



ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Voies de signalisation du développement et du stress cellulaire dans les cancers digestifs et urologiques

THÈSE présentée par :

Pascal MOURACADE

soutenue le : **30 septembre 2015**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Etude des voies signalétiques impliquées
dans la résistance aux agents
thérapeutiques dans le carcinome à
cellules rénales humain

THÈSE dirigée par :

Docteur MASSFELDER Thierry

Directeur de recherche INSERM, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS externes :

Docteur RADVANYI François

Directeur de recherche CNRS, Institut curie, Paris

Professeur PATARD Jean Jacques

PUPH, Université Paris-Sud

EXAMINATEUR interne :

Professeur BERGERAT Jean-Pierre

PUPH, Université de Strasbourg

Remerciements

Je remercie vivement mon directeur de thèse, le Docteur Thierry Massfelder, pour m'avoir guidé tout au long de ces années de thèse. Ta patience et ta rigueur scientifique m'ont permis de mener à bien mon projet scientifique.

Je remercie le Docteur Radvanyi, le Professeur Bergerat de me faire l'honneur d'évaluer mon travail de thèse. Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie du jury.

Je remercie le Professeur Patard, d'avoir accepté malgré des conditions difficiles d'être mon rapporteur de thèse. Merci pour votre soutien.

J'exprime également ma reconnaissance au Docteur Claire Beraud, pour avoir encadré mes années de thèse et pour son implication inlassable dans chaque étape de la réalisation de ce travail. Sans toi Claire, cette thèse n'aurait pas pu aboutir. Merci

Un autre grand merci pour Audrey, Roxane, Imène, Sabrina, Mariette, Catherine, Véronique et Laure qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ces travaux, pour vos conseils et les différents coups de main que vous avez pu m'apporter.

Un autre grand merci au Professeur Lang, Professeur Saussine et Professeur Jacqmin pour leur aide depuis des années et leur confiance.

Un merci tout particulier à ma famille, mes parents, mes frères et ma sœur pour leur amour et leur soutien pendant toutes mes années d'études.

Dimitri, Léa et Chloé je vous aime fort.

A ma femme Carine, cette thèse t'est dédiée. Merci pour ton amour, ta patience. Sans ta présence, je ne sais pas comment j'aurai pu tenir toutes ces années. Je suis fier de toi et de nos petits choux. A nos projets...



Pascal MOURACADE



**Etude des voies signalétiques impliquées dans
la résistance aux agents thérapeutiques dans
le carcinome à cellules rénales humain**

Résumé

Le carcinome à cellules rénales (CCR) se caractérise par une résistance importante aux thérapies. Notre hypothèse était que des voies signalétiques prolifératives, anti-apoptotiques et/ou angiogéniques sont mises en jeu dans la résistance aux thérapies.

Il s'agissait de mesurer la sensibilité de lignées cellulaires de CCR humain à différentes classes thérapeutiques *in vitro* et *in vivo*. Une étude pilote a été réalisée sur la base de xénogreffes de la lignée A498 chez la souris nude, puis exploitée pour des analyses sur biopuces à protéines afin d'identifier les voies de signalisation induites par le sunitinib.

In vitro, les lignées cellulaires de CCR se sont révélées sensibles aux thérapies indépendamment du statut VHL. *In vivo*, la lignée A498 est apparue résistante au sunitinib. L'approche par biopuces a montré que plusieurs protéines de l'angiogénèse sont modulées sous l'effet du traitement, notamment l'angiogénine. Il n'y a pas de modification de l'expression des protéines de l'apoptose testées. Les formes phosphorylées d'Akt sont également augmentées dans les tumeurs traitées, de même que Lim1 alors que la forme phosphorylée de NFκB est diminuée.

Ce travail a ainsi identifié de potentielles cibles impliquées dans les mécanismes de résistance et devraient permettre de définir de nouvelles options thérapeutiques dans le cancer du rein.

Mots clés : carcinome rénal, résistance au traitement, cytotoxiques, thérapies ciblées, angiogénine, Lim1

Résumé en Anglais

The renal cell carcinoma is characterized by a high resistance to therapies. Our working hypothesis was that proliferative signaling pathways, anti-apoptotic and / or angiogenic are involved in resistance to therapies. Thus, as part of this thesis, we measured the sensitivity to chemotherapy and targeted therapies in kidney cancer cell lines *in vitro* as well *in vivo*.

A pilot study was conducted on the basis of the A498 cell line xenografts in nude mice, and then used for analysis on proteome arrays to identify the signaling pathways induced by sunitinib.

In vitro, the cell lines of RCC were sensitive to therapy regardless of the VHL status. *In vivo*, the line A498 appeared resistant to sunitinib. The approach using the proteome array has shown that several angiogenesis proteins are modulated as a result of treatment, including angiogenin. There was no change in the expression of proteins of apoptosis. Phosphorylated forms of Akt were also increased in the treated tumors, as well as Lim1 whereas the phosphorylated form of NFkB was reduced. This work has identified potential targets involved in resistance mechanisms and should define new therapeutic options in renal cancer.

Keywords: renal carcinoma, resistance to treatment, cytotoxic agents, targeted therapy, angiogenin, Lim1

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	3
RESUME.....	4
RÉSUMÉ EN ANGLAIS	5
TABLE DES MATIERES	6
LISTE DES TABLEAUX	9
LISTE DES FIGURES.....	10
LISTE DES ANNEXES	12
LISTE DES ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	16
1. LE CARCINOME A CELLULES RENALES	17
1.1. EPIDEMIOLOGIE	17
1.2. FACTEURS DE RISQUE	20
1.2.1. FORMES GENETIQUES	20
1.3. CLASSIFICATION ANATOMOPATHOLOGIQUE	24
1.4. INDICATIONS THERAPEUTIQUES SELON LE STADE DE LA MALADIE	25
1.4.1. TRAITEMENT DES FORMES LOCALISEES	25
1.4.2. TRAITEMENT DES FORMES LOCALEMENT AVANCEES.....	27
1.4.3. TRAITEMENT DES FORMES METASTATIQUES.....	27
1.5. CANCER DU REIN NON A CELLULES CLAIRES	28
1.6. LE CANCER DU REIN METASTATIQUE	30
1.7. BIOLOGIE DU CANCER DU REIN	31
1.7.1. LA VOIE VHL-HIF-VEGF DANS LE CCR	31
1.7.2. LA VOIE PI3K/AKT/MTOR DANS LE CCR	34
1.7.3. LES VOIES DE L'EGF ET DES MAPKINASES DANS LE CCR.....	36
1.7.4. LA VOIE SONIC HEDGEHOG.....	37
1.8. LE ROLE DE L' ANGIOGENESE	40
1.8.1. L'ANGIOGENESE	40
1.8.2. L'ANGIOGENESE TUMORALE.....	41
1.8.3. LE ROLE DE L' ANGIOGENINE DANS L' ANGIOGENESE	43
1.8.4. GENE ET STRUCTURE DE L' ANGIOGENINE.....	44
1.8.5. EXPRESSION DE L' ANGIOGENINE.....	44
1.8.6. PROPRIETES BIOLOGIQUES DE L' ANGIOGENINE	45
1.9. RESISTANCE AUX AGENTS THERAPEUTIQUES	48
1.9.1. LES ANTIANGIOGENIQUES : MECANISME D' ACTION.....	48
1.9.2. MECANISMES IMPLIQUES DANS LA RESISTANCE	51
1.9.3. RESISTANCE ET CCR	52

