers le SDF-1. Jin *et al*. ont montré que les cellules de LMC (KBM-5) avaient acquis une résistance à l'apoptose médiée par l'imatinib lorsqu'elles étaient cultivées en présence de MSC. L'addition d'un inhibiteur de CXCR4 a augmenté de manière significative l'inhibition, induite par l'imatinib, de la croissance tumorale et de l'apoptose des cellules KBM-5 en présence de MSC[103].

De façon similaire, une mutation de Fms-like tyrosine kinase-3 (*FLT3*) a été décrite dans la LAM et était associée à un mauvais pronostic. Kojima *et al*. ont montré que les MSC pourraient être impliquées dans la résistance au traitement par un anti-FLT3 ou par la doxorubicine *via* la sécrétion de SDF-1[148].

Le blocage de la voie de signalisation de SDF-1/CXCR4, soit en ciblant le ligand SDF-1, soit en ciblant le récepteur CXCR4, semble intéressant pour contrecarrer cette résistance induite par le microenvironnement. Concernant SDF-1, Hoellenriegel *et al*. ont utilisé des oligonucléotides d'ARN dans une configuration L dirigés contre SDF-1 dans un modèle *in vitro* utilisant des cellules de LLC. Ils ont montré que le ciblage de SDF-1 rendait des cellules tumorales, co-cultivées avec des lignées cellulaires stromales murines MS-5 (probablement des BM-MSC avec une morphologie mésenchymateuse et capables de se différencier en adipocytes[149]), sensibles à un traitement combinant fludarabine et bendamustine[150], inhibant ainsi l'effet chimioprotecteur des BM-MSC vis-à-vis de la fludarabine et de la bendamustine[141].

Concernant le récepteur CXCR4, un de ses antagonistes, l'AMD3100, favorise l'apoptose, induite par la caspase 3, de cellules de leucémie traitées avec de l'imatinib, même lors de co-culture avec des BM-MSC[151]. Cet antagoniste a permis à la fois *in vitro* et *in vivo*, l'inversion de la résistance au carboplatine induite par les MSC dans les cellules cancéreuses du sein, à travers l'augmentation de la caspase 3 et la diminution de la viabilité cellulaire[151]. D'autres inhibiteurs de CXCR4, tels que le polypeptide RCP168 ou une petite molécule non peptidique AMD3465, ont partiellement inversé la résistance induite par des cellules stromales à la cytarabine dans des cellules leucémiques[142]. Le blocage du récepteur CXCR4 avec un anticorps monoclonal a également inversé la résistance à la chaleur induite par les BM ou les CA-MSC. Dans ce cas, l'inhibition de CXCR4 a induit une diminution de la phosphorylation d'Akt dépendante de SDF-1.

Toutefois, une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL a été observée dans des co-cultures de cellules tumorales et de MSC. L'antagoniste de CXCR4, AMD3100, sensibilise les cellules tumorales à l'apoptose après un traitement anti-tumoral, sans pourtant modifier l'expression de Bcl-xL induite par les MSC dans les cellules tumorales[144]. La voie de signalisation SDF-1 / CXCR4 ne semble donc pas être impliquée dans l'expression accrue de Bcl-xL dans les cellules tumorales. Les MSC semblent donc conférer une chimioprotection non seulement par leur action sur la voie SDF-1 / CXCR4, mais également par d'autres mécanismes responsables de l'augmentation de l'expression et de l'activité des protéines anti-apoptotiques tel que Bcl-xL dans les cellules tumorales.

Tableau 6: Résistance des cellules tumorales induite par les MSC via la voie de signalisation SDF-1/CXCR4

| La voie de signalisation SDF-1/CXCR4 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Facteurs secrétés et/ou co-culture** | **Mécanismes de résistance dans les cellules stromales** | **Mécanismes de résistance dans les cellules tumorales** | **Cellules stromales utilisées** | **Origine des cellules tumorales utilisées** | **Médicaments** | **Références** |
| Co-culture | | Augmentation de l'expression de CXCR4, Augmentation de l'expression de Bcl-xL | BM-MSC de donneurs sains | Cellules de LMC | imatinib | Vianello *et al.*[144] |
| Facteurs sécrétés | | Augmentation de l'expression de CXCR4 | BM-MSC de donneurs sains | Cellules de LMC | imatinib | Jin *et al.*[103] |
| Facteurs sécrétés | | Augmentation de l'expression de CXCR4 | BM-MSC humaines, Hospicells | Cellules tumorales ovariennes | hyperthermie | Lis *et al.*[145] |
| Co-culture | | Augmentation de l'expression de CXCR4, Augmentation de l'expression de hERG1, Activation des voies de signalisation impliquant PI3K/AKT and ERK1/2 | BM-MSC humaines immortalisées par hTERT | Cellules de LAL | doxorubicine prednisone méthotrexate | Pillozzi *et al.*[109] |
| Co-culture | Augmentation de la sécrétion de SDF-1 | | BM-MSC de patients atteints de LAM | Cellules de LAM | cytarabine | Kim *et al.*[146] |
| Facteurs sécrétés | Sécrétion de SDF-1 | Augmentation de l'expression de Survivine, Bcl-xL et Mcl-1 | BM-MSC de donneurs sains et de patients atteints de LAM | Cellules de LAM | anti-FLT3, doxorubicine | Kojima *et al.*[148] |
| Facteurs sécrétés | Sécrétion de SDF-1 | | MS-5 | Cellules de LLC | bendamustine fludarabine | Hoellenriegel *et al.*[150] |
| Co-culture | | Expression de CXCR4 | BM-MSC | Cellules tumorales de sein | carboplatine | Greco *et al.*[151] |
| Co-culture | | Corrélation entre l'expression de CXCR4 et le chimiotactisme, phosphorylation d'AKT par addition de SDF-1 | MS-5 | Lignée cellulaire immortalisée de lymphocytes T humains | cytarabine | Zeng *et al.*[142] |

### *b) Acquisition de la résistance impliquant la sécrétion d'IL-6 par les MSC*

La cytokine pro-inflammatoire IL-6 est sécrétée par de nombreux types cellulaires dont les cellules immunitaires (cellules B, cellules T et macrophages), les cellules stromales (par exemple, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les ostéoblastes et les MSC) et les cellules tumorales. Grâce à ses effets pléiotropes, telle que l'induction de la synthèse d'autres molécules inflammatoires (par exemple, la protéine C-réactive, le VEGF, le facteur de croissance des fibroblastes (FGF)-2), l'IL-6 est impliquée dans divers processus physiologiques comprenant l'hématopoïèse, la reproduction et l'inflammation. Elle est également impliquée dans de nombreuses maladies, y compris celles du système immunitaire et des cancers[152]. L'IL-6 se lie à son récepteur, qui peut être soluble ou localisé au niveau de la membrane cellulaire. Cette liaison conduit à la dimérisation de la gp130 puis la

phosphorylation et l'activation des kinases associées aux récepteurs: janus kinase (JAK) 1, JAK2 et tyrosine kinase (Tyk) 2. Cette activation conduit à son tour à la phosphorylation et à l'activation de « signal transducer and activator of transcription» (STAT) 3, qui favorise la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose. Pour cette raison, l'IL-6 est considérée comme un facteur de croissance pour les cellules cancéreuses dont les cellules de MM[153].

En plus de son rôle pro-tumoral, l'IL-6 joue un rôle important dans la résistance aux médicaments. Frassanito *et al*. ont montré que les cellules de myélome résistantes à la dexaméthasone provenant de patients atteints de MM pouvaient produire de l'IL-6 *via* une boucle autocrine[154]. Cette sécrétion d'IL-6 est associée à une résistance aux médicaments car les cellules de myélome ne produisant pas l'IL-6 sont sensibles à la dexaméthasone. Cette résistance est associée à une diminution de l'apoptose, spontanée et induite par les médicaments, médiée par la voie de signalisation STAT3 qui entraîne une protection contre l'apoptose impliquant FAS[88,97]. Ainsi, l'IL-6 peut protéger les cellules tumorales de l'apoptose et augmenter leur résistance aux agents anti-tumoraux *via* l'expression de protéines anti-apoptotiques tels que Bcl-2, Bcl-xL, survivine et « X-linked inhibitor of apoptosis » (XIAP) et « induced myeloid leukemia cell differentiation protein » (Mcl-1) passant par l'activation de la voie JAK/STAT-3[99–102] (Fig. 1). En effet, l'analyse immuno-histochimique a révélé une augmentation de l'expression de STAT3 et de phospho-STAT3 dans les tumeurs récidivantes, qui sont généralement plus résistantes au traitement, que dans les tumeurs primaires[155].

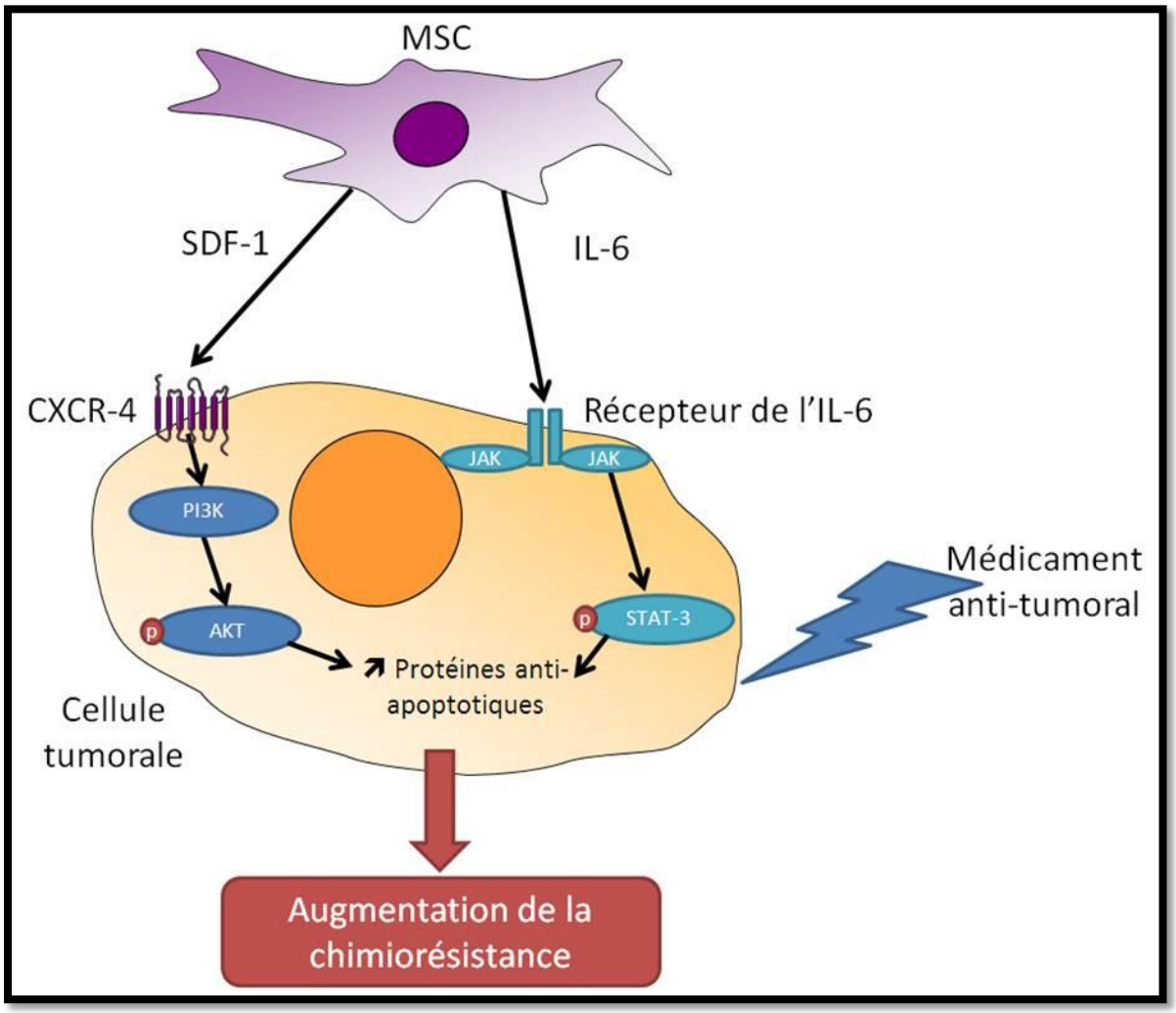
De plus, l'IL-6 a également la capacité d'augmenter l'expression des protéines d'efflux, telles que les protéines de la famille MDR et MRP, impliquées dans la résistance à de nombreuses thérapies[156], appuyant son rôle dans la chimiorésistance. De plus, Shain *et al.* ont montré que l'adhésion des cellules tumorales à la fibronectine entraînait un arrêt du cycle cellulaire de cellules de myélome conférant une résistance à la mitoxantrone et à la doxorubicine. En présence d'IL-6, l'activation de la voie JAK/STAT-3 permet de maintenir la résistance au traitement et permet en plus de ne pas bloquer les cellules dans le cycle cellulaire. Ceci permet donc d'entraîner une chimiorésistance tout en favorisant la progression tumorale[157].

Le ciblage de cette cytokine pourrait donc être une stratégie intéressante dans certains cancers où l'IL-6 est impliquée dans la résistance au traitement. Duan *et al*. ont utilisé des lignées de CTO résistantes au paclitaxel exprimant de manière plus importante phospho-STAT3. L'utilisation de siRNA dirigés contre STAT3 réverse la résistance au paclitaxel des CTO rendues résistantes[99,155]. De même, comparé au paclitaxel seul, l'utilisation d'un inhibiteur de JAK et de STAT3 (AG490) associé au paclitaxel augmente le nombre de cellules en apoptose dans les CTO rendues résistantes au paclitaxel[155].

En résumé, l'IL-6 participe à la résistance de nombreux types de cancers (entre autres MM, cancer de la prostate, cancer ovarien, *etc* …) aux agents anticancéreux (dont le melphalan, les sels de platine, le tamoxifène et le paclitaxel)[158–160]. Considérant que l'IL -6 peut être synthétisée par des cellules stromales, le microenvironnement est probablement impliqué dans la chimiorésistance induite par cette cytokine (Tableau 7).

Figure 2 : Les sécrétions des MSC et les mécanismes de chimiorésistance induits dans les cellules tumorales.

Les MSC sont capables de sécréter du SDF-1 et de l'IL-6. Ces facteurs activent les voies de signalisation impliquant respectivement CXCR-4 et STAT-3 dans les cellules tumorales conduisant à une augmentation des protéines anti-apoptotiques et finalement induisent une résistance à de nombreux médicaments anti-tumoraux.




### (i) MSC et IL-6

Plusieurs auteurs ont signalé une augmentation de la sécrétion d'IL-6 en présence de MSC[161]. Les MSC, ainsi que d'autres cellules stromales tels que les macrophages qui interagissent avec les MSC ou les cellules tumorales[154] sont une source de sécrétion d'IL-6. Ces synthèses d'IL-6 sont induites par la libération de facteurs solubles par les cellules environnantes ou par des contacts cellule-à-cellule.

Corre *et al*. ont observé que les BM-MSC isolées de patients atteints de MM sécrètent plus d'IL-6 que celles de donneurs sains[161]. L'augmentation de la sécrétion d'IL-6 par les cellules stromales de moelle osseuse peut nécessiter au préalable l'adhérence des cellules tumorales de myélome sur ces cellules stromales. En effet, cette augmentation de sécrétion de l'IL-6

nécessite un contact direct cellule/cellule car lorsqu'ils effectuaient une expérience en transwell, celle-ci n'était plus observée[76]. Cependant, un autre mécanisme passant par des facteurs sécrétés peut conduire à une augmentation de la sécrétion d'IL-6 par le stroma de la moelle osseuse. Ainsi, la production de VEGF et de FGF par les cellules tumorales peut stimuler la synthèse d'IL-6 par le stroma. Cette augmentation d'IL-6 stimule à son tour les cellules de myélome conduisant à une augmentation de la synthèse de VEGF et de FGF aboutissant à une boucle d'amplification[88,97].