HYPOTHESES ET OBJECTIFS	55
MATERIELS ET METHODES	57
1. LES MODELES D'ETUDE.....	58
1.1. LES LIGNÉES CELLULAIRES HUMAINES.....	58
1.1.1. LE TRAITEMENT	58
1.2. LES TISSUS HUMAINS :	59
1.3. LES SOURIS XÉNOGREFFÉS	59
1.3.1. PROTOCOLE D'IMPLANTATION DES SOURIS NUDE ET TRAITEMENT	59
1.3.2. MESURE DE LA CROISSANCE TUMORALE ET TRAITEMENT	60
1.3.3. ANALYSES IMMUNOHISTOCHIMIQUES	61
1.3.3.1. NÉOVASCULARISATION TUMORALE	61
2. ETUDE DE L'EXPRESSION DES ARNS	61
2.1. EXTRACTION A PARTIR DES TISSUS	61
2.2. LA TRANSCRIPTION INVERSE.....	62
2.3. LA QUANTIFICATION	63
3. ETUDE DE L'EXPRESSION PROTÉIQUE	63
3.1. EXTRACTIONS À PARTIR DES CELLULES EN CULTURE.....	63
3.2. EXTRACTIONS À PARTIR DES TISSUS	63
3.3. DOSAGE DES PROTÉINES	64
3.4. WESTERN BLOT	64
4. ETUDE <i>IN VITRO</i> DE LA CROISSANCE CELLULAIRE	65
4.1. LA DENSITÉ CELLULAIRE	65
4.2. LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE.....	65
4.3. L' APOPTOSE	66
5. LES BIOPUCES A PROTEINES.....	67
5.1. PRINCIPE.....	67
5.2. PROTOCOLE	68
6. ANALYSE STATISTIQUE.....	69
RESULTATS	70
1. ÉTUDES <i>IN VITRO</i> DE LA CHIMIOSENSIBILITE DES LIGNEES CELLULAIRES DE CCR HUMAIN A DIFFERENTS AGENTS THERAPEUTIQUES	71
1.1. EFFET DE DIFFERENTS AGENTS THERAPEUTIQUES SUR LA DENSITE CELLULAIRE.....	71
1.1.1. EFFETS DES ANTI-ANGIOGÉNIQUES	71
1.1.1. EFFETS DES CYTOTOXIQUES	71
1.2. EFFET DES DIFFERENTS AGENTS THERAPEUTIQUES SUR LA PROLIFERATION.....	75
1.2.1. EFFET DES ANTI-ANGIOGÉNIQUES	75
1.2.2. EFFET DES AGENTS CYTOTOXIQUES	75
1.3. EFFET DES DIFFÉRENTS AGENTS THÉRAPEUTIQUES SUR L' APOPTOSE	77
1.3.1. EFFET DES ANTI-ANGIOGÉNIQUES	77
1.3.2. EFFET DES CYTOTOXIQUES.....	77

2. ÉTUDES <i>IN VIVO</i> DE LA CHIMIOSENSIBILITE DES LIGNEES CELLULAIRES DE CCR A DIFFERENTS AGENTS THERAPEUTIQUES.....	80
2.1. EFFET DES AGENTS THÉRAPEUTIQUES SUR LA CROISSANCE TUMORALE DE CCR HUMAIN <i>IN VIVO</i> CHEZ LA SOURIS NUDE.....	80
3. RECHERCHE DES MARQUEURS MOLÉCULAIRES INDUITS PAR LE SUNITINIB	82
3.1. ANALYSE PAR UNE APPROCHE À LARGE SPECTRE : KITS DE BIOPUCES À PROTÉINES ...	82
3.2. VALIDATION DE L' AUGMENTATION D' EXPRESSION DE L' ANGIOGÉNINE.....	85
3.2.1. <i>IN VIVO</i> SUR LE MODÈLE DE XÉNOGREFFE A498.	85
3.2.2. <i>IN VIVO</i> SUR LES MODELES PRECLINIQUES.....	87
3.3. IMPACT DU SUNITINIB SUR LES VOIES SIGNALÉTIQUES AKT ET NFκB <i>IN VIVO</i>	89
3.4. IMPACT DU SUNITINIB SUR L' EXPRESSION PROTEIQUE DE LIM1 <i>IN VIVO</i>	91
3.5. IMPACT DU SUNITINIB SUR LA NEOVASCULARISATION TUMORALE.....	94
DISCUSSION	96
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	104
RÉFÉRENCES	106
ANNEXES.....	114

Liste des tableaux

Tableau 1 : Nombre de cas et décès en France selon l'année-Cancer du rein.

Tableau 2 : Taux d'incidence et de mortalité en France.

Tableau 3 : Différentes formes génétiques du CCC.

Tableau 4 : Classification histologique des tumeurs du rein.

Tableau 5 : Traitement médical du cancer du rein métastatique.

Tableau 6 : Répartition des localisations métastatiques.

Tableau 7: Kit proteome array angiogenèse.

Liste des figures

Figure 1 : Tendence chronologique de l'incidence et de la mortalité du cancer du rein pour la France.

Figure 2 : Voie VHL/HIF/VEGF dans le CCR.

Figure 3 : Voie PI3K/AkT/mTOR dans le CCR.

Figure 4 : Cibles thérapeutiques explorées dans le cancer du rein.

Figure 5: Contraste entre la microvascularisation normale et tumorale.

Figure 6 : Représentation de l'évolution de la vascularisation tumorale lors d'une thérapie anti-angiogénique.

Figure 7 : Séquence protéique de l'angiogénine humaine.

Figure 8 : Représentation tridimensionnelle de l'angiogénine.

Figure 9 : les anti-angiogéniques : mécanisme d'action.

Figure 10 : Effet des thérapies ciblées sur la croissance cellulaire de lignées cellulaires de CCC humain.

Figure 11 : Effet des cytotoxiques sur la croissance cellulaire de lignées cellulaires de CCC humain.

Figure 12 : Etude de la prolifération des cellules humaines de CCC après traitement par différents agents thérapeutiques.

Figure 13 : Effet de différents agents thérapeutiques sur la mort cellulaire de lignées cellulaires de CCC humain.

Figure 14: Effet du sunitinib sur la croissance tumorale de CCC humain *in vivo* chez la souris nude.

Figure 15 : Analyse des marqueurs moléculaires induits par le sunitinib par une approche à large spectre (biopuces à protéines / angiogénèse).

Figure 16 : Effet du sunitinib sur l'expression de l'angiogénine *in vivo* sur la lignée A498.

Figure 17 : Effet du sunitinib sur l'expression de l'angiogénine *in vivo* à partir de modèles précliniques.

Figure 18 : Impact du traitement par sunitinib sur les voies AKT et NFkB *in vivo* sur la lignée A498.

Figure 19 : Impact du traitement par sunitinib sur le facteur de transcription Lim1 *in vivo* sur la lignée A498 et les modèles précliniques.

Figure 20 : Etude *in vivo* de l'expression du gène du facteur de transcription Lim1 après traitement par sunitinib.

Liste des annexes

Annexe 1 : Effet de différents agents thérapeutiques sur la mort cellulaire de lignées cellulaires de CCR humain.

Annexe 1 : Effet de différents agents cytotoxiques sur la mort cellulaire de lignées cellulaires de CCR humain.

Annexe 3 : Effet de différents agents thérapeutiques sur la croissance tumorale de CCC humain *in vivo* chez la souris nude.

Annexe 4 : Analyse des marqueurs moléculaires induits par le sunitinib par une approche à large spectre (biopuces à protéines/phosphokinome et apoptose).

Annexe 5 : Expression *in vitro* de l'angiogénine dans les 4 lignées cellulaires de CCC humain traitées ou non par sunitinib.

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
ADP : adénosine diphosphate
Akt : « serine threonine protein kinase B » (ou PKB)
AMM : autorisation de mise sur le marché
Ang-1 : angiopoïétine-1
Ang-2 : angiopoïétine-2
AP-1 : activating protein 1
ARNm : acide ribonucléique messenger
ATP : adénosine triphosphate
BCA : « bicinchoninic acid »
BHD : Syndrome de Birt-Hogg-Dubé
BSA : sérum albumine bovine
Ca : Calcium
CCR : carcinome à cellules rénales
CCC : carcinome à cellules conventionnelles
CAM : « cellular adhesion molecule »
CDK : « cyclin dependent kinase »
CE : cellule endothéliale
CEC : cellules endothéliales circulantes
CEP : progéniteurs de cellules endothéliales
CHU : centre hospitalo-universitaire
CML : cellules musculaires lisses
CO₂ : dioxyde de carbone
CCR : carcinome à cellules rénales
CCC : carcinome à cellules claires
DMSO : dimethylsulfoxyde
EDTA : acide éthylène diamine tétracétique
EGF : « epidermal growth factor »
EGFR : « epidermal growth factor receptor »
EGFR-TKI : inhibiteur de l'activité tyrosine kinase d'EGFR
ESM : erreur standard

FAK : « focal adhesion kinase »
FGF : « fibroblast growth factor »
FGFR : « fibroblast growth factor receptor »
GAG : glycosaminoglycane
GTPases : guanosine triphosphate hydrolase
HER : « human epidermal growth factor receptor »
HIF : « hypoxia inducible factor »
IgG : Immunoglobuline G
IL : interleukine (-1, -4, -8,...)
IP3 : inositol triphosphate
IRM : imagerie par résonance magnétique
mAb : « monoclonal antibody »
MAPK : « mitogen-activated protein kinases »
MB : membrane basale
MEC : matrice extra-cellulaire
MMP : matrix metalloprotease
MP : microparticule
mTOR : « mammalian target of rapamycin »
NaCl : chlorure de sodium
NFκB : « nuclear factor kappa B »
NO : « nitric oxide (monoxyde d'azote) »
NOS : « nitric oxide synthase »
SNC : système nerveux central
O2 : oxygène
OMS : organisation mondiale de santé
PBS : « phosphate buffer saline »
PD-ECGF : « platelet-derived endothelial cell growth factor »
PDGF : « platelet-derived growth factor »
PDFGR : « platelet-derived growth factor receptor »
pH : potential Hydrogène
PI3K : phosphoinositide 3-kinase
PKA : protéine kinase A
PKB : proteine kinase B = AKT

PKC : proteine kinase C
RIPA : milieu permettant de lyser les cellules (extraction protéine)
SH2 : « Src homology 2 »
SHP : SH2 phosphatases
SiRNA : « small interference RNA »
Src : « a proto-oncogenic Non-receptor Tyrosine kinase »
SSC : « side scatter collection »
STAT : « signal transducer and activator of transcription »
SUFU : « Suppressor of fused homolog »
Tampon TBST : « tris-buffered saline tween »
Tampon TNE : tampon composé de Tris NaCl et EDTA
TBS : tampon Tris salin
TEMED : tetramethylethylenediamine
TGF : « transforming growth factor »
TKI : « tyrosine kinase inhibitor »
TNF- α : « tumor necrosis factor- α »
tPA : « tissue plasminogen activator »
VCAM : « vascular cell adhesion molecule »
VEGF : « vascular endothelial growth factor »
VEGFR : « vascular endothelial growth factor receptor »
VHL : von Hippel-Lindau

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le carcinome à cellules rénales

1.1. Epidémiologie

Avec 11 573 nouveaux cas estimés en 2012 dont 67% survenant chez l'homme, le cancer du rein se situe au 7^{ème} rang des cancers. Le taux d'incidence standardisé est de 14,5 chez l'homme et de 5,8 chez la femme, soit un rapport hommes/femmes de 2,5. Il représente environ 3 % des tumeurs malignes de l'adulte. L'âge moyen du diagnostic se situe à 65 ans.

Avec 3957 décès, dont 67 % chez l'homme, ce cancer se situe au 9^{ème} rang des décès parmi les cancers. Le taux de mortalité standardisé est de 4,0 chez l'homme et de 1,4 chez la femme. (Tableau 1)

Chez l'homme comme chez la femme, l'incidence de ce cancer est en forte augmentation depuis 1980, cette croissance se confirmant après 2005. En effet, le taux d'incidence standardisé augmente chez l'homme de 2,0 % par an entre 1980 et 2012 (7,7 cas pour 100 000 personnes-années en 1980 contre 14,5 cas en 2012) et, chez la femme, de 1,7 % par an (3,4 en 1980 contre 5,8 en 2012) (Tableau 2, Figure 1). L'explication de cette augmentation d'incidence est liée à une plus grande fréquence des découvertes fortuites de petites tumeurs ainsi que dans la vraisemblable multiplication des facteurs de risque culturels et environnementaux.

Le risque d'être atteint de ce cancer entre 0 et 74 ans varie selon la cohorte de naissance. Il passe de 1,04 % à 1,73 % chez l'homme et de 0,42 % à 0,63 % chez la femme, respectivement pour les cohortes nées en 1920 et en 1950.

Le taux d'incidence par classe d'âge augmente fortement à partir de 40 ans dans les deux sexes pour atteindre un pic à 75 ans.

Le taux de mortalité standardisé est relativement stable chez l'homme et chez la femme sur l'ensemble de la période, avec cependant une diminution de ce taux en fin de période, plus particulièrement chez la femme, pour laquelle une baisse de 2,1 % par an, en moyenne, est constatée entre 2005 et 2012. Chez l'homme, pour les mêmes années, cette diminution est de 1,2 %.

Le risque de décéder de ce cancer entre 0 et 74 ans est d'environ 0,50 % chez l'homme et 0,20 % chez la femme pour les cohortes les plus anciennes. Il s'infléchit pour les cohortes les plus récentes, plus nettement pour les hommes que pour les femmes. Le pic de mortalité se situe entre 75 et 85 ans.

La survie relative à 5 ans est globalement de 63 %. Pour un stade localisé (58 % des diagnostics), elle est à 90 %.

www.e-cancer.fr/toutes-les-actualites/84-linstitut-nationaldu-cancer/7762-un-rapport-sur-les-estimations-de-lincidenceet-de-la-mortalite-par-cancer-en-france-entre1980-et-2012

	Sexe	Année					
		1980	1990	2000	2005	2010	2012
Incidence	Homme	2 535	3 612	5 118	6 102	7 260	7 781
	Femme	1 360	1 922	2 656	3 133	3 601	3 792
Mortalité	Homme	1 443	1 870	2 266	2 453	2 608	2 651
	Femme	936	1 128	1 246	1 284	1 307	1 306
Mortalité observée	Homme	1 430	1 981	2 221	2 438	-	-
	Femme	923	1 141	1 235	1 330	-	-

Tableau 1 : Nombre de cas et de décès en France selon l'année pour le cancer du rein.