### (ii) Activation des voies STAT3 *via* l'IL-6 sécrétée par MSC

Dans un modèle de LMC, Bewry *et al*. ont montré que le milieu conditionné (MC) des cellules HS-5 (ayant des caractéristiques de BM-MSC) entraînait l'activation de la voie STAT3 mise en évidence par une augmentation de sa phosphorylation[99]. Le milieu conditionné (MC) des cellules HS-5 protégeait les cellules de l'apoptose induite par les inhibiteurs de la protéine de fusion $p210^{BCR\text{-}ABL}$, l'imatinib, le nilotinib et le dasatinib. Comme nous l'avons déjà mentionné pour les CTO, l'utilisation de siRNA dirigés contre STAT3 empêche l'effet chimioprotecteur des cellules HS-5 sur les cellules de LMC traitées par l'imatinib.

Concernant le ciblage de l'IL-6 produit par le microenvironnement, Golay *et al*. ont démontré que l'utilisation de l'histone désacétylase ITF2357 inhibait de 80 à 95% la production d'IL-6 par les MSC[162]. L'ITF2357 était fortement cytotoxique, en entraînant une apoptose par voie intrinsèque, pour une lignée cellulaire de MM dépendante de l'IL-6 (CMA-03), ou pour les cellules de LAM stimulés en co-culture avec des MSC[162]. L'IL-6 pourrait représenter une bonne cible pour inhiber la chimiorésistance et diminuer la progression tumorale. Plusieurs médicaments ciblant l'IL-6 ou ses voies de signalisation (par exemple le tocilizumab) ont déjà été évalués en oncologie mais également dans d'autres pathologies. De façon surprenante, les thérapies dirigées contre l'IL-6 n'ont pas donné de résultats cliniques à ce jour dans la réversion de la chimiorésistance.

Tableau 7. Rôle de la voie de signalisation IL-6 / STAT3 dans la chimiorésistance des cellules tumorales induite par les MSC

## Voie de signalisation IL-6/STAT3

| Facteurs secrétés et/ou co-culture | Mécanismes de résistance dans les cellules stromales | Mécanismes de résistance dans les cellules tumorales | Cellules stromales utilisées | Origine des cellules tumorales utilisées | Médicaments | Références |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Facteurs sécrétés | Les BM-MSC de patients ayant MM secrètent plus d'IL-6 que des BM-MSC de donneurs sains | | BM-MSC de patients ayant MM et de donneurs sains | | | Corre *et al.*[161] |
| Co-culture | Adhérence aux cellules de myélome induit une augmentation de la sécrétion d'IL-6 | | Cellules stromales de BM de patients ayant MM et de donneurs sains | Cellules de MM | | Uchiyama *et al.*[76] |
| Facteurs sécrétés | | Augmentation de la phosphorylation de STAT3, Augmentation de l'expression de survivine, Bcl-xL et Mcl-1 | HS-5 | Cellules de LMC | imatinib, nilotinib, dasatinib | Bewry *et al.*[99] |
| Co-culture | Sécrétion d'IL-6 | | BM-MSC de donneurs sains | Cellules de MM et de LAM | | Golay *et al.*[162] |

### *c) Acquisition de résistance par l'activation de la voie PI3K / Akt dans les cellules tumorales*

Les phosphatidylinositol-3-kinases (PI3K) sont une famille de kinases lipidiques qui intègrent des signaux provenant de facteurs de croissance, de cytokines et d'autres signaux environnementaux et les traduisent en signaux intracellulaires qui régulent de multiples voies de signalisation[163,164]. La voie de signalisation impliquant les PI3K joue un rôle à la fois dans l'initiation et la progression tumorale. En effet, plusieurs types de cellules tumorales présentent des altérations de différentes isoformes de PI3K conduisant à un phénotype d'activation constitutive associé à une progression tumorale. L'activation de la voie de signalisation des PI3K induite par les MSC est également impliquée dans l'acquisition de la chimiorésistance des cellules tumorales. Ceci a été indirectement démontré par Castells *et al*., qui ont montré que le milieu conditionné (MC) par des CA-MSC (Hospicells) induisait la phosphorylation d'Akt, ce qui entraîne à son tour la phosphorylation et la stabilisation de la protéine anti-apoptotique XIAP. L'utilisation de siRNA dirigé contre XIAP a aboli la résistance au carboplatine acquise par des cellules d'adénocarcinome ovarien cultivées avec des CA-MSC, confirmant ainsi l'implication de cette voie de signalisation dans la chimiorésistance[91]. Wei *et al*. ont rapporté des résultats similaires sur des cellules de LMC en ce qui concerne l'implication de la phosphorylation d'Akt dans la chimiorésistance, en

présence de MSC. Wei *et al*. ont démontré que la phosphorylation et l'activation d'Akt sont induites par l'action du facteur soluble SDF-1, qui se lie à son récepteur CXCR4, activant ainsi la voie PI3K/Akt[137]. L'implication de SDF-1 dans la régulation de la voie de signalisation d'Akt a été décrite également dans des cellules leucémiques[142], où SDF-lα augmentait la phosphorylation d'Akt. Il est intéressant de noter qu'une telle activation de la voie de signalisation d'Akt a maintenant été impliquée dans la résistance aux traitements cytotoxiques (Tableau 6).

Enfin, Pillozzi *et al*. ont démontré que les cellules de LAL co-cultivées avec des MSC présentaient une activation des voies de signalisation impliquant à la fois les axes PI3K / Akt et « extracellular signal-regulated kinases » (ERK)1/2 qui étaient responsables de la chimiorésistance à la doxorubicine, à la prednisone et au méthotrexate observée dans ces cellules tumorales[109] (Tableau 4).

### *d) Acquisition de résistance via la sécrétion d'acides gras par les MSC*

Les liens entre l'obésité et le cancer ont été mis en évidence dans plusieurs publications récentes. Les adipocytes, par leur sécrétion d'acides gras libres ou d'adipokines, peuvent favoriser le développement tumoral et la résistance des cellules tumorales aux traitements anti-tumoraux[165]. Les adipocytes peuvent également se transdifférencier en cellules proches des CAF et synthétiser divers facteurs pro-tumoraux. Les acides gras peuvent être utilisés par les cellules cancéreuses comme source d'énergie[165] contribuant à leur métabolisme et pouvant également conduire à une résistance à la cytotoxicité induite par les glucocorticoïdes[166]. Ces effets pourraient être exercés par modulation de l'expression des protéines anti-apoptotiques. D'autres lipides, y compris les dérivés de l'acide arachidonique telle que la prostaglandine E2 (PGE2), peuvent être impliqués dans la résistance des cellules tumorales aux agents cytotoxiques après leur libération dans le milieu extracellulaire[167]. Enfin, les sphingolipides, par exemple la sphingosine-1-phosphate (S1P), peuvent également être impliqués dans la chimiorésistance[168].

Le stroma semble jouer un rôle dans cette résistance induite par les acides gras. Dandekar *et al*. ont démontré que le stroma pouvait induire une augmentation de l'expression de PGE2 par les cellules tumorales et stimuler ainsi leur chimiorésistance[169]. Les cellules stromales telles que les MSC sont capables de sécréter directement des acides gras, qui contribuent probablement à leurs effets chimioprotecteurs (Tableau 8). Roodhart *et al*. ont montré que l'injection de BM-MSC murines ou humaines par voie intraveineuse ou sous-cutanée chez des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées (cellules de carcinome pulmonaire ou colique), permettant de mimer le recrutement de BM-MSC au niveau de la tumeur, entraînait une résistance dose-dépendante au cisplatine[85]. Ils ont également observé une résistance similaire à de nombreux médicaments cytotoxiques (oxaliplatine, carboplatine, cisplatine, 5-FU et irinotécan) par injection de milieu conditionné (MC) obtenu à partir de BM-MSC cultivées en présence de sels de platine (oxaliplatine, carboplatine et cisplatine). Cette résistance aux médicaments a été associée à l'activation de la voie impliquant la cyclooxygénase 1 (COX-1)

et la thromboxane A synthase (TXAS) dans les MSC, conduisant à la sécrétion de deux acides gras polyinsaturés, l'acide 12-oxo-5,8,10-heptadécatriénoïque (KHT) et l'acide hexadéca-4,7,10,13-tétraénoïque[85].

### *e) Acquisition de résistance via la sécrétion de GDF-15 par les MSC*

Le « Growth and differentiation factor 15 » (GDF-15) est un pro-peptide appartenant à la superfamille TGF-ß, qui est capable d'inhiber l'apoptose dans différents types cellulaires, y compris les cardiomyocytes. Sa concentration est élevée dans le sérum de patients atteints de cancers colorectaux, pancréatiques, prostatiques ou neuronaux (gliomes). Corre *et al*. ont démontré que les BM-MSC isolées de patients atteints de MM sécrètent plus de GDF-15 que celles isolées chez des donneurs sains. Le GDF-15 augmente la résistance des cellules de MM (MOLP-6 et MM1.S) aux traitements tels que les agents chimiothérapeutiques melphalan, bortezomib et lenalidomide (Tableau 8). Cliniquement, ils ont pu montrer que la concentration plasmatique de GDF-15 était corrélée à la survie du patient[161,170].

### *f) Acquisition de la résistance via la supplémentation en acides aminés par les MSC*

Le métabolisme des cellules tumorales diffère de celui des cellules saines, notamment avec une augmentation de la glycolyse. Le microenvironnement des cellules tumorales peut favoriser le métabolisme cellulaire en fournissant de l'énergie sous forme de lactate, d'acétate et de macromolécules, mais aussi sous la forme d'acides aminés[171]. Les acides aminés, utilisés par les cellules tumorales comme source d'énergie et aussi comme constituants basiques des protéines, peuvent favoriser le développement tumoral. En plus de leur rôle pro-tumoral, les acides aminés qui sont sécrétés par le microenvironnement de la tumeur, comme la glutamine ou l'asparagine, peuvent provoquer une résistance à certains agents chimiothérapeutiques[172] (Tableau 8).

Alors que les cellules normales sont capables de synthétiser leur propre asparagine, les cellules leucémiques ont une capacité limitée de synthèse de cet acide aminé. L'asparagine étant indispensable à la synthèse protéique, les cellules leucémiques doivent donc la puiser à partir du milieu extracellulaire. Une stratégie pour traiter la leucémie est donc l'utilisation de l'asparaginase, enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'asparagine en acide aspartique et en ammoniaque, ce qui provoque, dans les cellules leucémiques, une privation en asparagine. Les MSC peuvent fournir de l'asparagine à ces cellules et ainsi provoquer une résistance au traitement par cette enzyme. En effet, comme l'ont montré Iwamoto *et al*., les cellules de LAL exprimaient de faibles quantités d'asparagine synthetase (23 fois moins que celles exprimées par les MSC primaires) et étaient sensibles à l'asparaginase[173]. La co-culture avec les BM-MSC provoque une résistance des cellules de LAL au traitement par asparaginase. Cette

résistance semble impliquer l'asparagine synthetase des MSC, qui stimule la libération d'asparagine par des MSC, qui à son tour peut être utilisée par les cellules de LAL. L'inhibition de l'asparagine synthetase par siRNA conduit à l'incapacité des MSC à induire une résistance des cellules de LAL au traitement par asparaginase.

### *g) Acquisition de résistance via des exosomes dérivés de MSC*

Les exosomes sont un type de microvésicules (terme qui désigne collectivement divers types d'éléments membranaires de l'ordre de 20 à 1000 nm de diamètre) qui sont libérés et captés par la plupart des types cellulaires. Les exosomes apparaissent nécessaires pour éliminer les protéines inutiles des cellules. De plus, ils permettent un transport inter-cellulaire d'ARNm et de miRNA susceptibles de modifier le devenir des cellules receveuses. Plusieurs études ont rapporté que les exosomes dérivés de MSC présentent des propriétés fonctionnelles similaires à celles des MSC, comme la capacité à réparer les lésions tissulaires, à supprimer les réponses inflammatoires et à moduler le système immunitaire. Les MSC et les exosomes dérivés de MSC augmentent la croissance de la lignée cellulaire de cancer gastrique humain SGC-7901 et des lignées cellulaires d'adénocarcinome de colon humain SW480, ce qui suggère que les exosomes dérivés de MSC favorisent la progression tumorale d'une manière similaire aux MSC *in vivo*[174]. Lee *et al*. ont montré que les exosomes dérivés de MSC réduisaient significativement la régulation de l'expression du VEGF dans les cellules tumorales, ce qui a conduit à l'inhibition de l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*[175]. En ce qui concerne l'acquisition de la résistance à la chimiothérapie, Ji *et al*. ont montré que des exosomes dérivés de MSC permettaient de protéger les cellules de cancer gastrique de l'apoptose induite par le traitement au 5-FU *in vivo* et *ex vivo*. Cette résistance semblait impliquer l'activation de la voie des MAP-kinases, entraînant en aval une sur-expression de pompes d'efflux de médicaments. Ainsi, en présence d'exosomes issus de MSC, les cellules de cancer gastrique exprimaient de façon plus importante les protéines MDR, MRP et LRP qui sont associées à des phénomènes de résistance à de nombreux médicaments. L'inhibition de la voie des MAP-kinases par l'utilisation d'un inhibiteur de MEK ou de B-Raf, diminuait la résistance et l'expression des protéines MDR, MRP et LRP des cellules tumorales induite par les exosomes de MSC[104].

Ono *et al.* ont suggéré que l'induction de la quiescence des cellules tumorales les protégeait des traitements de chimiothérapie[176]. Puisque les exosomes portent des miRNA qui pourraient être impliqués dans cette quiescence, les auteurs ont évalué le rôle des miRNA dans la chimiorésistance. Ils ont démontré que parmi divers miRNA, le miR-23b était augmenté dans les exosomes dérivés de BM-MSC par rapport aux exosomes de fibroblastes. Lorsque le miR-23b a été sur-exprimé dans les cellules cancéreuses du sein, il a induit des phénotypes de cellules cancéreuses quiescentes par la suppression de l'expression d'un gène cible, myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate (*MARCKS*), qui code pour une protéine favorisant le cycle cellulaire et la motilité. Ils ont suggéré que le transfert exosomal de

miRNA issus de BM-MSC pouvait favoriser la quiescence des cellules cancéreuses du sein dans une niche métastatique et donc induire la chimiorésistance de ces cellules.

Tableau 8 : Différents mécanismes de chimiorésistance des cellules tumorales impliquant des facteurs sécrétés par les MSC

| Mécanismes de résistance impliquant divers facteurs sécrétés | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Mécanismes de résistance** | **Facteurs secrétés et/ou contact cellule /cellule** | **Mécanismes de résistance dans les cellules stromales** | **Mécanismes de résistance dans les cellules tumorales** | **Cellules stromales utilisées** | **Origine des cellules tumorales utilisées** | **Médicaments** | **Références** |
| **Sécrétion d'acides gras polyinsaturés** | Facteurs sécrétés | Sécrétion d'acides gras polyinsaturés impliquant la voie COX-1/ TXAS | | BM-MSC murines et humaines | Cellules cancéreuses de poumon et du colon | oxaliplatine, carboplatine, cisplatine, 5-FU, irinotécan | Roodhart *et al.*[85] |
| **Sécrétion de GDF-15** | Facteurs sécrétés | GDF-15 sécrétion | | BM-MSC de patients avec MM ou de donneurs sains | Cellules de MM | melphalan, lénalidomide, bortézomib | Corre *et al.*[170] |
| **Apport d'acides aminés** | Co-culture | Expression d'asparagine synthétase, sécrétion d'asparagine | | BM-MSC humaines immortalisées par hTERT | Cellules de LAL | asparaginase | Iwamoto *et al.*[173] |
| **Production d'exosomes** | Exosomes | Production d'exosomes | Activation de la voie Raf/ MEK/ERK, surexpression des protéines MDR, MRP et LRP | MSC humaines dérivées du cordon ombilical | Cellules de cancer gastrique | 5-FU | Ji *et al.*[104] |
| **Inconnu** | Facteurs sécrétés | | | HS-5 | Cellules de MM et LAM | tipifarnib bortezomib | Yanamandra *et al.*[117] |

### *h) Augmentation de l'expression des protéines anti-apoptotiques dans les cellules tumorales*

Comme mentionné ci-dessus, les MSC infiltrant les tumeurs peuvent modifier les cellules tumorales par la libération de plusieurs facteurs, tels que les cytokines, les facteurs de croissance, les peptides, les acides gras et les miRNA. Tous ces composés sont capables d'activer des voies de signalisation impliquées dans la résistance aux médicaments. Les voies impliquées dans l'apoptose ont été largement décrites et plusieurs auteurs ont rapporté que les sécrétions des MSC induisaient la sur-expression de plusieurs protéines anti-apoptotiques (Tableau 9). Les MSC sont impliquées dans l'augmentation de l'expression de Bcl-xL[99,144,148,177,178] et de survivine[99,148], et contribuent à la stabilisation ou la synthèse accrue de Mcl-1[98,99,148,179,180] et XIAP[91]. Les MSC sont également associées à la régulation de Bcl-2 soit en entraînant une augmentation de son expression[147,153] soit en diminuant son clivage[146] (le

clivage de la protéine Bcl-2 génère un fragment pro-apoptotique). Ces divers effets semblent être indépendants de l'origine des cellules tumorales et ont été rapportés à la fois dans des cancers hématologiques (cellules leucémiques de LAM[125,148,178], LMC[99,144], LAL[112], LLC[98,179] et MM[180]) et des cancers solides (CTO)[91]. L'augmentation des protéines anti-apoptotiques mentionnées ci-dessus pourrait être due à la sécrétion d'IL-6 par les MSC[88,152].

En outre, les BM-MSC de patients atteints de leucémie ont été impliquées dans la résistance des cellules de LMC à l'apoptose, associée à une phosphorylation accrue et la séquestration de « Bcl-2-associated death promoter » (BAD)[137].

Pour empêcher l'effet chimioprotecteur induit par les MSC, des inhibiteurs pharmacologiques des différentes protéines citées ou le ciblage de ces protéines par l'utilisation d'ARN interférents pourraient restaurer la sensibilité des cellules tumorales à diverses chimiothérapies (par exemple siRNA dirigé contre XIAP[91], ou utilisation d'HDAC entraînant une diminution de l'expression de Bcl-2 et de Mcl-1[162]).

Tableau 9 : Rôle des protéines anti-apoptotiques dans la chimiorésistance des cellules tumorales induite par les MSC

## Augmentation de protéines anti-apoptotiques

| Facteurs secrétés et/ou contact cellule /cellule | Mécanismes de résistance dans les cellules stromales | Mécanismes de résistance dans les cellules tumorales | Cellules stromales utilisées | Origine des cellules tumorales utilisées | Médicaments | Références |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Facteurs sécrétés | | Augmentation de l'activation de la voie PI3K/Akt, stabilisation de XIAP par phosphorylation | BM-MSC de donneurs sains et Hospicells | Cellules tumorales ovariennes | carboplatine | Castells *et al.*[91] |
| Co-culture | | Augmentation de Bcl-xL, arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 | BM-MSC humaines | Cellules leucémiques | daunorubicine | Lin *et al.*[177] |
| Co-culture | | Diminution du clivage de PARP et de Mcl-1 | Cellules murines M2-10B4, KUM4, KUSA-H1, ST2 et cellules humaines StromaNKtert, UE6E7T-2 et UCB408E6E7TERT-33 | Cellules de LLC | fludarabine, cyclo-phosphamide, dexamethasone | Kurtova *et al.*[98] |
| Co-culture | | Augmentation de l'expression de Bcl-2, Bcl-xL et c-Myc | BM-MSC de donneurs sains | Cellules de LAM | mitoxantrone | Xia *et al.*[125] |
| Facteurs sécrétés | Sécrétion potentielle d'IL-6 ou d'IGF-1 ? | Augmentation de Mcl-1 | HS-5 | Cellules de MM | melphalan, bortezomib, dexamethasone | Pei *et al.*[180] |
| Co-culture | Expression de ligands de la voie Wnt | Diminution du clivage de Bcl-2, Augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la voie Wnt | BM-MSC humaines immortalisées par hTERT | Cellules de LAL | cytarabine | Yang *et al.*[112] |
| Facteurs sécrétés | | Augmentation de Bcl-2 et Bcl-xL, Diminution de la prolifération de cellules leucémiques | MS-5 | Cellules de LAM | cytarabine | Konopleva *et al.*[178] |
| Co-culture | | Stabilisation et augmentation de Mcl-1 | BM-MSC humaines et murines immortalisées par hTERT | | forodesine | Balakrishnan *et al.*[179] |
| Facteurs sécrétés | | Augmentation de la phosphorylation de STAT-3, augmentation de survivine, Bcl-xL et Mcl-1 | HS-5 | Cellules de LMC | imatinib, nilotinib, dasatinib | Bewry *et al.*[99] |
| Facteurs sécrétés | SDF-1 secretion | Augmentation de survivine, Bcl-xL et Mcl-1 | BM-MSC de donneurs sains et de patients atteints de LAM | Cellules de LAM | anti-FLT3, doxorubicine | Kojima *et al.*[148] |
| Co-culture | | Augmentation de l'expression de CXCR4 et Bcl-xL | BM-MSC de donneurs sains | Cellules de LMC | imatinib | Vianello *et al.*[144] |
| Facteurs sécrétés | | Arrêt du cycle cellulaire en G0/G1, augmentation de la phosphorylation d'AKT et de BAD | BM-MSC de patients atteints de LLC, LMC et LAM | Cellules de LMC | | Wei *et al.*[137] |

# II) RESULTATS

Le cancer ovarien, dont 80-90% sont des adénocarcinomes, est la première cause de décès par cancers gynécologiques. A ce jour, le traitement de référence consiste en une exérèse la plus complète possible de la tumeur associée à une chimiothérapie à base de sels de platine et de taxanes. La survie globale des patientes à 5 ans est faible (proche de 40%) en raison d'un fort taux de récidive[181,182] et de l'acquisition d'une résistance aux traitements par les cellules tumorales résiduelles. En plus des mutations intrinsèques des cellules tumorales ovariennes (CTO), les interactions entres les cellules cancéreuses et le microenvironnement semblent être impliquées dans la progression de la maladie et l'acquisition de cette résistance.

Le microenvironnement tumoral est complexe et dynamique. Sa composante englobe les cellules avoisinantes à la tumeur : cellules endothéliales, fibroblastes, adipocytes, cellules du système immunitaire ainsi que des cellules stromales mésenchymateuses (MSC) qui nous intéressent plus particulièrement. Les MSC sont des cellules multipotentes ayant le potentiel de se différencier en de nombreux types cellulaires incluant des adipocytes, chondrocytes, ostéoblastes, fibroblastes et structures vasculaires. Ces cellules peuvent être retrouvées au contact de cellules tumorales et sont alors nommées MSC associées au cancer (CA-MSC). Ces CA-MSC pourraient être recrutées au niveau de la tumeur à partir de MSC déjà présentes dans le tissu d'origine mais également issues d'autres tissus comme le tissu adipeux ou la moelle osseuse par exemple.

Les MSC semblent exercer un rôle pro-tumoral important en stimulant la croissance tumorale, en favorisant l'angiogenèse et en augmentant la résistance des cellules tumorales aux traitements[85]. De plus, Castells *et al*. ont mis en évidence que les facteurs sécrétés par les Hospicells (cellules, isolées d'ascites de patientes atteintes de cancer ovarien, ayant des caractéristiques de CA-MSC) ainsi que les MSC issues de moelle osseuse (BM-MSC) sont capables d'induire une résistance au carboplatine des CTO en diminuant l'activation de caspases effectrices, bloquant ainsi les mécanismes d'apoptose[91]. L'ensemble de ces résultats suggère que les MSC du stroma ovarien peuvent induire une chimiorésistance par la libération de facteurs dans le voisinage des tumeurs.

## A) Isolement et identification de cellules du microenvironnement tumoral ovarien

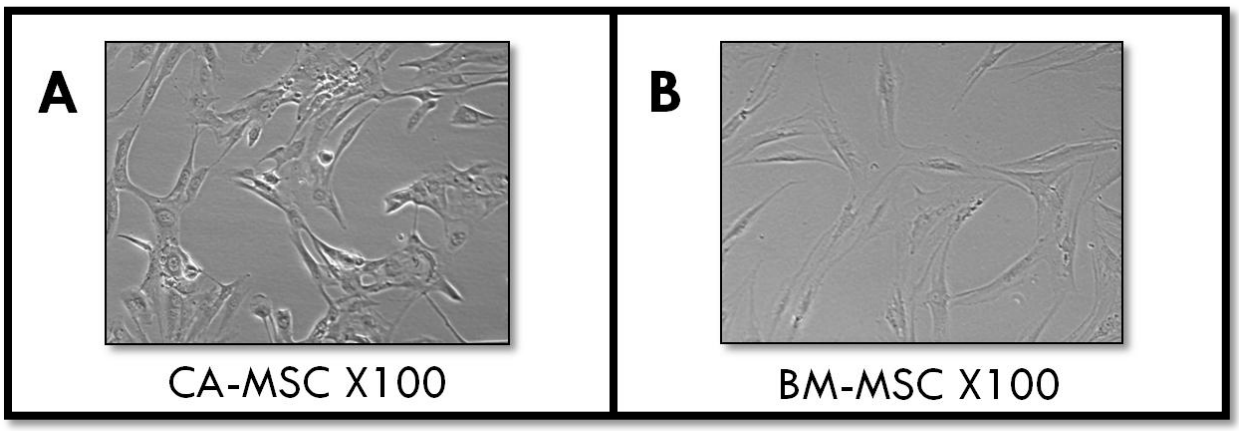
### 1) Isolement de cellules du microenvironnement tumoral ovarien

Avant d'étudier le rôle des MSC dans le cancer ovarien, il est important de déterminer si ces cellules sont co-localisées avec les tumeurs ovariennes. Pour cela, à partir de prélèvements humains, nous avons évalué la présence de MSC.

A partir de tumeurs fraîches obtenues après biopsie ou exérèse tumorale chez des patientes atteintes de cancer ovarien, nous avons isolé ses cellules *ex vivo*. Pour ce faire, la tumeur a été dissociée à l'aide de collagénase ou ensemencée directement dans des boîtes de culture. Les fragments tumoraux ou les cellules dissociées ont été cultivés dans un milieu de culture nommé DMEM supplémenté en sérum de veau fœtal (10%), en L-glutamine (1%) et avec un mélange d'antibiotiques (Pénicilline / streptomycine : 1%). Les cellules sont alors séparées selon leur potentialité à adhérer au plastique. En effet, de nombreuses cellules sont présentes dans les fragments tumoraux obtenus. Cependant, peu de cellules sont adhérentes ce qui nous permet d'effectuer un tri selon leur capacité à adhérer au plastique. Des cellules tels que les MSC, les macrophages ou parfois des cellules tumorales peuvent adhérer au plastique. Le décollage de ces cellules à l'aide de la trypsine permet de s'affranchir de la présence de macrophages au cours des repiquages successifs car les macrophages sont résistants à la trypsine. Ainsi, nous avons isolé des cellules (Fig 3A) ayant une morphologie fibroblastique évoquant des MSC (Fig 3B).

Figure 3 : Cellules isolées de pièces tumorales de patientes atteintes de cancer ovarien

Les cellules isolées de prélèvements tumoraux de patientes atteintes de cancer ovarien (A) ont une morphologie fibroblastique évoquant des MSC, par exemple des BM-MSC (B).

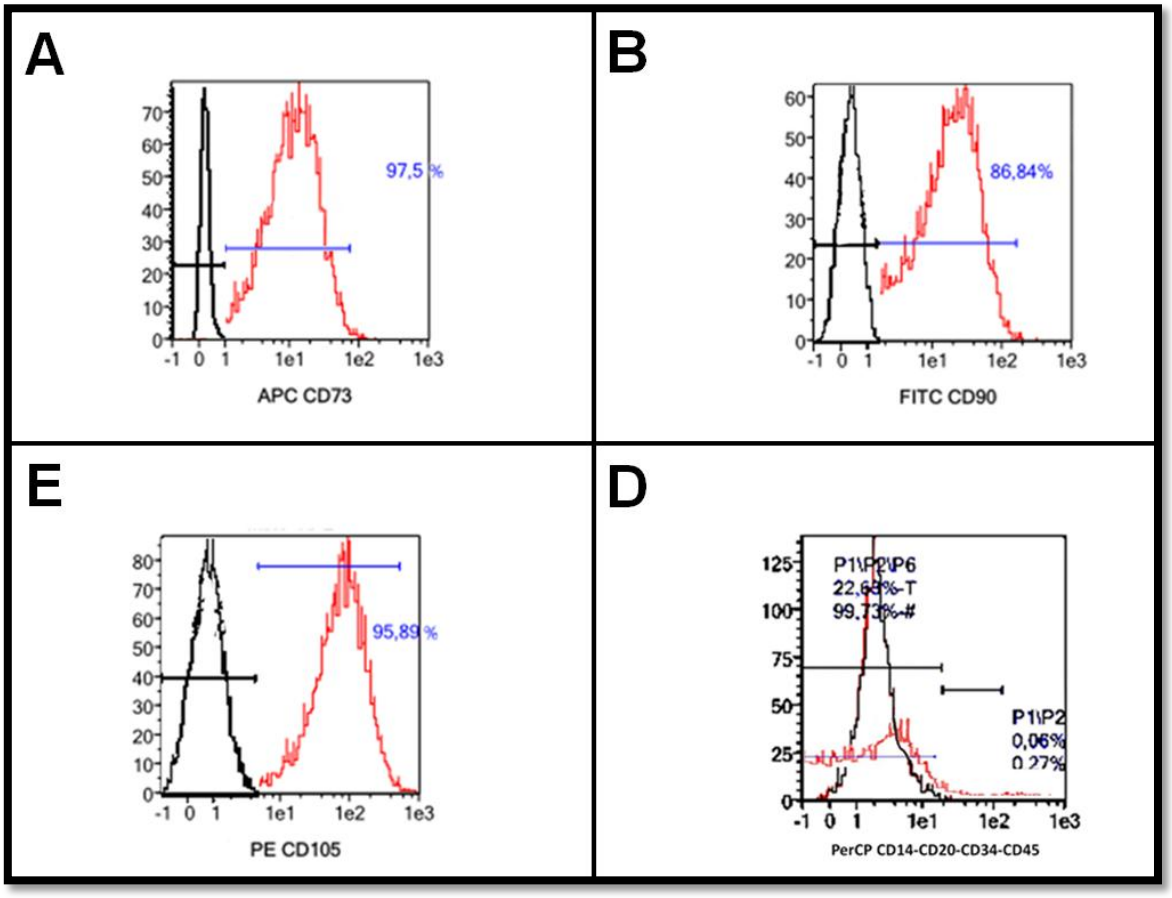


### 2) Etude de marqueurs exprimés par les cellules isolées

Afin de confirmer la nature de ces cellules isolées du microenvironnement tumoral, nous avons étudié l'expression membranaire de 3 marqueurs caractéristiques des MSC : le CD73, CD90 et CD105. Par cytométrie en flux, nous avons montré que ces cellules étaient positives pour les marqueurs CD73, CD90, CD105 et négatives pour les marqueurs normalement non exprimés par les MSC : CD14, CD20, CD34 et CD45 (Fig. 4).