	Sexe	Année						Taux annuel moyen d'évolution (%)	
		1980	1990	2000	2005	2010	2012	De 1980 à 2012	De 2005 à 2012
Incidence	Homme	7,7	9,7	11,7	12,8	14,0	14,5	2,0	1,8
	Femme	3,4	4,2	5,0	5,3	5,7	5,8	1,7	1,4
Mortalité	Homme	4,0	4,6	4,6	4,4	4,2	4,0	0,0	-1,2
	Femme	1,8	1,9	1,7	1,6	1,4	1,4	-0,9	-2,1
Mortalité observée	Homme	4,0	4,8	4,5	4,3	-	-	-	-
	Femme	1,8	1,9	1,7	1,6	-	-	-	-

Tableau 2 : Taux d'incidence et de mortalité en France selon l'année (taux standardisé) pour le cancer du rein.

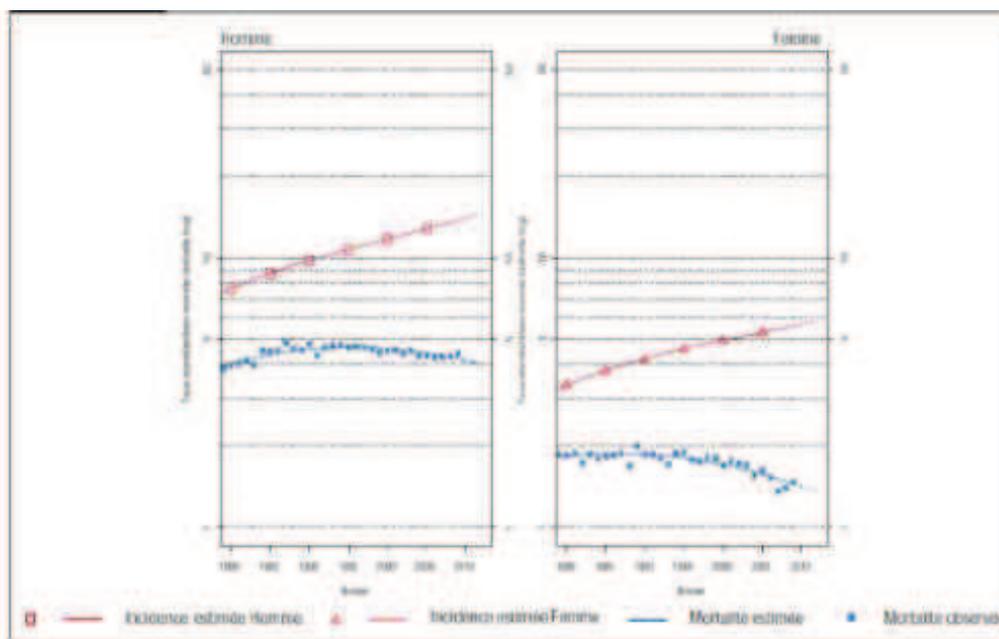


Figure 1 : Tendances chronologiques de l'incidence et de la mortalité du cancer du rein pour la France.

1.2. Facteurs de risque

Il existe des facteurs de risque reconnus : dialyse depuis plus de 3 ans favorisant une dysplasie multikystique (cancer tubulopapillaire), obésité et tabagisme. Certains sont suspectés comme l'hypertension artérielle, l'exposition au cadmium et à l'amiante.

Il existe également des formes familiales héréditaires, dont la plus fréquente est la maladie de von Hippel-Lindau (1 à 2 % des cancers du rein). [1]

1.2.1. Formes génétiques (Tableau 3)

Les formes héréditaires représentent 2 à 3 % de l'ensemble des cancers du rein mais leur reconnaissance est essentielle. Un diagnostic précoce permet de mettre en place une prise en charge et une surveillance spécifiques de ces patients et, lorsque l'anomalie génétique est identifiée, de proposer un dépistage pré-symptomatique aux apparentés. Ces tumeurs rénales surviennent souvent 20 à 30 ans plus tôt que les formes sporadiques et sont fréquemment bilatérales et multifocales. Une dizaine d'affections de transmission autosomique dominante sont actuellement connues dont 4 principales, prédisposant chacune à un type histologique particulier de tumeurs rénales, et présentées ci-après.

1.2.1.1. Maladie de von Hippel-Lindau (VHL)

Il s'agit de la première cause de cancer du rein héréditaire. La maladie de VHL prédispose au développement de tumeurs richement vascularisées du SNC et de la rétine (hémangioblastomes, tumeurs du sac endolymphatique), des reins (carcinomes à cellules claires et kystes), des surrénales (phéochromocytomes), du pancréas (kystes et tumeurs endocrines) et de l'épididyme (cystadénomes). L'incidence à la naissance est de 1/36 000 et la pénétrance est forte (95 % à 60 ans). Plus de 380 familles sont connues et suivies en France.

Les tumeurs rénales, souvent bilatérales et d'aspect kystique, touchent 40 à 70 % des patients et sont découvertes en moyenne à 39 ans mais peuvent s'observer avant 18 ans [2,3].

La maladie de VHL est due à des mutations germinales du gène suppresseur de tumeur VHL, localisé en 3p25–26, dont le rôle est capital dans l'angiogenèse. Plus de 200 mutations germinales différentes du gène VHL ont été identifiées et ont conduit à la distinction de plusieurs types de maladie de VHL [2,3]. Le type 1 est caractérisé par un risque minime de phéochromocytome et il est habituellement associé à des délétions étendues (absence de protéine VHL) ou des mutations conduisant à une protéine tronquée (protéine plus courte). Le type 2 est associé à un risque prédominant de phéochromocytome et les mutations les plus fréquentes sont des substitutions (protéine de longueur normale mais non fonctionnelle). Le type 2B prédispose à l'ensemble des tumeurs de la maladie de VHL. Le type 2A se caractérise par un risque plus faible de cancer rénal. Enfin, le type 2C est associé uniquement à la survenue de phéochromocytomes.

Le dépistage pré symptomatique des membres de la famille à risque par test génétique est recommandé à partir de 5 ans [3]. La surveillance abdominale est annuelle. Elle est effectuée par échographie de 5 à 18 ans, puis en alternant IRM et échographie à partir de 18 ans. Le scanner n'est indiqué qu'en cas d'éventuelle lésion, avant de décider du geste thérapeutique.

1.2.1.2. Cancer rénal papillaire héréditaire

Cette affection dont l'incidence estimée est inférieure à 1/200 000 est caractérisée par le développement de carcinomes papillaires de type 1, bilatéraux et multifocaux (parfois innombrables) chez plus de 60 % des patients [1,4]. Il n'a pas été décrit jusqu'ici de manifestations cliniques extra-rénales. Les tumeurs rénales se développent plutôt dans la cinquième décennie et sont le plus souvent de bas grade, mais elles peuvent aussi survenir à un

âge précoce (dès 30 ans) et avoir un comportement agressif [4]. Une trentaine de familles ont été décrites dans la littérature et 6 familles sont actuellement connues en France.

L'affection est due à des mutations activatrices (une dizaine connues) du proto-oncogène MET, localisé en 7q31 et qui code le récepteur tyrosine kinase normalement activé par le facteur de croissance hépatocytaire (HGF) [1]. Le test génétique chez les apparentés est effectué à partir de 18 ans. La surveillance rénale est annuelle à partir de 20 ans en alternant IRM et échographie.