Figure 4 : Expression membranaires de marqueurs caractéristiques des MSC

Par cytométrie en flux, l'analyse des cellules isolées de prélèvements tumoraux de patientes atteintes de cancer ovarien montrent qu'elles expriment CD73 (A), CD90 (B) et CD105 (C) mais pas CD14, CD20, CD34, ni CD45 (D).




Ainsi, nous avons pu montrer que des MSC sont retrouvées dans les tumeurs ovariennes. Ces MSC, à proximité des cellules tumorales, peuvent donc être considérées comme des MSC associées au cancer (CA-MSC).

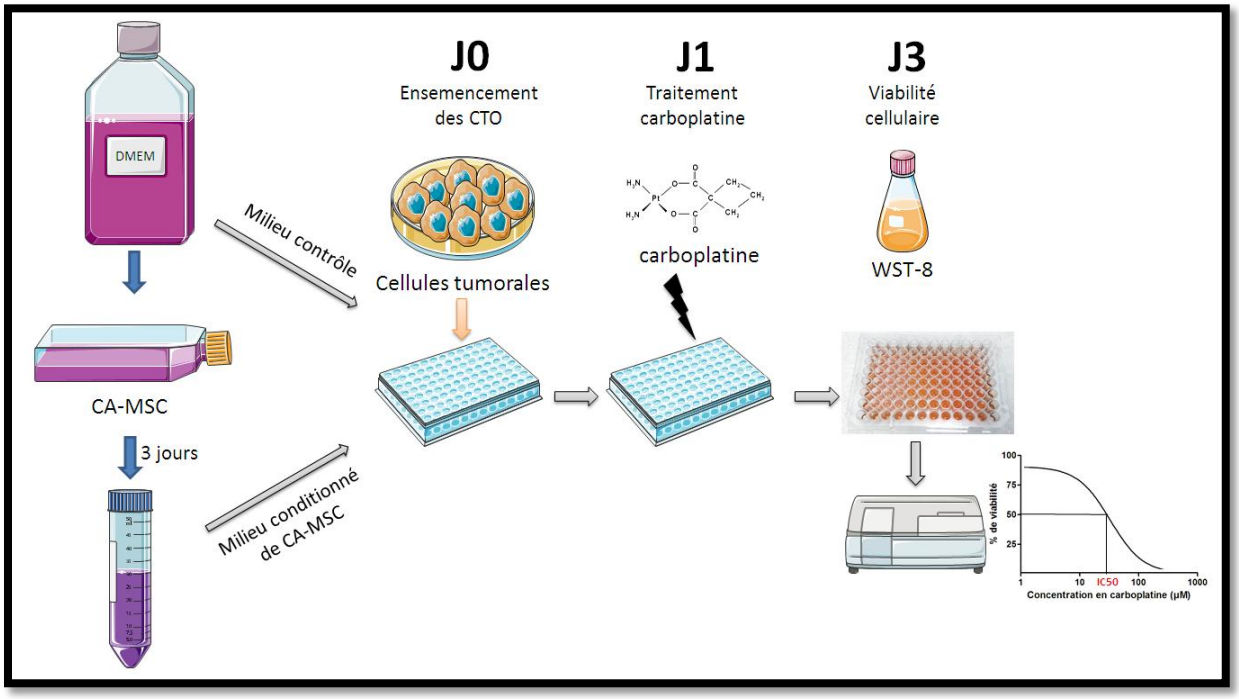
Après avoir mis en évidence l'association de ces cellules avec les cellules tumorales dans le cancer ovarien, nous avons entrepris de déterminer leur rôle dans la résistance aux chimiothérapies.

## B) Rôle *in vitro* des CA-MSC sur la sensibilité de cellules tumorales ovariennes au carboplatine

Afin d'étudier le rôle des CA-MSC isolées de patientes atteintes d'adénocarcinome ovarien dans la résistance au traitement des CTO, nous avons utilisé 2 lignées cellulaires de cancer ovarien, les IGROV-1 et les SKOV-3. Ces lignées diffèrent par leur résistance intrinsèque au carboplatine, leur profil mutationnel et leur morphologie. En effet, les cellules SKOV-3 sont considérées comme chimio-résistantes alors que les IGROV-1 sont plus sensibles au carboplatine. Les cellules IGROV-1 sont hyper-mutées, avec des mutations des gènes *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PIK3CA*, *PTEN* et *ARID1A* alors que les cellules SKOV-3 ont un profil mutationnel différent avec des mutations de *PIK3CA* et de *ARID1A* et une amplification de *ERBB2*[183]. Leur morphologie est également différente avec un aspect de cellules épithéliales pour les cellules IGROV-1 alors que les cellules SKOV-3 sont plus allongées. Cette différence morphologique pourrait évoquer une transition épithélio-mésenchymateuse dans les cellules SKOV-3. Ainsi, ces 2 lignées de CTO, qui diffèrent sur de nombreux aspects, permettent une étude plus large sur des lignées cellulaires hétérogènes.

Figure 5 : Protocole de l'expérience de chimiorésistance des CTO

Après récupération du milieu conditionné (MC) pendant 3 jours par des CA-MSC, les CTO sont mises en culture à 5000 cellules par puits dans des plaques 96 puits. 50µl de DMEM ou de milieu conditionné (MC) de CA-MSC sont ajoutés dans 50µL de RPMI contenant les 5000 CTO. Après 24 heures, les cellules sont traitées par une gamme de carboplatine. La viabilité cellulaire est évaluée 48 heures après le traitement par un test au WST-8. Le WST-8 est un sel de tétrazolium qui peut être clivé par les enzymes mitochondriales des cellules vivantes entraînant la formation de formazan qui absorbe à 450nm. La concentration inhibant de 50% la viabilité cellulaire (IC50) est le reflet de la sensibilité des CTO au carboplatine.



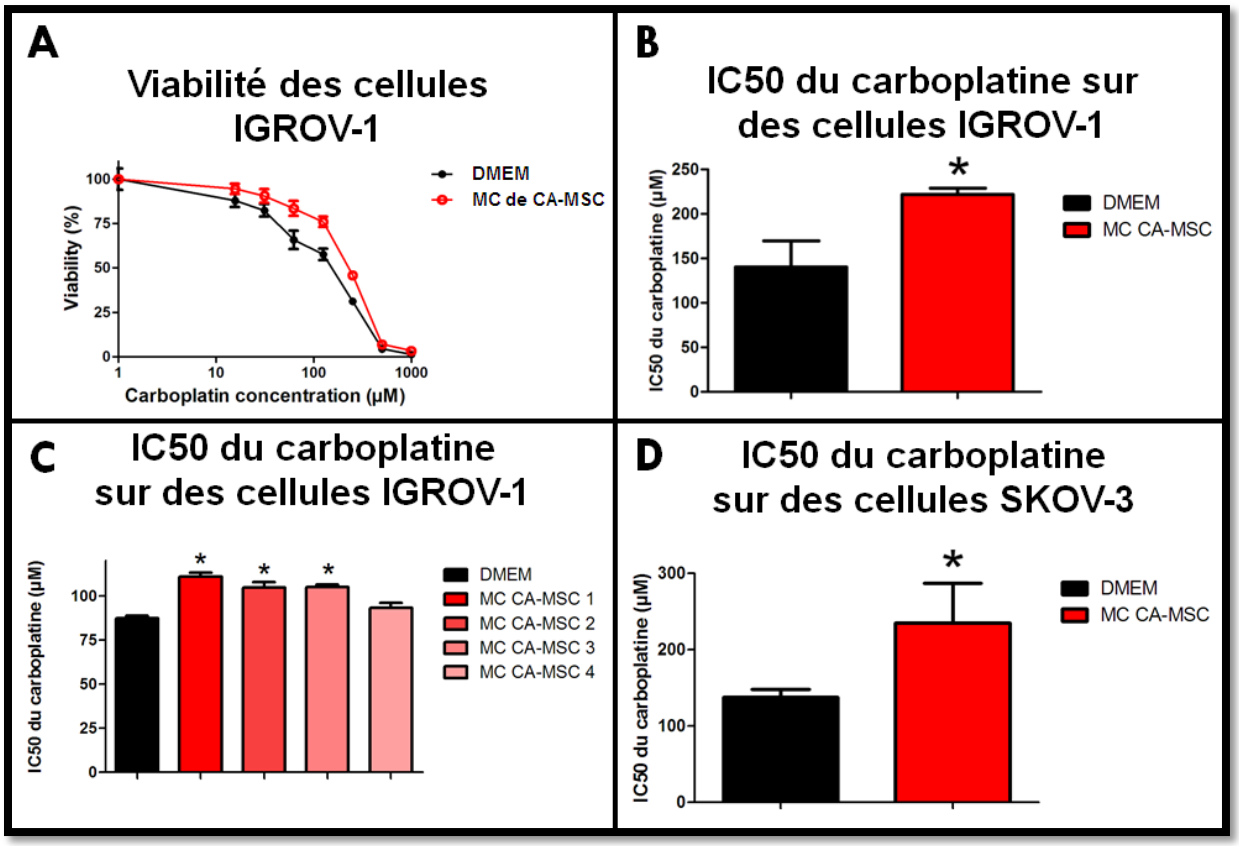
Ainsi, nous avons cultivé des CTO IGROV-1 et SKOV-3 avec du milieu conditionné (MC) de CA-MSC et nous les avons traitées par une gamme de carboplatine (Fig. 5). La concentration en carboplatine inhibant 50% de la viabilité cellulaire (IC50), obtenue 48 heures après le début du traitement, est le reflet de la sensibilité des cellules IGROV-1 et SKOV-3 au carboplatine.

En présence de milieu conditionné (MC) de CA-MSC, la courbe de sensibilité au carboplatine des cellules IGROV-1 est décalée vers la droite montrant une augmentation de la résistance (Fig. 6A) de ces CTO au carboplatine. Cette augmentation de la résistance est également traduite par une augmentation de l'IC50 du carboplatine des cellules IGROV-1 en présence de MC de CA-MSC (Fig. 6B). Cette expérience a également été effectuée sur 4 autres types de CA-MSC isolées et triées (CD 73+, CD90+, CD105+, CD14-, CD20-, CD34- et CD45-) (Fig. 6C).

Nous avons donc pu montrer que les CA-MSC retrouvées au niveau des tumeurs ovariennes sont capables de sécréter des facteurs induisant une résistance au carboplatine des CTO.

Figure 6 : Sensibilité au carboplatine des CTO IGROV-1 et SKOV-3 en présence de milieu conditionné de CA-MSC

Après récupération du milieu conditionné (MC) pendant 3 jours par des CA-MSC, les CTO IGROV-1 et SKOV-3 sont mises en culture à 5000 cellules par puits dans des plaques 96 puits. 50µl de DMEM ou de MC de CA-MSC sont ajoutés dans 50µL de RPMI contenant les 5000 CTO. Après 24 heures, les cellules sont traitées par une gamme de carboplatine. La viabilité cellulaire est évaluée 48 heures après le traitement par un test au WST-8. Le WST-8 est un sel de tétrazolium qui peut être clivé par les enzymes mitochondriales des cellules vivantes entraînant la formation de formazan qui absorbe à 450nm. La concentration inhibant de 50% la viabilité cellulaire (IC50) est le reflet de la sensibilité des CTO au carboplatine. La courbe de viabilité (A) ainsi que le calcul des IC50 du carboplatine (B, C et D) sont obtenus par le logiciel GraphPad Prism®.

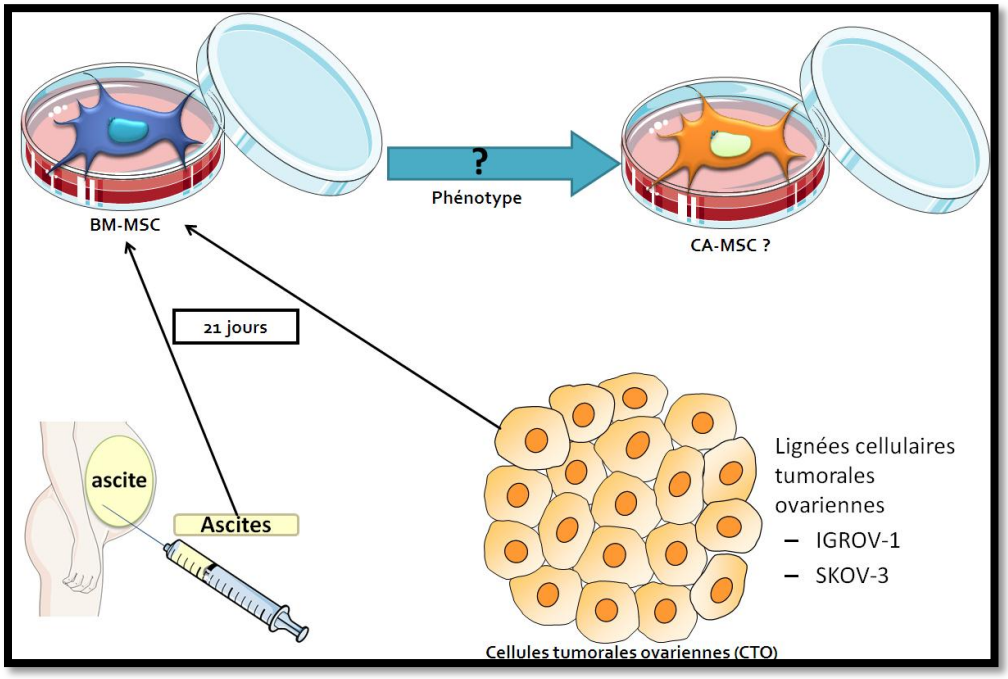


## C) Mise en place d'un modèle de CA-MSC « induites »

L'origine des CA-MSC isolées n'est pas connue à l'heure actuelle. Elles pourraient provenir de la moelle osseuse comme du tissu adipeux. Les BM-MSC ayant une forte attraction pour les cellules tumorales, elles pourraient être recrutées lors de la progression tumorale. Afin d'évaluer la capacité des BM-MSC à acquérir le potentiel des CA-MSC au niveau de la chimiorésistance, nous avons mis en place un modèle expérimental permettant d'obtenir des CA-MSC induites. Ce modèle utilise comme cellules d'origine des MSC physiologiques issues de donneuses saines. La comparaison de ces MSC issues d'un même sujet, en fonction de leur condition de culture (normal ou mimant un environnement tumoral), permet de s'affranchir de la variabilité interindividuelle.

Figure 7 : Schéma de la méthode permettant l'obtention de CA-MSC « induites »

Les BM-MSC sont cultivées pendant 21 jours dans un environnement tumoral (50% de DMEM avec 50 % de pool d'ascites ou de milieu conditionné (MC) de CTO IGROV-1 ou SKOV-3) ou dans un milieu contrôle (DMEM).




### 1) Méthode permettant l'obtention de CA-MSC « induites »

Ce modèle vise à obtenir des MSC issues d'un même sujet sain mais qui pourront être différentes en fonction du contexte et notamment dans un contexte de tumeur ovarienne. Pour cela, les BM-MSC de donneuses saines sont utilisées. Ces BM-MSC proviennent de prélèvements de têtes fémorales chez des femmes ayant subi une chirurgie de la hanche. Ces femmes sont agées d'une soixantaine d'année, ce qui correspond à l'âge des patientes atteintes de cancers ovariens (âge moyen au diagnostic : 63 ans).

Les BM-MSC sont cultivées pendant 21 jours dans un environnement tumoral ovarien. Cet environnement tumoral ovarien est mimé par le milieu conditionné (MC) de CTO (IGROV-1

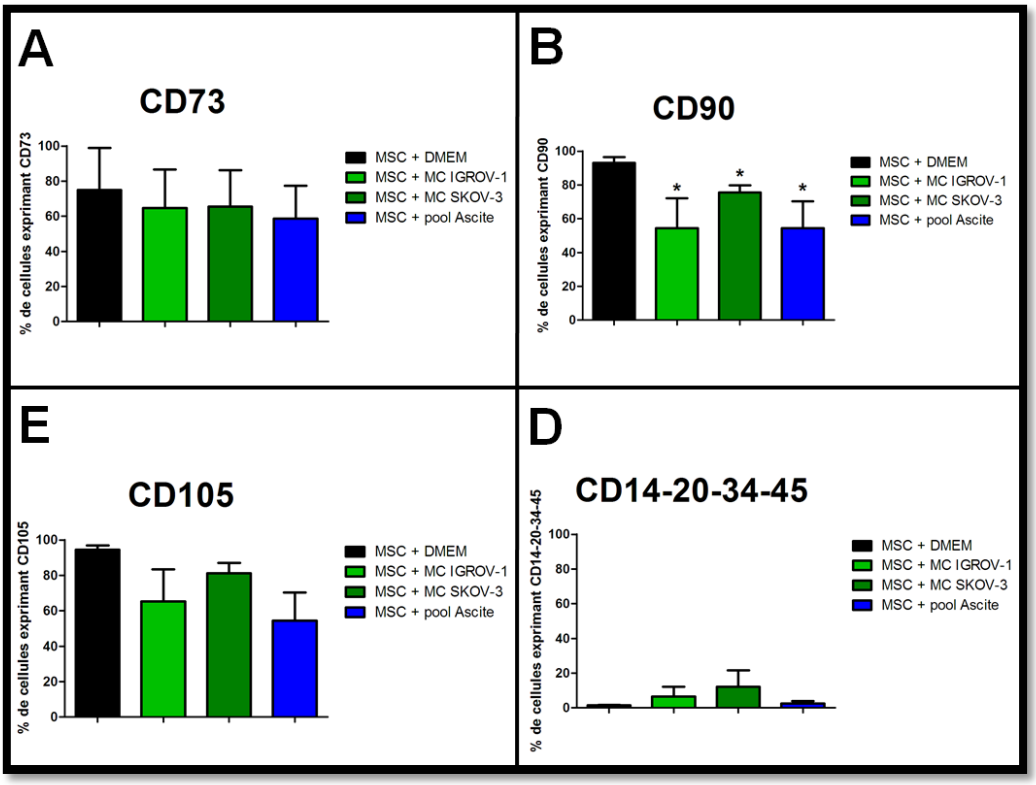
et SKOV-3) ou par du liquide d'ascite de patientes atteintes de cancer ovarien (Fig. 7) suivies à l'Institut Universitaire du Cancer de Toulouse (IUCT). Cette ascite est centrifugée à 1500 rotations par minute pendant dix minutes afin de ne récupérer que les facteurs contenus dans l'ascite. Cette ascite est ensuite filtrée à 0,2µm afin d'éliminer toutes les cellules résiduelles. Cette étape permet de ne pas ensemencer de cellules, de bactéries ou de virus qui pourraient être présents dans l'ascite. Pour avoir des quantités suffisantes, nous avons réalisé un pool d'ascites regroupant dix ascites de patientes atteintes d'adénocarcinome ovarien. Les BM-MSC sont cultivées dans un milieu composé à 50% de DMEM. Les 50 % restant du milieu de culture sont composés, en fonction des conditions, de MC de CTO (MSC/igrov-1 ou MSC/skov-3), d'ascite (MSC/ascite) ou de DMEM (MSC physiologiques contrôle). Le milieu est renouvelé 2 fois par semaine et les cellules sont cultivées à 37°C avec 5% de $CO_2$.

Après 21 jours de culture, l'expression membranaire des marqueurs CD73, CD90, CD105, CD14, CD20, CD34 et CD45, a été étudiée. Seule une légère diminution de l'expression du CD90 était significative comparée à la condition contrôle (DMEM) (Fig. 8B). L'expression des marqueurs CD73, CD105, CD14, CD20, CD34 et CD45 (Fig. 8 A, C et D) n'était pas significativement différente du milieu de culture contrôle (DMEM).

Ainsi, les MSC cultivées en présence d'un environnement tumoral ovarien semblent peu différentes des BM-MSC d'origine au niveau de l'expression membranaires des marqueurs CD73, CD90, CD105, CD14, CD20, CD34 et CD45.

Figure 8 : Expression membranaire des marqueurs caractéristiques des MSC

Après 21 jours de culture des BM-MSC dans un environnement tumoral (50% de DMEM avec 50 % de pool d'ascites ou de milieu conditionné de CTO IGROV-1 ou SKOV-3) ou dans un milieu contrôle (DMEM), l'expression membranaire de CD73 (A), CD90 (B), CD105 (C), CD14-20-34-45 (D) est étudié par cytométrie en flux à l'aide du cytomètre BD FACSCalibur™.

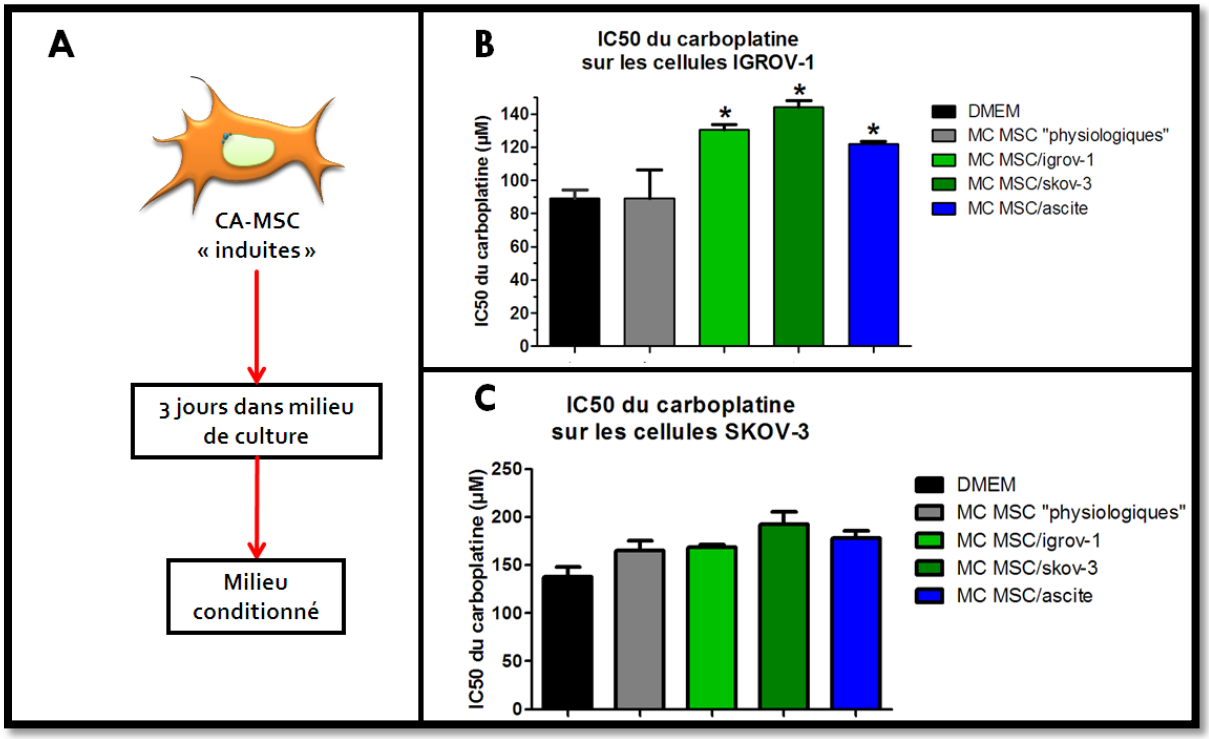


### 2) Etude de l'effet des facteurs sécrétés par des CA-MSC « induites » sur la sensibilité des cellules tumorales ovariennes au carboplatine

Afin de valider ce modèle, la capacité de ces différentes MSC à induire une chimiorésistance comparable à celle des CA-MSC, a été étudiée. Ainsi, la capacité d'induction de la chimiorésistance des MSC « activées » par le MC des cellules IGROV-1 (MSC/igrov-1), des cellules SKOV-3 (MSC/skov-3) ou de l'ascite (MSC/ascite) a été évaluée et comparée à celle de MSC « physiologique » (DMEM). Après 21 jours de culture des BM-MSC dans les différentes conditions, les milieux sont remplacés par du milieu contrôle (DMEM) afin de récupérer 72 heures plus tard du MC par ces MSC ne contenant que les sécrétions de ces dernières (sans ascite, ni sécrétion des CTO). Alors que le MC des BM-MSC physiologiques ne modifie pas la résistance des cellules IGROV-1 au carboplatine, le MC des MSC « activées » entraîne une augmentation de la résistance mise en évidence par l'augmentation de l'IC50 du carboplatine sur les cellules IGROV-1 (Fig. 9B). Bien que des augmentations d'IC50 du carboplatine sur les cellules SKOV-3 aient été observées en présence de MC des MSC « activées » comparées aux conditions contrôles (DMEM et MC de MSC « physiologiques »), celles-ci n'étaient pas significativement différentes (Fig. 9C).

Figure 9 : Effet des CA-MSC « induites » sur la résistance des cellules IGROV-1 et SKOV-3 au carboplatine

Après 21 jours de culture des BM-MSC dans un environnement tumoral, ces cellules sont cultivées dans du DMEM. Le MC des MSC est recueilli 72h après (A). Les CTO IGROV-1 et SKOV-3 sont mises en culture à 5000 cellules par puits dans des plaques 96 puits. 50µl de DMEM ou de MC de CA-MSC « induites » sont ajoutés dans 50µL de RPMI contenant les 5000 CTO. Après 24h, les cellules sont traitées par une gamme de carboplatine. La viabilité cellulaire est évaluée 48h après le traitement par un test au WST-8. Les IC50 du carboplatine (B et C) sont tracées et calculées par le logiciel GraphPad Prism®.



Au contact d'un environnement tumoral, les BM-MSC peuvent donc avoir une modification de leur phénotype conduisant à la sécrétion de facteurs chimioprotecteurs pour les CTO IGROV-1 comme nous l'avons montré pour les CA-MSC. Ces MSC activées peuvent donc être nommées CA-MSC « induites ».

## D) Rôle *in vivo* des MSC dans la résistance des cellules tumorales ovariennes au carboplatine

Afin de vérifier si, *in vivo*, les MSC peuvent induire une chimiorésistance, nous avons utilisé deux modèles expérimentaux murins dans lesquels des MSC ont été co-injectées avec des CTO. Les souris ont été traitées au carboplatine afin de déterminer l'effet des MSC sur la chimiorésistance. L'expérience durant plus de 21 jours, les BM-MSC qui étaient au contact d'un environnement tumoral pouvaient acquérir le phénotype de CA-MSC « induites ».

### 1) Modèle expérimental d'adénocarcinome ovarien totalement murin

Nous avons utilisé un modèle expérimental totalement murin avec des souris C57BL/6. Les CTO murines ID8 possèdent le même fond génétique que ces souris. Afin de suivre le développement tumoral par luminescence, les cellules ID8 ont été au préalable transduites par le gène de la luciférase d'une luciole (Firefly), la Photinus pyralis. Les cellules obtenues sont nommées ID8luc et peuvent émettre de la bioluminescence, en présence de luciférine. Les MSC (RCB2295) utilisées dans cette expérience sont des MSC immortalisées murines ayant un fond génétique C57BL/6. Les souris sont injectées par des CTO ID8luc seules, ou avec des MSC murines, par voie intrapéritonéale (i.p.) (Fig. 10A). L'injection par voie i.p. permet de mimer une dissémination péritonéale, qui est observée chez les patientes atteintes d'adénocarcinome ovarien. Le volume tumoral est évalué par luminescence des CTO ID8luc 7 jours après la fin du traitement par carboplatine (Fig. 10A). La luminescence est réalisée sur le corps entier de souris vivantes puis sur différents organes (rate, diaphragme, péritoine et foie) après sacrifice et dissection des souris mais également sur le liquide de lavage péritonéal (ascite).

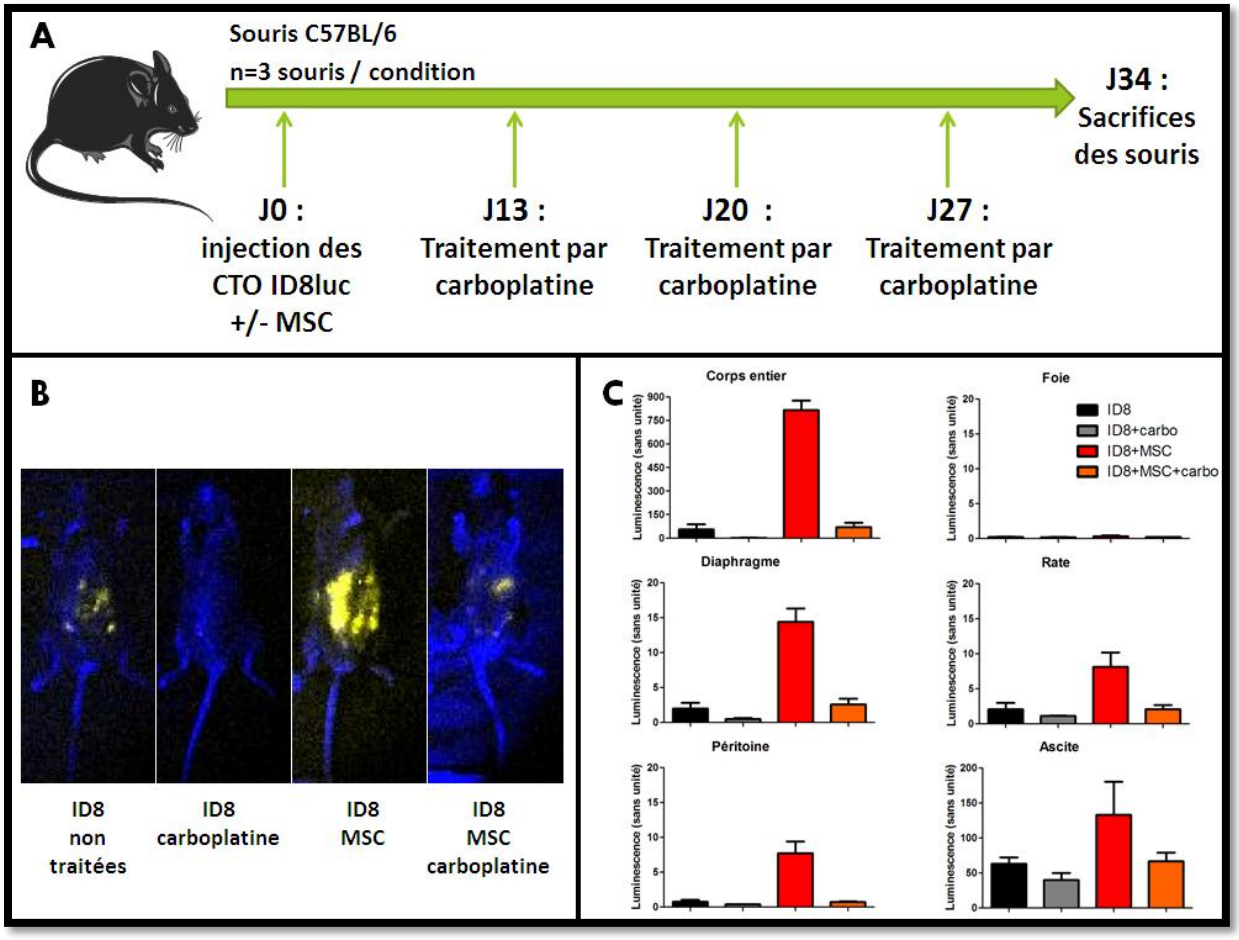
La luminescence des cellules ID8luc, reflet du volume tumoral, est plus importante dans les souris ayant reçu une co-injection d'ID8luc et de MSC que dans les souris ayant eu une injection de CTO ID8luc seules (Fig. 10 C et D). De même, la luminescence observée sur le corps entier des souris traitées au carboplatine est plus importante dans les souris ayant reçu une co-injection d'ID8luc et de MSC que dans les souris ayant eu une injection de CTO ID8luc seules.