1.2.1.3. Léiomyomatose cutané-utérine héréditaire avec cancer rénal

Cette affection touche environ 1 personne sur 100 000 et prédispose au développement de fréquents léiomyomes cutanés et utérins multiples ainsi que de carcinomes papillaires de type 2 (parfois de cancers des tubes collecteurs) chez 15 à 20 % des patients. Les tumeurs rénales sont très agressives, imposant leur exérèse chirurgicale dès leur découverte même lorsqu'elles sont de petite taille [1,5]. Elles sont découvertes le plus souvent entre 30 et 40 ans mais peuvent survenir dès l'adolescence.

L'affection est due à des mutations germinales du gène suppresseur de tumeur FH, localisé en 1q42-43 et qui code la fumarate hydratase, enzyme mitochondriale du cycle de Krebs qui transforme le fumarate en malate. Plus de 120 mutations germinales différentes ont été identifiées et il n'y a pas de corrélation génotype-phénotype. Le test génétique chez les apparentés est effectué à partir de 10 ans. La surveillance rénale est annuelle à partir de 10 ans et fait appel à l'IRM (l'échographie n'a pas d'indication, compte tenu de la nécessité de découvrir les tumeurs le plus tôt possible).

1.2.1.4. Syndrome de Birt-Hogg-Dubé (BHD)

Cette affection, dont l'incidence est également estimée à 1/100 000, prédispose les patients à des lésions cutanées bénignes du visage et du cou (fibrofolliculomes), des pneumothorax spontanés récidivants, des kystes pulmonaires et des tumeurs rénales [1,6]. Les tumeurs du rein surviennent à un âge moyen de 50 ans, elles sont souvent bilatérales et multifocales mais en général peu agressives. L'association de tumeurs de types histologiques différents est très caractéristique de l'affection. Le plus souvent, il s'agit de carcinomes chromophobes et de tumeurs hybrides oncocytomes-chromophobes mais des carcinomes à cellules claires, des oncocytomes ou des carcinomes papillaires peuvent s'observer.

Le syndrome de Birt-Hogg-Dubé est dû à des mutations germinales du gène FLCN localisé en 17p11.2 et identifié en 2002 [1,6]. Le gène FLCN code la folliculine qui est impliquée dans la voie mTOR. Plus de 200 mutations germinales sont actuellement décrites et il n'y a pas de corrélation génotype-phénotype évidente. Le test génétique chez les apparentés est effectué à partir de 18 ans. La surveillance rénale est annuelle à partir de 18 ans en alternant IRM et échographie.

Affection	Gène	Fréquence et type des tumeurs rénales	Autres manifestations cliniques
Maladie de von Hippel-Lindau	VHL 3p25-26	40-70 % Carcinomes à cellules claires Kystes rénaux	Hémangioblastomes du SNC (60-80 %) et de la rétine (50 %) Kystes (78 %) et tumeurs endocrines du pancréas (5-10 %), phéochromocytomes (24 %), tumeurs du sac endolymphatique (2-11 %), cystadénomes de l'épididyme (54 %)
Cancer rénal papillaire héréditaire	MET 7q31	50-67 % Carcinomes papillaires de type 1	Néant
Léiomyomatose cutané-utérine héréditaire avec cancer rénal	FH 1q42-43	15-18 % Carcinomes papillaires de type 2, carcinomes des tubes collecteurs	Léiomyomes cutanés (75 %) et utérins (100 % des femmes)
Syndrome de Birt-Hogg-Dubé	BHD 17p11.2	20-34 % Cancers chromophobes tumeurs hybrides, oncocytomes, carcinomes à cellules claires	Fibrofolliculomes cutanés (75 %), pneumothorax (24 %), kystes pulmonaires (60 %) Polypes et carcinomes colorectaux dans certaines familles

Tableau 3: Différentes formes génétiques du cancer du rein.

1.3. Classification anatomopathologique

Les CCR représentent 85 % des cancers du rein de l'adulte. Cinq autres types histologiques et de nombreux sous-types histologiques constituent les 15 % restants

1.3.1. Données anatomopathologiques

L'examen anatomopathologique de la tumeur primitive ou de la métastase utilise la classification anatomopathologique de l'OMS, le grade nucléaire de Fuhrman et le stade TNM :

- la classification anatomopathologique de l'OMS définit de nombreux sous-types histologiques. Pour les carcinomes à cellules rénales, les sous-types histologiques les plus fréquents sont le carcinome à cellules claires (80 %) (anciennes dénominations : tumeur de Grawitz, hypernéphrome, adénocarcinome), le carcinome papillaire (ou tubulo-papillaire) et le carcinome chromophile ;
- le grade nucléaire de Fuhrman distingue 4 grades selon la taille du noyau et du nucléole. C'est un critère pronostique important. Plus le grade est élevé, moins bon est le pronostic ;
- le système actuel de classification TNM 2009 est recommandé puisqu'il est lié au pronostic et oriente la prise en charge thérapeutique.

Carcinome rénal familial	
Tumeurs à cellules rénales	
<u>Bénignes</u>	Adénome papillaire Oncocytome
<u>Malignes</u>	Carcinome à cellules claires Carcinome kystique multiloculaire à cellules claires Carcinome papillaire du rein Carcinome chromophile du rein Carcinome des tubes collecteurs de Bellini Carcinome médullaire du rein Carcinome avec translocation Xp11 Carcinome associé au neuroblastome Carcinome fusiforme tubuleux et mucineux Carcinome inclassé
Tumeurs métanéphriques	Adénome métanéphrique Adénofibrome métanéphrique Tumeur stromale métanéphrique
Tumeurs mixtes épithéliales et mésenchymateuses	Néphrome kystique Tumeur mixte épithéliale et stromale Sarcome synovial
Tumeurs néphroblastiques	Restes néphrogéniques Néphroblastome Néphroblastome kystique partiellement différencié
Tumeurs neuro-endocrines	Tumeur carcinoïde Carcinome neuroendocrine Tumeur primitive neuroectodermique Neuroblastome Pheochromocytome
Autres tumeurs	Tumeurs mésenchymateuses Tumeurs hématopoïétiques et lymphoïdes Tumeurs germinales Tumeurs métastatiques

Tableau 4 : Classification histologique des tumeurs du rein selon l’OMS.

1.4. Indications thérapeutiques selon le stade de la maladie

La prise en charge thérapeutique diffère selon que le cancer du rein est localisé, localement avancé ou métastatique.

1.4.1. Traitement des formes localisées

Le traitement de référence du cancer du rein localisé est la chirurgie. On distingue deux types de chirurgie, la néphrectomie partielle et la néphrectomie élargie.

1.4.1.1. Une alternative à la chirurgie : les traitements ablatifs

Différentes approches physiques sont disponibles afin de permettre une destruction *in situ* de tissu tumoral viable. Celles-ci sont la radiofréquence, la cryothérapie, les ultrasons focalisés (HIFU), la thérapie micro-onde et l'ablation laser.

Leur intérêt est représenté par leur caractère mini-invasif, l'épargne néphronique et leurs complications moins fréquentes que le traitement chirurgical. Les indications de traitement semblent pouvoir être élargies chez des patients à haut risque chirurgical.

Une preuve histologique de la malignité de la lésion par biopsie percutanée doit être réalisée avant la procédure.