Pour évaluer la dissémination tumorale au niveau des organes de la cavité abdominale, nous avons sacrifié les souris et prélevé le foie, le diaphragme, la rate et le péritoine et le liquide de lavage péritonéal (ascite). Les organes ont été récupérés et disséqués, et l'émission de

bioluminescence, relative à la présence de cellules ID8luc, a été mesurée dans chacun de ces fragments d'organes et dans l'ascite.

Figure 10 : Effet des MSC sur la résistance des CTO ID8luc au carboplatine dans un modèle expérimental murin

A J0, $5.10^6$ cellules ID8luc +/- $5.10^5$ MSC (RCB2295) sont injectées par voie i.p. dans des souris C57BL/6. Les souris sont traitées à partir de J13. Le traitement par carboplatine consiste à réaliser une injection de 200µL d'une solution de carboplatine à 4mg/mL tous les 7 jours pendant 3 semaines. Après 34 jours, soit 7 jours après la dernière injection de carboplatine, le volume tumoral est évalué par luminescence (A). Dans un premier temps, une injection de 200µl de luciférine firefly à 15mg/mL par voie i.p. est réalisée sur souris vivantes (anesthésiées au préalable avec de l'isoflurane). L'appareil de mesure de bioluminescence (IVIS®) est constitué d'une enceinte totalement hermétique à la lumière dans laquelle est placée une caméra CCD (Charge Coupled Device) permettant l'acquisition du signal. Les souris sont placées dans l'enceinte et les images sont obtenues 10 minutes après l'injection de luciférine (B). La quantification de la luminescence obtenue sur les images est réalisée grâce au logiciel ImageJ® (C). Les souris sont ensuite sacrifiées et un lavage péritonéal est réalisé en injectant 5mL de NaCl 0,9%. Ce liquide, contenant de l'ascite et du NaCl, est ré-aspiré. Le foie, le diaphragme, la rate et le péritoine sont prélevés et disséqués puis mis dans les puits d'une plaque 96 puits à fond blanc contenant 150µL de milieu de culture. 50µl de luciférine sont ajoutés et la luminescence produite est détectée au luminomètre (EnVision™ Multilabel Plate Readers - PerkinElmer®). L'intensité de luminescence de chaque organe est obtenue en additionnant la valeur de luminescence de chaque fragment d'organe (C). Pour l'ascite (ou liquide de lavage péritonéal), 150 µL de cette suspension cellulaire sont déposés dans des plaque 96 puits à fond blanc et 50 µL de luciférine sont ajoutés pour obtenir l'intensité de luminescence des ascites (C).



Les résultats font état d'une augmentation de la luminescence dans la rate, le péritoine et le diaphragme des souris non traitées ayant reçu une co-injection de MSC et de cellules ID8luc comparée à la luminescence de ces mêmes organes issus de souris ayant eu une injection de cellules ID8luc seules. De même, concernant les souris traitées au carboplatine, l'étude de la luminescence de ces organes montre également une augmentation de la luminescence pour les souris ayant reçu une co-injection de MSC et de cellules ID8luc comparée aux souris ayant eu une injection de cellules ID8luc seules (Fig. 10C). En revanche, dans ce modèle expérimental murin, la dissémination au niveau du foie semble très faible car la luminescence détectée dans cet organe est proche du bruit de fond (Fig. 10C).

Ce modèle expérimental murin montre ainsi une progression tumorale des cellules ID8luc plus importante en présence de MSC, au niveau de la cavité abdominale entière et plus précisément dans le diaphragme, la rate et le péritoine. Ces MSC murines ont donc un effet pro-tumoral. Cet effet pro-tumoral est également observé par l'étude de la luminescence du corps entier, du diaphragme, de la rate, du péritoine et de l'ascite, qui est plus importante chez les souris traitées au carboplatine et ayant eu une injection de MSC que chez celles sans MSC. De plus, la luminescence abdominale mais également des organes des souris traitées par carboplatine ayant reçu une injection de MSC est comparable à la luminescence observée chez des souris non traitées ayant reçu une injection de cellules ID8luc seules. Cependant, nous ne pouvons pas conclure sur l'effet chimioprotecteur des MSC vis-à-vis des CTO ID8luc. En effet, l'augmentation du volume tumoral en présence de MSC dans les souris traitées au carboplatine pourrait être causé par une plus forte prolifération des CTO mais pas forcément par une augmentation de la résistance des CTO. Ce modèle permet de démontrer un rôle pro-tumoral des MSC sans toutefois permettre de conclure sur leur rôle chimioprotecteur.

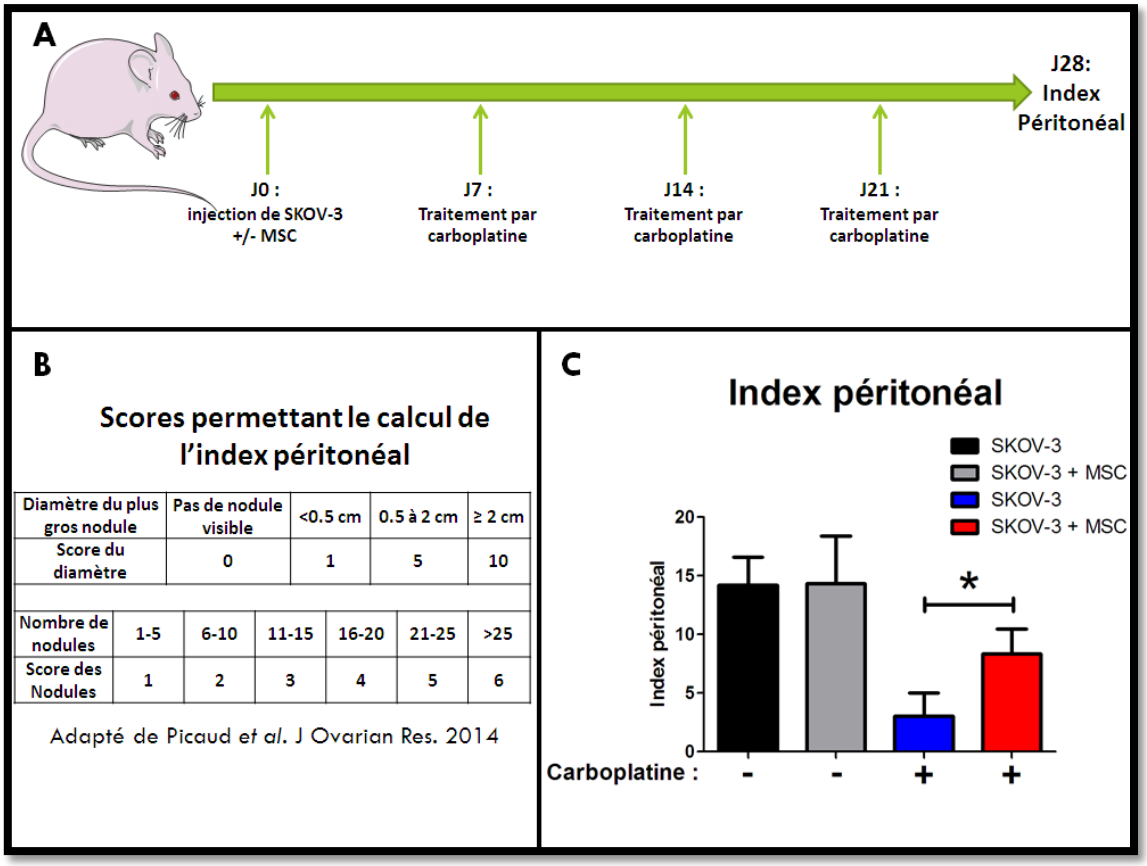
### 2) Modèle expérimental d'adénocarcinome ovarien réalisé chez la souris avec des CTO et des MSC humaines

Pour évaluer, *in vivo*, le rôle de MSC humaines sur des CTO humaines, nous avons également utilisé un modèle expérimental murin. Afin que les CTO et les MSC humaines ne soient pas rejetées par le système immunitaire des souris, ce modèle nécessitait l'utilisation de souris immunodéprimées comme les souris nudes. Les souris nudes sont des souris présentant une aplasie du thymus provoquant une absence de lymphocytes T.

Une injection de CTO humaines SKOV-3 a été réalisée sur des souris nudes, pouvant être associée ou non à une injection de BM-MSC humaines (issues de sujets ne présentant pas de cancer connu au moment du don). Etant donné que les cellules SKOV-3 n'expriment pas la luciférase, la progression tumorale est évaluée par le calcul d'un index péritonéal (Fig. 11A), adapté de Picaud *et al.*[184], prenant en compte le nombre de nodules et le diamètre du plus gros nodule tumoral (Fig. 11B). Cet index péritonéal est obtenu en multipliant le score du diamètre du plus gros nodule par le score dépendant du nombre total de nodules.

Figure 11 : Effet des MSC sur la résistance des CTO SKOV-3 au carboplatine dans un modèle expérimental murin

A J0, $10.10^6$ cellules SKOV-3 +/- $6{,}5.10^5$ BM-MSC (issues de têtes fémorales de donneuses ayant subie une chirurgie de la hanche et ne présentant pas de cancer au moment de cette chirurgie) sont injectées dans des souris nudes. Les souris sont traitées à partir de J7. Le traitement par carboplatine consiste à réaliser une injection de 200µL d'une solution de carboplatine à 4mg/mL tous les 7 jours pendant 3 semaines. Après 28 jours, soit 7 jours après la dernière injection de carboplatine, le volume tumoral est évalué par le calcul d'un index péritonéal (A). Le calcul de l'index nécessite l'obtention de 2 scores, le premier score est établi en fonction du diamètre du plus gros nodule péritonéal et le second dépend du nombre total de nodules observés au niveau de la cavité abdominale (B). L'index péritonéal est calculé en multipliant ces 2 scores dans les souris étudiées (C).




| Diamètre du plus gros nodule | Pas de nodule visible | <0.5 cm | 0.5 à 2 cm | ≥ 2 cm |
|---|---|---|---|---|
| Score du diamètre | 0 | 1 | 5 | 10 |

| Nombre de nodules | 1-5 | 6-10 | 11-15 | 16-20 | 21-25 | >25 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Score des Nodules | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |

Adapté de Picaud *et al.* J Ovarian Res. 2014

Contrairement aux résultats du modèle expérimental totalement murin présentés précédemment, la co-injection des BM-MSC avec des CTO SKOV-3 ne modifie pas la progression tumorale dans ce modèle (Fig. 11C). Cependant, lors du traitement par carboplatine, l'index péritonéal est plus élevé chez les souris ayant eu une co-injection de MSC avec des cellules SKOV-3 que chez les souris ayant eu une injection de CTO seules. La présence de MSC au contact de la tumeur entraîne une augmentation de la résistance des CTO au carboplatine (Fig. 11C).

Ainsi, ce modèle expérimental murin permettant d'évaluer des cellules humaines (SKOV-3 et BM-MSC), a permis de montrer également un rôle pro-tumoral des MSC vis-à-vis des CTO. Dans ce modèle, contrairement au modèle expérimental totalement murin (CTO ID8luc et MSC murines), le rôle pro-tumoral des MSC n'est pas dû à une augmentation de la prolifération tumorale mais à une résistance des CTO au carboplatine. Il permet de valider les résultats obtenus *in vitro* montrant l'induction de la chimiorésistance des CTO par des CA-MSC.

# III) DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les MSC semblent avoir un effet pro-tumoral dans plusieurs types de cancer et pourraient jouer un rôle chimioprotecteur par divers mécanismes nécessitant un contact direct avec les cellules tumorales ou *via* leurs sécrétions. Le contact direct des MSC avec les cellules tumorales peut induire une résistance des cellules tumorales aux chimiothérapies par une modification de l'expression de canaux à la surface des cellules tumorales, par un échange membranaire de protéines MDR, par un arrêt du cycle cellulaire rendant les cellules quiescentes et insensibles aux agents cytotoxiques, par une activation de voies de signalisation telles que NF-κB et (Wnt)/β-catenine, ou encore par une modification de la transcription des cellules tumorales. De même, les MSC sont capables d'entraîner une augmentation de la chimiorésistance des cellules tumorales par la sécrétion de diverses molécules comme l'IL-6, le SDF-1, le GDF-15, des acides gras, des acides aminés, ou des exosomes contenant une multitude de molécules. Ces sécrétions peuvent conduire à l'activation de voies de signalisation comme la voie PI3K/Akt ou la voie JAK/STAT aboutissant notamment à une sur-expression de protéines anti-apoptotiques responsables de la résistance à de nombreux médicaments cytotoxiques.

Nos travaux ont pu mettre en évidence que des CA-MSC étaient retrouvées associées aux cellules tumorales dans le cancer ovarien. Les CA-MSC issues de patientes atteintes d'adénocarcinome ovarien sont également capable d'induire une résistance au carboplatine des CTO *in vitro*. Ces CA-MSC pourraient dériver de MSC physiologiques qui, au contact d'un environnement tumoral, acquièrent une modification de leur phénotype conduisant notamment à la sécrétion de facteurs chimioprotecteurs. En effet, ce phénomène a pu être observé grâce à la mise en place d'un modèle *in vitro* utilisant des BM-MSC issues de sujets naïfs de cancer. Ainsi, nous avons pu montrer que ces BM-MSC, lorsqu'elles sont cultivées en présence d'un environnement tumoral ovarien, sont capables de sécréter des molécules induisant une chimiorésistance des CTO, contrairement au BM-MSC cultivées dans du milieu contrôle.

Le rôle pro-tumoral des MSC observé *in vitro* a pu être confirmé *in vivo* dans deux modèles expérimentaux murins. Le premier modèle utilisant des CTO et des MSC murines a montré, après traitement par carboplatine, un volume tumoral plus important dans les souris ayant reçu une co-injection de CTO et de MSC par rapport aux souris ayant eu une injection de CTO seules. Un mécanisme de résistance peut-être évoqué, bien que cette augmentation puisse être simplement induite par une augmentation de la prolifération tumorale. Cette prolifération est d'ailleurs indéniable au vu des résultats obtenus avec les souris non traitées. En revanche, dans un second modèle murin plus humanisé, avec des CTO et des MSC humaines, un effet chimioprotecteur des MSC sur les cellules tumorales a pu clairement être démontré.

Ainsi, il semble que dans le cancer ovarien, comme dans de nombreux types de cancers, les MSC jouent un rôle pro-tumoral et notamment chimioprotecteur. De nombreux mécanismes semblent impliqués dans la chimiorésistance induite par les MSC. Dans notre modèle de cancer ovarien, le mécanisme précis de cette résistance au carboplatine reste encore à

déterminer. Cependant, il semble que les MSC acquièrent leur capacité chimio-protectrice lorsqu'elles sont en présence d'un environnement tumoral. En effet, seules les CA-MSC ou les CA-MSC « induites » (par culture dans un milieu simulant un environnement tumoral ovarien) sont capables de protéger les CTO du traitement par carboplatine contrairement à des BM-MSC cultivées dans du milieu contrôle. Ces CA-MSC et CA-MSC « induites » sont capable d'induire cette chimiorésistance *in vitro* via leur milieu conditionné. Ainsi, cette chimiorésistance implique des facteurs sécrétés par ces cellules. Dans la bibliographie, de nombreux facteurs sécrétés par les MSC ont pu être identifiés comme étant chimioprotecteurs tels que le SDF-1, l'IL-6, des acides gras polyinsaturés, des acides aminés, *etc*.

Pour identifier les facteurs sécrétés par les MSC et responsables de la chimiorésistance, l'analyse des CA-MSC « induites » générées par notre modèle semble être adéquate. En effet, la mise en place de ce modèle rend possible la comparaison de différentes MSC issues d'un même donneur, permettant ainsi de s'affranchir de la variabilité interindividuelle. Une analyse transcriptomique comparant des BM-MSC saines avec des CA-MSC « induites » issues du même donneur permettrait d'identifier des candidats potentiellement impliqués dans cette chimiorésistance. La sécrétion de facteurs pourra alors être étudiée, par exemple par un test ELISA, afin de valider au niveau protéique les résultats obtenus lors de l'étude de la transcription des gènes en ARN. L'identification de cibles thérapeutiques potentielles permettra d'étudier des molécules inhibant ces cibles afin d'évaluer leur impact sur la sensibilité au traitement par carboplatine dans des études *in vivo* et *in vitro.*

La chimiorésistance des CTO SKOV-3, obtenue *in vitro* avec les CA-MSC « induites », est assez faible voire absente. Cependant, la co-injection de MSC avec les cellules SKOV-3 conduit à une augmentation de leur résistance *in vivo*, observée dans un modèle expérimental murin. Ces résultats évoquent une action indirecte des MSC sur la chimiorésistance en impliquant un autre type cellulaire. Des résultats du laboratoire ont montré que des cellules assimilées à des CA-MSC (Hospicells), issues d'une patiente atteinte d'un cancer ovarien, étaient capables de recruter des macrophages au niveau du site tumoral et que ces macrophages avaient un phénotype de TAM ayant une polarisation M2[22]. Dans le cancer ovarien, une infiltration de macrophages de type M2 est de mauvais pronostic. Ainsi, dans notre modèle, la chimiorésistance observée lors de la co-injection de MSC et de CTO SKOV-3 pourrait impliquer les macrophages. L'interaction des MSC avec d'autres cellules du microenvironnement comme les macrophages devrait être étudiée afin de déterminer leurs rôles dans la chimiorésistance.

# IV) BIBLIOGRAPHIE


1. Kohno, M. & Pouyssegur, J. Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy. *Ann. Med.* **38,** 200–211 (2006).

2. Roberts, P. J. & Der, C. J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* **26,** 3291–3310 (2007).

3. Tsimberidou, A.-M. Targeted therapy in cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **76,** 1113–1132 (2015).

4. *Vidal 2017: le dictionnaire.* (Vidal, 2017).

5. Keam, B. *et al.* In vitro anticancer activity of PI3K alpha selective inhibitor BYL719 in head and neck cancer. *Anticancer Res.* **35,** 175–182 (2015).

6. Estey, E. H. Epigenetics in clinical practice: the examples of azacitidine and decitabine in myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* **27,** 1803–1812 (2013).

7. Boissel, N. Thérapeutiques ciblées dans les leucémies aiguës. *Réanimation* **15,** 278–284 (2006).

8. Degos, L., Castaigne, S., Fenaux, P., Daniel, M. & Chomienne, C. Le traitement des leucémies aiguës à promyélocytes par l'acide tout-trans rétinoïque. *médecine/sciences* **7,** 460 (1991).

9. Redman, J. M., Hill, E. M., AlDeghaither, D. & Weiner, L. M. Mechanisms of action of therapeutic antibodies for cancer. *Mol. Immunol.* **67,** 28–45 (2015).

10. Bosly, A. Anticorps monoclonal anti-CD20 (rituximab) dans les maladies hématologiques et les affections auto-immunes. *Réanimation* **15,** 270–277 (2006).

11. Bodet-Milin, C., Oudoux, A. & Kraeber-Bodéré, F. La radio-immunothérapie. *Médecine Nucl.* **33,** 148–151 (2009).

12. Hui, L. & Chen, Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett.* **368,** 7–13 (2015).

13. Castells, M., Thibault, B., Delord, J.-P. & Couderc, B. Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death. *Int. J. Mol. Sci.* **13,** 9545–9571 (2012).

14. Thibault, B., Castells, M., Delord, J.-P. & Couderc, B. Ovarian cancer microenvironment: implications for cancer dissemination and chemoresistance acquisition. *Cancer Metastasis Rev.* **33,** 17–39 (2014).

15. Hamanishi, J. *et al.* Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104,** 3360–3365 (2007).

16. Sato, E. *et al.* Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102,** 18538–18543 (2005).

17. Bokemeyer, C. *et al.* A phase II study of catumaxomab administered intra- and postoperatively as part of a multimodal approach in primarily resectable gastric cancer. *Gastric Cancer Off. J. Int. Gastric Cancer Assoc. Jpn. Gastric Cancer Assoc.* **18,** 833–842 (2015).

18. Goebeler, M.-E. & Bargou, R. Blinatumomab: a CD19/CD3 bispecific T cell engager (BiTE) with unique anti-tumor efficacy. *Leuk. Lymphoma* **57,** 1021–1032 (2016).

19. Wu, J., Fu, J., Zhang, M. & Liu, D. Blinatumomab: a bispecific T cell engager (BiTE) antibody against CD19/CD3 for refractory acute lymphoid leukemia. *J. Hematol. Oncol.J Hematol Oncol* **8,** 104 (2015).

20. De Palma, M. & Lewis, C. E. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell* **23,** 277–286 (2013).

21. Pollard, J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **4,** 71–78 (2004).

22. Castells, M. *et al.* Ovarian ascites-derived Hospicells promote angiogenesis via activation of macrophages. *Cancer Lett.* **326,** 59–68 (2012).

23. Guo, C., Buranych, A., Sarkar, D., Fisher, P. B. & Wang, X.-Y. The role of tumor-associated macrophages in tumor vascularization. *Vasc. Cell* **5,** 20 (2013).

24. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **3,** 23–35 (2003).

25. Chen, P. & Bonaldo, P. Role of macrophage polarization in tumor angiogenesis and vessel normalization: implications for new anticancer therapies. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **301,** 1–35 (2013).

26. Duluc, D. *et al.* Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* **110,** 4319–4330 (2007).

27. Gelhorn, H. L. *et al.* Patient-reported Symptoms of Tenosynovial Giant Cell Tumors. *Clin. Ther.* **38,** 778–793 (2016).

28. Nath, S. & Mukherjee, P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol. Med.* **20,** 332–342 (2014).

29. Arriola, E. & Ottensmeier, C. TG4010: a vaccine with a therapeutic role in cancer. *Immunotherapy* **8,** 511–519 (2016).

30. Kotla, V. *et al.* Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies. *J. Hematol. Oncol.J Hematol Oncol* **2,** 36 (2009).

31. Leleu, X. *et al.* [Thalidomide: mechanisms of action and new insights in hematology]. *Rev. Med. Interne* **26,** 119–127 (2005).

32. Fouquet, G. *et al.* [Pomalidomide for multiple myeloma]. *Rev. Med. Interne* **36,** 613–618 (2015).

33. Leclers, D. *et al.* [Lymphatic vessels and cancer]. *Med. Sci. MS* **21,** 839–847 (2005).

34. www.clinicaltrials.org.

35. Wilson, W. R. & Hay, M. P. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **11,** 393–410 (2011).

36. Jain, R. K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* **307,** 58–62 (2005).

37. Sefidgar, M. *et al.* Numerical modeling of drug delivery in a dynamic solid tumor microvasculature. *Microvasc. Res.* **99,** 43–56 (2015).

38. Cosse, J.-P. & Michiels, C. Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Anticancer Agents Med. Chem.* **8,** 790–797 (2008).

39. Régina, A. *et al.* Multidrug resistance in brain tumors: roles of the blood-brain barrier. *Cancer Metastasis Rev.* **20,** 13–25 (2001).

40. Huang, R. S. & Ratain, M. J. Pharmacogenetics and pharmacogenomics of anticancer agents. *CA. Cancer J. Clin.* **59,** 42–55 (2009).

41. Wang, J. & Huang, Y. Pharmacogenomics of sex difference in chemotherapeutic toxicity. *Curr. Drug Discov. Technol.* **4,** 59–68 (2007).

42. Milano, G. & Chamorey, A.-L. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil with consideration of chronopharmacokinetics. *Chronobiol. Int.* **19,** 177–189 (2002).

43. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* **31,** 1869–1883 (2012).

44. Chatelut, E., Canal, P. & Bugat, R. [Pharmacokinetics and individual dose adjustment of carboplatin]. *Bull. Cancer (Paris)* **87 Spec No,** 17–23 (2000).

45. Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B. & Johnston, P. G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **13,** 714–726 (2013).

46. Sève, P., Reiman, T. & Dumontet, C. The role of betaIII tubulin in predicting chemoresistance in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst. Neth.* **67,** 136–143 (2010).

47. Keating, A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell* **10,** 709–716 (2012).

48. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8,** 315–317 (2006).

49. Mohal, J. S., Tailor, H. D. & Khan, W. S. Sources of adult mesenchymal stem cells and their applicability for musculoskeletal applications. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **7,** 103–109 (2012).

50. He, Q., Wan, C. & Li, G. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells Dayt. Ohio* **25,** 69–77 (2007).

51. Boeuf, S. & Richter, W. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells: role of tissue source and inducing factors. *Stem Cell Res. Ther.* **1,** 31 (2010).

52. Rastegar, F. *et al.* Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. *World J. Stem Cells* **2,** 67–80 (2010).

53. Chen, G. *et al.* In vivo real-time visualization of mesenchymal stem cells tropism for cutaneous regeneration using NIR-II fluorescence imaging. *Biomaterials* **53,** 265–273 (2015).

54. Pittenger, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284,** 143–147 (1999).

55. Jiang, Y. *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418,** 41–49 (2002).

56. Hocking, A. M. & Gibran, N. S. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Exp. Cell Res.* **316,** 2213–2219 (2010).

57. Dittmer, J. & Leyh, B. Paracrine effects of stem cells in wound healing and cancer progression (Review). *Int. J. Oncol.* **44,** 1789–1798 (2014).

58. Santos, J. M. *et al.* Three-dimensional spheroid cell culture of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells leads to enhanced paracrine induction of wound healing. *Stem Cell Res. Ther.* **6,** 90 (2015).

59. Akram, K. M., Samad, S., Spiteri, M. A. & Forsyth, N. R. Mesenchymal stem cells promote alveolar epithelial cell wound repair in vitro through distinct migratory and paracrine mechanisms. *Respir. Res.* **14,** 9 (2013).

60. Touboul, C., Vidal, F., Pasquier, J., Lis, R. & Rafii, A. Role of mesenchymal cells in the natural history of ovarian cancer: a review. *J. Transl. Med.* **12,** 271 (2014).

61. Li, H. & Fu, X. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cutaneous wound repair and regeneration. *Cell Tissue Res.* **348,** 371–377 (2012).

62. Chen, L., Tredget, E. E., Wu, P. Y. G. & Wu, Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PloS One* **3,** e1886 (2008).

63. Martinet, L. *et al.* Hospicells derived from ovarian cancer stroma inhibit T-cell immune responses. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **126,** 2143–2152 (2010).

64. Martinet, L. *et al.* A regulatory cross-talk between Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes and mesenchymal stem cells. *Eur. J. Immunol.* **39,** 752–762 (2009).

65. Taran, R. *et al.* In vitro and in vivo neurogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from different sources. *J. Biosci.* **39,** 157–169 (2014).

66. Joyce, N. *et al.* Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen. Med.* **5,** 933–946 (2010).

67. Teixeira, F. G., Carvalho, M. M., Sousa, N. & Salgado, A. J. Mesenchymal stem cells secretome: a new paradigm for central nervous system regeneration? *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **70,** 3871–3882 (2013).

68. Lewis, C. M. & Suzuki, M. Therapeutic applications of mesenchymal stem cells for amyotrophic lateral sclerosis. *Stem Cell Res. Ther.* **5,** 32 (2014).

69. Ferroni, L. *et al.* Potential for neural differentiation of mesenchymal stem cells. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **129,** 89–115 (2013).

70. Sadan, O., Melamed, E. & Offen, D. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cell therapy for neurodegenerative diseases. *Expert Opin. Biol. Ther.* **9,** 1487–1497 (2009).

71. Frausin, S. *et al.* Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells: Biological properties, induction of neuronal phenotype and current applications in neurodegeneration research. *Acta Histochem.* **117,** 329–338 (2015).

72. Park, J. S., Suryaprakash, S., Lao, Y.-H. & Leong, K. W. Engineering mesenchymal stem cells for regenerative medicine and drug delivery. *Methods San Diego Calif* **84,** 3–16 (2015).

73. Murphy, M. B., Moncivais, K. & Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp. Mol. Med.* **45,** e54 (2013).

74. Putz Todd, G., Danilkovitch-Miagkova, A. & LeRoux, M. A. *Mesenchymal Stem Cells as Vehicles for Targeted Therapies*. (INTECH Open Access Publisher, 2011).

75. Spaeth, E., Klopp, A., Dembinski, J., Andreeff, M. & Marini, F. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther.* **15,** 730–738 (2008).

76. Uchiyama, H., Barut, B. A., Mohrbacher, A. F., Chauhan, D. & Anderson, K. C. Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood* **82,** 3712–3720 (1993).

77. Olechnowicz, S. W. Z. & Edwards, C. M. Contributions of the host microenvironment to cancer-induced bone disease. *Cancer Res.* **74,** 1625–1631 (2014).

78. Kaplan, R. N. *et al.* VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* **438,** 820–827 (2005).

79. Kucerova, L. & Skolekova, S. Tumor microenvironment and the role of mesenchymal stromal cells. *Neoplasma* **60,** 1–10 (2013).

80. Barcellos-de-Souza, P., Gori, V., Bambi, F. & Chiarugi, P. Tumor microenvironment: bone marrow-mesenchymal stem cells as key players. *Biochim. Biophys. Acta* **1836,** 321–335 (2013).

81. Kidd, S. *et al.* Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells Dayt. Ohio* **27,** 2614–2623 (2009).

82. Carrero, R. *et al.* IL1β induces mesenchymal stem cells migration and leucocyte chemotaxis through NF-κB. *Stem Cell Rev.* **8,** 905–916 (2012).

83. Liu, X. *et al.* SDF-1/CXCR4 axis modulates bone marrow mesenchymal stem cell apoptosis, migration and cytokine secretion. *Protein Cell* **2,** 845–854 (2011).

84. Houthuijzen, J. M., Daenen, L. G. M., Roodhart, J. M. L. & Voest, E. E. The role of mesenchymal stem cells in anti-cancer drug resistance and tumour progression. *Br. J. Cancer* **106,** 1901–1906 (2012).

85. Roodhart, J. M. L. *et al.* Mesenchymal stem cells induce resistance to chemotherapy through the release of platinum-induced fatty acids. *Cancer Cell* **20,** 370–383 (2011).

86. Karnoub, A. E. *et al.* Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* **449,** 557–563 (2007).

87. Lis, R. *et al.* Mesenchymal cell interaction with ovarian cancer cells induces a background dependent pro-metastatic transcriptomic profile. *J. Transl. Med.* **12,** 59 (2014).

88. Meads, M. B., Hazlehurst, L. A. & Dalton, W. S. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **14,** 2519–2526 (2008).

89. Rafii, A. *et al.* Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours. *PloS One* **3,** e3894 (2008).

90. Pasquet, M. *et al.* Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **126,** 2090–2101 (2010).

91. Castells, M. *et al.* Microenvironment mesenchymal cells protect ovarian cancer cell lines from apoptosis by inhibiting XIAP inactivation. *Cell Death Dis.* **4,** e887 (2013).

92. Bochet, L. *et al.* Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res.* **73,** 5657–5668 (2013).

93. Takahara, K. *et al.* Adipose-derived stromal cells inhibit prostate cancer cell proliferation inducing apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446,** 1102–1107 (2014).

94. Mueller, L. P. *et al.* Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy: evidence of resistance to apoptosis induction. *Stem Cells Dayt. Ohio* **24,** 2753–2765 (2006).

95. Beane, O. S., Fonseca, V. C. & Darling, E. M. Adipose-derived stem cells retain their regenerative potential after methotrexate treatment. *Exp. Cell Res.* **327,** 222–233 (2014).

96. Burger, J. A. & Kipps, T. J. Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leuk. Lymphoma* **43,** 461–466 (2002).