1.4.1.2. Place de la surveillance active

La surveillance active peut constituer une option de prise en charge des petites tumeurs, chez des sujets âgés de plus de 75 ans présentant des comorbidités élevées, et ayant une tumeur solide du rein de moins de 40 mm [7]. L'objectif est d'évaluer sur une période, 6 mois minimum, l'évolutivité de la tumeur car 25 à 35 % de ces tumeurs resteront stables avec un recul de 29 mois [8]. La croissance tumorale est peu importante et estimée en moyenne à 0,28 cm/an [9]. L'indication de traitement se rediscute lorsque la tumeur atteint 30 à 40 mm selon les auteurs [10]. Il a été démontré que la période d'observation utilisée en cas de surveillance active n'a pas d'incidence sur la survie globale ou le risque métastatique [11]. Les résultats des méta-analyses sur la surveillance sont compromis par une proportion de près de 50 % des patients sans histologie avant surveillance [12]. Sachant que 20 à 30 % des petites tumeurs rénales sont bénignes et connaissant l'innocuité de la biopsie percutanée, celle-ci apparaît raisonnable afin d'éviter un protocole contraignant chez le sujet âgé.

1.4.2. Traitement des formes localement avancées

La chirurgie par néphrectomie totale élargie, voire une thrombectomie avec ou sans cavactomie et curage ganglionnaire reste le traitement de choix dans les cancers localement avancés.

1.4.3. Traitement des formes métastatiques (Tableau 5)

Jusqu'en 2006, le traitement médical du cancer du rein métastatique était l'immunothérapie. Depuis, les molécules anti-angiogéniques ont complété le panel thérapeutique. Ces molécules peuvent agir sur l'une des deux voies de l'angiogenèse : inhibition directe par l'action du « Vascular Endothelial Growth Factor » (VEGF) sur son récepteur, ou inhibition de la voie PI3K/AKT/mTOR dans la cellule tumorale. À l'heure actuelle, 7 molécules sont disponibles sur le marché : des inhibiteurs de tyrosine kinases (TKIs) (le sunitinib, le sorafenib, le pazopanib et l'axitinib), un inhibiteur du VEGF, le bevacizumab associé à l'interféron, et les inhibiteurs de mTOR (le temsirolimus et l'évérolimus) [13–19]. Leur efficacité a été principalement évaluée en cas de CCC). Les recommandations de traitement varient en fonction de l'histologie tumorale et des groupes pronostiques [20]. Il n'a pas été démontré qu'un traitement précoce améliorerait la survie et, en cas de maladie indolente, une période d'observation doit être considérée avant de débiter le traitement médical.

Les recommandations concernent principalement les CCC. Le traitement dépend de la classification pronostique et de la ligne de traitement.

1.4.3.1. Chez les patients de pronostics bon ou intermédiaire

En Première ligne de traitement, 3 médicaments peuvent être recommandés :

Le sunitinib, le pazopanib et l'association bevacizumab + interféron (IFN).

Ces trois options ont le même niveau de preuve (IA) et peuvent être utilisées. La seule étude comparative entre ces options a montré que le sunitinib et le pazopanib étaient équivalents en termes d'efficacité, mais une majorité de patients préfère le pazopanib dans une étude récente. L'association bevacizumab + IFN est volontiers utilisée dans les formes indolentes.

En deuxième ligne de traitement, 2 médicaments ont démontré leur efficacité en cas d'échec d'un premier traitement anti-VEGF, l'évérolimus [17] et l'axitinib. Il n'existe pas de critère de choix entre ces 2 options. Le sorafenib représente une option acceptable. Concernant la séquence de traitement, 1re/2de ligne la séquence évérolimus/sunitinib est inférieure à la séquence sunitinib/évérolimus, l'évérolimus n'est donc pas recommandé en 1re ligne thérapeutique.

En troisième ligne de traitement, après une séquence thérapeutique utilisant 2 TKIs, l'évérolimus constitue le standard [17]. Après une séquence thérapeutique utilisant un anti-VEGF et l'évérolimus, un nouveau TKI ou le rechallenge avec le premier TKI constitue une option possible et recommandée.

1.4.3.2. Chez les patients de mauvais pronostic

Le temsirolimus est le traitement de référence [16]. Un TKI, sunitinib ou autre restent des options possibles, notamment chez les patients avec un bon Performance Status (PS).

1.5. Cancer du rein non à cellules claires

Aucun standard n'existe dans cette situation, et les anti-VEGF restent le standard. Plusieurs études suggèrent que l'utilisation d'inhibiteurs de mTOR est possible, mais l'inclusion dans un essai clinique doit être encouragée chaque fois que possible. Du fait de la rareté de ces formes, toute tumeur du rein non à cellules claires métastatique doit être présentée en Réunion de Concertation Pluridisciplinaire CARARE du fait de l'existence de ce réseau national

depuis 2013 (joignable pour avis sur carare@gustaveroussy.fr). Pour les carcinomes des tubes collecteurs (carcinomes de Bellini), ou les cancers médullaires, la chimiothérapie de type urothélial est une option possible.

Traitement médical de première ligne du cancer du rein métastatique

Histologie	Groupes pronostiques	Standard	Option
Carcinome rénal à cellules claires	Bon et intermédiaire	Sunitinib (grade A)	Cytokine (grade B)
		Bevacizumab + IFN (grade A)	Sorafenib (grade B)
		Pazopanib (grade A)	Observation
	Mauvais	Temsirolimus (grade A)	Sunitinib (grade B)
			Pazopanib (grade B)
Autres histologies	Essai thérapeutique	Inhibiteur de mTOR	
			Sunitinib
			Sorafenib

Traitement médical de deuxième ligne du cancer du rein métastatique

Histologie	Première ligne	Standard	Option
Carcinome rénal à cellules claires	Cytokine	Sorafenib (grade A)	Sunitinib (grade B)
		Pazopanib (grade A)	Bevacizumab (grade B)
		Axitinib (grade A)	Temsirolimus (grade C)
	Inhibiteur du VEGF	Everolimus (grade A)	Sorafenib (grade B)
		Axitinib (grade A)	
Autres histologies		Essai thérapeutique	

Traitement médical de troisième ligne du cancer du rein métastatique

Histologie	Lignes précédentes	Standard
Carcinome rénal à cellules claires	2 inhibiteurs du VEGF	Everolimus (grade A)
	1 TKI puis everolimus	TKI (grade B)
Autres histologies		Essai thérapeutique

Tableau 5 : Traitement médical du cancer du rein métastatique selon les recommandations de l'Association Française d'Urologie.

1.6. Le cancer du rein métastatique

10 à 40 % des patients sont d'emblée métastatique, et 10 à 30 % le deviennent.

Le délai moyen d'apparition des métastases est de l'ordre de 36 mois [21] avec 42 % qui évoluent dans la première année (donc avec un pronostic plus défavorable) [22].

Le sous-type histologique le plus souvent responsable de métastases est le CCC et ceci est retrouvé sur l'ensemble de la littérature. Sur une série de 910 patients atteints de cancer rénal métastatique, la Mayo Clinic a relevé 94 % de carcinome à cellules claires, 4 % de carcinome tubulo-papillaires et 2 % de carcinome chromophile [23]. La répartition des métastases était aussi variable en fonction du sous type histologique (tableau 6)

	Carcinome conventionnel (%)	Carcinome tubulaire (%)	Carcinome chromophile (%)
N° pts	332	12	5
Envahissement ganglionnaire	8 (2,4)	1 (8,3)	0
Poumons	186 (56)	1 (8,3)	1 (20,0)
Os	105 (31,6)	4 (33,3)	1 (20,0)
Foie	28 (8,4)	3 (25,0)	4 (80,0)
Autres	69 (20,8)	5 (41,7)	1 (20,0)
Sites multiples	63 (19,0)	2 (16,7)	2 (40,0)

Tableau 6 : Répartition des localisations métastatiques du cancer du rein en fonction du sous-type histologique.

1.7. Biologie du cancer du rein

Dans chaque type histologique de CCR, des voies moléculaires sont impliquées dans les étapes de la carcinogénèse et sont prises en compte dans les choix thérapeutiques.

1.7.1. La voie VHL-HIF-VEGF dans le CCR (Figure 2)

Cette voie moléculaire présente une importance majeure dans le CCR. Quand elle est activée, elle permet le développement d'une néo angiogénèse tumorale par surexpression de facteurs pro-angiogéniques par les cellules tumorales, qui activeront à leur tour les cellules endothéliales entraînant la formation de néovaisseaux tumoraux.

La découverte et le clonage du gène suppresseur de tumeur *VHL* sont issus de l'étude de la maladie héréditaire de von Hippel-Lindau. Chez ces patients, une mutation inactivatrice germinale du gène *VHL* (par délétion de tout ou partie du gène) a été retrouvée, l'inactivation du deuxième allèle conduisant au développement d'une tumeur selon la théorie de Knudson de la carcinogénèse à « deux coups » (two hits carcinogenesis). Des études ont ensuite pu établir *VHL* comme gène suppresseur de tumeur [24]. L'inactivation de *VHL*, que ce soit par mutation/délétion de la séquence codante ou par altération du promoteur, est retrouvée dans environ 60% des CCR sporadiques [25], faisant de l'étude de cette voie moléculaire un objet de recherche majeur pour la compréhension de la carcinogénèse de ces tumeurs.

Le produit du gène *VHL* est la protéine pVHL. pVHL est représentée par 2 protéines dont une tronquée en position Nterm du a une initiation de la traduction par une méthionine "in frame" mais qui n'empêche pas la dégradation de HIF car celui-ci se fait via la liaison de VHL par sa partie Cterm. Les fonctions de pVHL sont encore en voie d'exploration, mais la principale est la régulation du facteur HIF [26] : en effet, la plupart des gènes surexprimés en cas

d'inactivation de *VHL* sont également sous la dépendance de HIF. Il existe plusieurs formes de HIF alpha, HIF-1alpha, HIF-2 alpha et HIF-3 alpha, qui est plutôt inhibiteur du système. La régulation de la sous-unité α de HIF par pVHL est médiée par un complexe multienzymatique protéique associant les protéines Culin2, Elongin B, Elongin C, NEDD8 et Rbx. Ce complexe, en présence d'oxygène qui est nécessaire à une hydroxylation préalable par la prolyl-hydroxylase (PHD), induit la poly-ubiquitinylation de HIF α , ayant pour conséquence la dégradation de ce facteur par le protéasome. En hypoxie, HIF-1 α n'est plus hydroxylé et ne fixe plus pVHL. Il y a translocation nucléaire de HIF-1 α . Celle-ci se fixe alors à son partenaire HIF-1 β , qui est relativement stable et exclusivement nucléaire pour former le facteur de transcription HIF-1. HIF-1 se fixe alors sur la séquence HRE des gènes sensibles à l'hypoxie et induit la transactivation de ces derniers. L'hypoxie joue donc à plusieurs niveaux sur la sous-unité HIF-1 α : en la stabilisant, en favorisant sa translocation nucléaire et, enfin, en augmentant l'activité transactivatrice. Plusieurs co-facteurs peuvent intervenir en se fixant au complexe HIF-1 pour augmenter sa transactivation. Il a été ainsi montré que la protéine chaperon Hsp90 était capable de se fixer à HIF-1 α et d'activer la transactivation d'HIF-1 [26]. Les gènes activés par HIF sont nombreux, plus de 80, et leurs fonctions sont variées : angiogénèse (via VEGF-A et PDGF β), métabolisme du glucose au niveau de son transport (GLUT1) ou de la glycolyse (6-phosphofructose-2-kinase), contrôle du pH (anhydrases carboniques, dont CA IX), prolifération cellulaire (avec implication de PDGF β et TGF α et PTHrP), régulation de l'érythropoïèse (EPO). HIF1 et HIF2 vont présenter des profils différents d'expression de ces gènes : on considère que HIF2 aurait un potentiel plus activateur que HIF1. Ces facteurs conduisent en situation physiologique à faciliter la survie cellulaire en condition d'hypoxie, et en situation pathologique à stimuler la croissance tumorale et stopper l'entrée des cellules en apoptose. Ces différents facteurs, notamment le

VEGF, ne sont pas sous la dépendance exclusive de HIF, mais peuvent être régulés également par d'autres voies.

Le VEGF, facteur proangiogénique majeur, joue un rôle particulièrement important dans la carcinogénèse du CCR, par son rôle primordial dans la néoangiogénèse [27]. Il existe plusieurs membres de la famille VEGF, (VEGF A, B, C, D et E) dont le principal est le VEGF-A ou VEGF. Le VEGF-A possède 9 isoformes générées par épissage alternatif, isoformes qui diffèrent par la présence ou non d'un domaine de liaison à l'héparine et aux héparanes sulfates. L'isoforme prédominante est l'isoforme VEGF 165, existant à la fois en forme soluble et liée à la matrice extracellulaire. Dans les CCR, les isoformes retrouvées surexprimées sont les VEGF 165, 121 et 189. Les autres molécules importantes dans l'angiogénèse et la lymphangiogénèse tumorales sont les VEGF-C et VEGF-D, qui sont exprimés sous le contrôle d'autres voies ne répondant pas à l'hypoxie.

Les récepteurs au VEGF (VEGFR), qui sont des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase, sont également de plusieurs types : VEGFR1 (ou Flt-1), VEGFR2 (KDR/FLK-1) et VEGFR3 (Flt-4). Le VEGFR2 est exprimé principalement par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, alors que le VEGFR3 est exprimé sur les cellules endothéliales aussi bien des vaisseaux sanguins que lymphatiques. Leur rôle va donc être différent, avec une action majeure dans la néoangiogénèse pour le VEGFR2, alors que le VEGFR3 interviendra surtout dans la lymphangiogénèse. Il existe par ailleurs une affinité différente des isoformes du VEGF pour les différents récepteurs : les VEGF-A 121 et 165 se lient sur les VEGFR1 et R2, tandis que les VEGF-C et D se lient sur les VEGFR2 et R3. [27]

Parmi les autres gènes cibles de HIF :

- le PDGF joue également un rôle dans l'angiogénèse. En effet, les cellules périvasculaires (pericytes et cellules musculaires lisses) expriment les récepteurs au

PDGF, et jouent un rôle primordial dans le soutien aux cellules endothéliales permettant ainsi le maintien des néovaisseaux et vaisseaux matures [28].

- le TGF α est un facteur de croissance des tissus épithéliaux, qui joue un rôle autocrine de stimulation de la prolifération pour la cellule tumorale, comme décrit ultérieurement.
- CA IX joue un rôle de protection en situation de stress hypoxique, en contrôlant le pH intracellulaire. Cette fonction est primordiale au sein d'une tumeur, où les cellules tumorales en position centrale sont soumises à un niveau élevé d'hypoxie.
- de même, les gènes du métabolisme du glucose facilitent certainement la survie de la cellule tumorale en situation de stress.