97. Meads, M. B., Gatenby, R. A. & Dalton, W. S. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat. Rev. Cancer* **9,** 665–674 (2009).

98. Kurtova, A. V. *et al.* Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood* **114,** 4441–4450 (2009).

99. Bewry, N. N. *et al.* Stat3 contributes to resistance toward BCR-ABL inhibitors in a bone marrow microenvironment model of drug resistance. *Mol. Cancer Ther.* **7,** 3169–3175 (2008).

100. Brocke-Heidrich, K. *et al.* Interleukin-6-dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a Bcl-2 family-independent survival pathway closely associated with Stat3 activation. *Blood* **103,** 242–251 (2004).

101. Yamagiwa, Y., Marienfeld, C., Meng, F., Holcik, M. & Patel, T. Translational regulation of x-linked inhibitor of apoptosis protein by interleukin-6: a novel mechanism of tumor cell survival. *Cancer Res.* **64,** 1293–1298 (2004).

102. Moreaux, J. *et al.* BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone. *Blood* **103,** 3148–3157 (2004).

103. Jin, L. *et al.* CXCR4 up-regulation by imatinib induces chronic myelogenous leukemia (CML) cell migration to bone marrow stroma and promotes survival of quiescent CML cells. *Mol. Cancer Ther.* **7,** 48–58 (2008).

104. Ji, R. *et al.* Exosomes derived from human mesenchymal stem cells confer drug resistance in gastric cancer. *Cell Cycle Georget. Tex* **14,** 2473–2483 (2015).

105. Lis, R. *et al.* Mesenchymal cell interaction with ovarian cancer cells triggers pro-metastatic properties. *PloS One* **7,** e38340 (2012).

106. Gupta, M. *et al.* Hematopoietic cells from Gadd45a- and Gadd45b-deficient mice are sensitized to genotoxic-stress-induced apoptosis. *Oncogene* **24,** 7170–7179 (2005).

107. De Smaele, E. *et al.* Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature* **414,** 308–313 (2001).

108. Riganti, C., Kopecka, J., Panada, E., Barak, S. & Rubinstein, M. The role of C/EBP-β LIP in multidrug resistance. *J. Natl. Cancer Inst.* **107,** (2015).

109. Pillozzi, S. *et al.* Chemotherapy resistance in acute lymphoblastic leukemia requires hERG1 channels and is overcome by hERG1 blockers. *Blood* **117,** 902–914 (2011).

110. Mraz, M. *et al.* Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin α-4-β-1 (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance. *Br. J. Haematol.* **155,** 53–64 (2011).

111. Xu, J., Zhou, P., Wang, W., Sun, A. & Guo, F. RelB, together with RelA, sustains cell survival and confers proteasome inhibitor sensitivity of chronic lymphocytic leukemia cells from bone marrow. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **92,** 77–92 (2014).

112. Yang, Y. *et al.* Wnt pathway contributes to the protection by bone marrow stromal cells of acute lymphoblastic leukemia cells and is a potential therapeutic target. *Cancer Lett.* **333,** 9–17 (2013).

113. Zhang, B. *et al.* Microenvironmental protection of CML stem and progenitor cells from tyrosine kinase inhibitors through N-cadherin and Wnt-β-catenin signaling. *Blood* **121,** 1824–1838 (2013).

114. Scherzed, A. *et al.* BMSC enhance the survival of paclitaxel treated squamous cell carcinoma cells in vitro. *Cancer Biol. Ther.* **11,** 349–357 (2011).

115. Borriello, L. & DeClerck, Y. A. [Tumor microenvironment and therapeutic resistance process]. *Médecine Sci. MS* **30,** 445–451 (2014).

116. Sanz-Rodríguez, F., Hidalgo, A. & Teixidó, J. Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood* **97,** 346–351 (2001).

117. Yanamandra, N. *et al.* Tipifarnib and bortezomib are synergistic and overcome cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma and acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **12,** 591–599 (2006).

118. Dai, Y., Lawrence, T. S. & Xu, L. Overcoming cancer therapy resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins and nuclear factor-kappa B. *Am. J. Transl. Res.* **1,** 1–15 (2009).

119. Antoon, J. W. *et al.* Targeting NFκB mediated breast cancer chemoresistance through selective inhibition of sphingosine kinase-2. *Cancer Biol. Ther.* **11,** 678–689 (2011).

120. Lundqvist, J., Yde, C. W. & Lykkesfeldt, A. E. 1α,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits cell growth and NFκB signaling in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Steroids* **85,** 30–35 (2014).

121. Cilloni, D. *et al.* The NF-kappaB pathway blockade by the IKK inhibitor PS1145 can overcome imatinib resistance. *Leukemia* **20,** 61–67 (2006).

122. Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. & Kemler, R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* **16,** 3797–3804 (1997).

123. Tian, J., He, H. & Lei, G. Wnt/β-catenin pathway in bone cancers. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **35,** 9439–9445 (2014).

124. Kahn, M. Can we safely target the WNT pathway? *Nat. Rev. Drug Discov.* **13,** 513–532 (2014).

125. Xia, B. *et al.* c-Myc plays part in drug resistance mediated by bone marrow stromal cells in acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* **39,** 92–99 (2015).

126. Kadera, B. E. *et al.* MicroRNA-21 in pancreatic ductal adenocarcinoma tumor-associated fibroblasts promotes metastasis. *PloS One* **8,** e71978 (2013).

127. Cuiffo, B. G. & Karnoub, A. E. Mesenchymal stem cells in tumor development: emerging roles and concepts. *Cell Adhes. Migr.* **6,** 220–230 (2012).

128. Koh, B. I. & Kang, Y. The pro-metastatic role of bone marrow-derived cells: a focus on MSCs and regulatory T cells. *EMBO Rep.* **13,** 412–422 (2012).

129. Bergfeld, S. A. & DeClerck, Y. A. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev.* **29,** 249–261 (2010).

130. Lo Iacono, M. *et al.* ATF2 contributes to cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and celastrol induces cisplatin resensitization through inhibition of JNK/ATF2 pathway. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **136,** 2598–2609 (2015).

131. Lau, E. *et al.* Transcriptional repression of IFNβ1 by ATF2 confers melanoma resistance to therapy. *Oncogene* (2015). doi:10.1038/onc.2015.22

132. Ronai, Z. *et al.* ATF2 confers radiation resistance to human melanoma cells. *Oncogene* **16,** 523–531 (1998).

133. Lauchle, J. O. *et al.* Response and resistance to MEK inhibition in leukaemias initiated by hyperactive Ras. *Nature* **461,** 411–414 (2009).

134. Takahashi, M. *et al.* Loss of B-cell translocation gene 2 expression in estrogen receptor-positive breast cancer predicts tamoxifen resistance. *Cancer Sci.* **105,** 675–682 (2014).

135. Nefedova, Y., Landowski, T. H. & Dalton, W. S. Bone marrow stromal-derived soluble factors and direct cell contact contribute to de novo drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms. *Leukemia* **17,** 1175–1182 (2003).

136. Lwin, T. *et al.* Cell adhesion induces p27Kip1-associated cell-cycle arrest through down-regulation of the SCFSkp2 ubiquitin ligase pathway in mantle-cell and other non-Hodgkin B-cell lymphomas. *Blood* **110,** 1631–1638 (2007).

137. Wei, Z. *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells from leukemia patients inhibit growth and apoptosis in serum-deprived K562 cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **28,** 141 (2009).

138. Ramasamy, R. *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Leukemia* **21,** 304–310 (2007).

139. Nefedova, Y., Cheng, P., Alsina, M., Dalton, W. S. & Gabrilovich, D. I. Involvement of Notch-1 signaling in bone marrow stroma-mediated de novo drug resistance of myeloma and other malignant lymphoid cell lines. *Blood* **103,** 3503–3510 (2004).

140. Nwabo Kamdje, A. H. *et al.* Notch-3 and Notch-4 signaling rescue from apoptosis human B-ALL cells in contact with human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Blood* **118,** 380–389 (2011).

141. Nwabo Kamdje, A. H. *et al.* Role of stromal cell-mediated Notch signaling in CLL resistance to chemotherapy. *Blood Cancer J.* **2,** e73 (2012).

142. Zeng, Z. *et al.* Inhibition of CXCR4 with the novel RCP168 peptide overcomes stroma-mediated chemoresistance in chronic and acute leukemias. *Mol. Cancer Ther.* **5,** 3113–3121 (2006).

143. Corcoran, K. E. *et al.* Mesenchymal stem cells in early entry of breast cancer into bone marrow. *PloS One* **3,** e2563 (2008).

144. Vianello, F. *et al.* Bone marrow mesenchymal stromal cells non-selectively protect chronic myeloid leukemia cells from imatinib-induced apoptosis via the CXCR4/CXCL12 axis. *Haematologica* **95,** 1081–1089 (2010).

145. Lis, R. *et al.* Tumor associated mesenchymal stem cells protects ovarian cancer cells from hyperthermia through CXCL12. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **128,** 715–725 (2011).

146. Kim, J.-A. *et al.* Microenvironmental remodeling as a parameter and prognostic factor of heterogeneous leukemogenesis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.* **75,** 2222–2231 (2015).

147. Peled, A. *et al.* Immature leukemic CD34+CXCR4+ cells from CML patients have lower integrin-dependent migration and adhesion in response to the chemokine SDF-1. *Stem Cells Dayt. Ohio* **20,** 259–266 (2002).

148. Kojima, K. *et al.* p53 activation of mesenchymal stromal cells partially abrogates microenvironment-mediated resistance to FLT3 inhibition in AML through HIF-1α-mediated down-regulation of CXCL12. *Blood* **118,** 4431–4439 (2011).

149. Hubin, F. *et al.* Murine bone marrow stromal cells sustain in vivo the survival of hematopoietic stem cells and the granulopoietic differentiation of more mature progenitors. *Stem Cells Dayt. Ohio* **23,** 1626–1633 (2005).

150. Hoellenriegel, J. *et al.* The Spiegelmer NOX-A12, a novel CXCL12 inhibitor, interferes with chronic lymphocytic leukemia cell motility and causes chemosensitization. *Blood* **123,** 1032–1039 (2014).

151. Greco, S. J. *et al.* AMD3100-mediated production of interleukin-1 from mesenchymal stem cells is key to chemosensitivity of breast cancer cells. *Am. J. Cancer Res.* **1,** 701–715 (2011).

152. Rossi, J.-F., Lu, Z.-Y., Jourdan, M. & Klein, B. Interleukin-6 as a therapeutic target. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **21,** 1248–1257 (2015).

153. Lichtenstein, A., Tu, Y., Fady, C., Vescio, R. & Berenson, J. Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells. *Cell. Immunol.* **162,** 248–255 (1995).

154. Frassanito, M. A., Cusmai, A., Iodice, G. & Dammacco, F. Autocrine interleukin-6 production and highly malignant multiple myeloma: relation with resistance to drug-induced apoptosis. *Blood* **97,** 483–489 (2001).

155. Duan, Z. *et al.* Signal transducers and activators of transcription 3 pathway activation in drug-resistant ovarian cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **12,** 5055–5063 (2006).

156. Dreuw, A. *et al.* Interleukin-6-type cytokines upregulate expression of multidrug resistance-associated proteins in NHEK and dermal fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **124,** 28–37 (2005).

157. Shain, K. H. *et al.* Beta1 integrin adhesion enhances IL-6-mediated STAT3 signaling in myeloma cells: implications for microenvironment influence on tumor survival and proliferation. *Cancer Res.* **69,** 1009–1015 (2009).

158. Wang, Y. *et al.* Autocrine production of interleukin-6 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Lett.* **295,** 110–123 (2010).

159. Wang, Y. *et al.* Autocrine production of interleukin-6 confers ovarian cancer cells resistance to tamoxifen via ER isoforms and SRC-1. *Mol. Cell. Endocrinol.* **382,** 791–803 (2014).

160. Efferth, T., Fabry, U. & Osieka, R. Interleukin-6 affects melphalan-induced DNA damage and repair in human multiple myeloma cells. *Anticancer Res.* **22,** 231–234 (2002).

161. Corre, J. *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. *Leukemia* **21,** 1079–1088 (2007).

162. Golay, J. *et al.* The histone deacetylase inhibitor ITF2357 has anti-leukemic activity in vitro and in vivo and inhibits IL-6 and VEGF production by stromal cells. *Leukemia* **21,** 1892–1900 (2007).

163. Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M. & Bilanges, B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11,** 329–341 (2010).

164. Thorpe, L. M., Yuzugullu, H. & Zhao, J. J. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat. Rev. Cancer* **15,** 7–24 (2015).

165. Sheng, X. & Mittelman, S. D. The role of adipose tissue and obesity in causing treatment resistance of acute lymphoblastic leukemia. *Front. Pediatr.* **2,** 53 (2014).

166. Tung, S. *et al.* PPARα and fatty acid oxidation mediate glucocorticoid resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **122,** 969–980 (2013).

167. Kurtova, A. V. *et al.* Blocking PGE2-induced tumour repopulation abrogates bladder cancer chemoresistance. *Nature* **517,** 209–213 (2015).

168. Selvam, S. P. & Ogretmen, B. Sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate signaling in cancer therapeutics and drug resistance. *Handb. Exp. Pharmacol.* 3–27 (2013). doi:10.1007/978-3-7091-1511-4_1

169. Dandekar, D. S., Lopez, M., Carey, R. I. & Lokeshwar, B. L. Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib augments chemotherapeutic drug-induced apoptosis by enhancing activation of caspase-3 and -9 in prostate cancer cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **115,** 484–492 (2005).

170. Corre, J. *et al.* Bioactivity and prognostic significance of growth differentiation factor GDF15 secreted by bone marrow mesenchymal stem cells in multiple myeloma. *Cancer Res.* **72,** 1395–1406 (2012).

171. Keenan, M. M. & Chi, J.-T. Alternative fuels for cancer cells. *Cancer J. Sudbury Mass* **21,** 49–55 (2015).

172. Ehsanipour, E. A. *et al.* Adipocytes cause leukemia cell resistance to L-asparaginase via release of glutamine. *Cancer Res.* **73,** 2998–3006 (2013).

173. Iwamoto, S., Mihara, K., Downing, J. R., Pui, C.-H. & Campana, D. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *J. Clin. Invest.* **117,** 1049–1057 (2007).

174. Yu, B., Zhang, X. & Li, X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* **15,** 4142–4157 (2014).

175. Lee, J.-K. *et al.* Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by down-regulating VEGF expression in breast cancer cells. *PloS One* **8,** e84256 (2013).

176. Ono, M. *et al.* Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. *Sci. Signal.* **7,** ra63 (2014).

177. Lin, Y. *et al.* Study on the bone marrow mesenchymal stem cells induced drug resistance in the U937 cells and its mechanism. *Chin. Med. J. (Engl.)* **119,** 905–910 (2006).

178. Konopleva, M. *et al.* Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia* **16,** 1713–1724 (2002).

179. Balakrishnan, K. *et al.* Influence of bone marrow stromal microenvironment on forodesine-induced responses in CLL primary cells. *Blood* **116,** 1083–1091 (2010).

180. Pei, X.-Y. *et al.* Circumvention of Mcl-1-dependent drug resistance by simultaneous Chk1 and MEK1/2 inhibition in human multiple myeloma cells. *PloS One* **9,** e89064 (2014).

181. Anonyme. Guide affection de longue durée 30 ‘cancer de l’ovaire’. (2010).

182. *Estimation nationale de l’incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012: étude à partir des registres des cancers du réseau Francim*. (Institut de veille sanitaire, 2013).

183. Domcke, S., Sinha, R., Levine, D. A., Sander, C. & Schultz, N. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat. Commun.* **4,** 2126 (2013).

184. Picaud, L. *et al.* Evaluation of the effects of hyaluronic acid-carboxymethyl cellulose barrier on ovarian tumor progression. *J. Ovarian Res.* **7,** 40 (2014).