Ainsi l'activation de la voie de signalisation VHL/HIF/VEGF par inactivation du gène VHL serait un événement précoce de la carcinogenèse dans le CCR : la conséquence majeure en est l'hyper-expression de facteurs proangiogéniques. Les tumeurs en phase de croissance vont dépendre de cette néoangiogénèse à la fois pour leur propre développement mais également pour leur dissémination locorégionale et le développement de métastases. L'étude de la voie VHL a donc permis d'appréhender les mécanismes impliqués dans la néoangiogénèse tumorale, cette néoangiogénèse étant en partie responsable du caractère agressif et du potentiel métastatique de la tumeur et de ce fait, une cible thérapeutique majeure dans le CCR.

1.7.2. La voie PI3K/AkT/mTOR dans le CCR (Figure 3)

Une autre voie moléculaire apparaît également incontournable dans la biologie du cancer du rein : la voie PI3K/AkT/mTOR [29, 85]. Cette voie se situe en aval des récepteurs aux facteurs de croissance, récepteurs pour la plupart à activité tyrosine kinase, en parallèle avec la voie des MAPKinases. Dans la voie PI3K/AkT/mTOR, le récepteur active la PI3K, qui

active à son tour Akt en phosphorylant le phosphatidyl-inositol-di-phosphate (PIP2) en phosphatidyl-inositol-triphosphate (PIP3). PTEN est une phosphatase jouant un rôle d'inhibiteur d'Akt, en contrant l'action de la PI3K par la transformation du PIP3 en PIP2. Akt agit alors en régulant de nombreux substrats, dont mTOR. Le mode d'action de mTOR se fait au niveau de la synthèse protéique [30]. mTOR agit en effet en stimulant la traduction des ARNm en protéines, principalement par l'intermédiaire des facteurs 4E-BPs et p70S6K, dont les substrats sont réciproquement eIF4E, facteur d'initiation de la traduction, et la protéine ribosomale p70S6. Son action consiste donc en une augmentation globale de la synthèse protéique. Cependant, les facteurs initiateurs de la traduction ont une affinité variable envers les différents ARNm, en fonction de leur structure. Cette affinité est généralement plus importante pour les ARNm qui doivent être fortement régulés, notamment ceux codant pour les protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, de la prolifération ou de l'apoptose. L'activation de mTOR est principalement sous la dépendance de la voie PI3K/Akt, Akt inactivant des inhibiteurs de mTOR en les phosphorylant. Cependant, elle répond également à la stimulation par la voie des MAPKineses (Mitogene Activated Protein Kinases), mTOR pouvant être directement activée par ERK [31].

L'action de mTOR est observée à plusieurs niveaux de la carcinogénèse du CCR :

- Interaction avec la voie VHL-HIF-VEGF. En effet, l'activation de mTOR va conduire à l'augmentation de la traduction des ARNm de HIF α . mTOR agit donc, par l'intermédiaire de HIF, sur la néoangiogénèse tumorale indépendamment de VHL.
- Action de mTOR dans la transduction du signal. En effet, cette molécule apparaît comme un acteur « central » des voies de signalisation intracellulaires, agissant très en aval de la chaîne de transduction, en favorisant fortement le métabolisme tumoral par augmentation de la synthèse protéique. Cette augmentation de synthèse protéique, peu

spécifique, touche l'ensemble du métabolisme tumoral, et va se traduire par une surexpression des molécules impliquées dans la carcinogénèse, telles que les molécules favorisant l'entrée en cycle, ou les molécules anti-apoptotiques.

Dans le cadre du cancer du rein, l'action de mTOR va se dérouler au niveau de deux types cellulaires : d'une part au niveau de la cellule tumorale elle-même, où mTOR va agir à différents niveaux du métabolisme tumoral (survie cellulaire, prolifération) en amplifiant l'expression de facteurs déterminés par d'autres processus oncogéniques (de la même manière qu'elle amplifie la voie VHL/HIF/VEGF) ; d'autre part, elle agit également au niveau de la cellule endothéliale, en aval de la signalisation par le VEGFR, favorisant donc son action proangiogénique. mTOR apparaît donc essentielle à la carcinogénèse du cancer du rein, en jouant sur la néoangiogénèse à la fois au niveau de la cellule tumorale et de la cellule endothéliale, et en agissant par activation non spécifique du métabolisme tumoral.

1.7.3. Les voies de l'EGF et des MAPKinases dans le CCR (figure 4)

Le récepteur à l'EGF (EGFR) apparaît fréquemment surexprimé dans le cancer du rein. Un de ses ligands est le $TGF\alpha$, dont l'expression est notamment sous la dépendance de la voie VHL/HIF [32]. Les voies de signalisation sous la dépendance de l'EGFR sont connues pour leur rôle dans la carcinogénèse de nombreux cancers, conduisant à la stimulation de la prolifération et à l'inhibition de l'apoptose des cellules tumorales. Il y a donc un mécanisme d'entraînement, l'activation de la voie VHL/HIF permettant la surexpression de $TGF\alpha$, qui stimule en retour la prolifération tumorale via l'EGFR.

Deux voies de signalisation principales existent en aval des récepteurs à activité tyrosine kinase tels que l'EGFR : la voie PI3K/AkT/mTOR, déjà présentée, et la voie des MAPKinases. Dans cette voie, plusieurs kinases (Ras, Raf, MEK, ERK) sont successivement activées (les unes activant les autres dans une « cascade » de signalisation) et sont finalement responsables de modification d'expression de gènes multiples. Il est souvent proposé, de manière un peu simplificatrice, que la voie des MAPKinases joue en rôle prépondérant dans la prolifération, tandis que la voie PI3K/AkT/mTOR jouerait plus un rôle dans la survie et la croissance cellulaire. Il convient cependant de souligner l'interconnexion de ces différentes voies de signalisation, comme on l'a vu par exemple au niveau de mTOR. [32]

1.7.4. La voie Sonic Hedgehog

La voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh) est une voie physiologiquement activée durant l'embryogenèse et le développement [33]. Son gène, situé en 7q36, produit une pré-protéine de 45 kDa, qui va subir dans les conditions physiologiques un certain nombre de modifications post-transcriptionnelles [34].

Le récepteur membranaire de Shh est Patched (Ptch), dont il existe deux isoformes (Ptch1 et Ptch2). Ptch comprend 12 domaines transmembranaires. En l'absence de ligand, Ptch inhibe la migration à la membrane de la protéine Smoothed (Smo), en la maintenant à l'état inactif à l'intérieur de la cellule. Les facteurs de transcriptions Gli (Gli1, Gli2 et Gli3) sont alors liés à la protéine SUFU et restent inactifs dans le cytoplasme [35]. Gli3 est également phosphorylé par la PKA et va ainsi produire une protéine inhibitrice GLIR qui a une action de répression de la transcription des gènes cibles de Shh.

Lorsque Shh se fixe à son récepteur Ptch, il y a levée de l'inhibition de Smo qui va alors migrer à la membrane. Les facteurs de transcription Gli se dissocient ensuite de SUFU pour migrer dans le noyau et activer la transcription des gènes cibles. On note qu'une fois que Shh

est lié à Ptch, il y a une internalisation du complexe Shh-Ptch dans la cellule avant sa dégradation dans le lysosome [36].

Des études au sein de notre laboratoire ont montré la réactivation de la voie SHH dans le CCR, et cela indépendamment du statut VHL et que l'inhibition de la voie SHH induisait une diminution de plus de 70% de la prolifération cellulaire et augmente l'apoptose cellulaire sans modifier la senescence des cellules cancéreuses. [37]

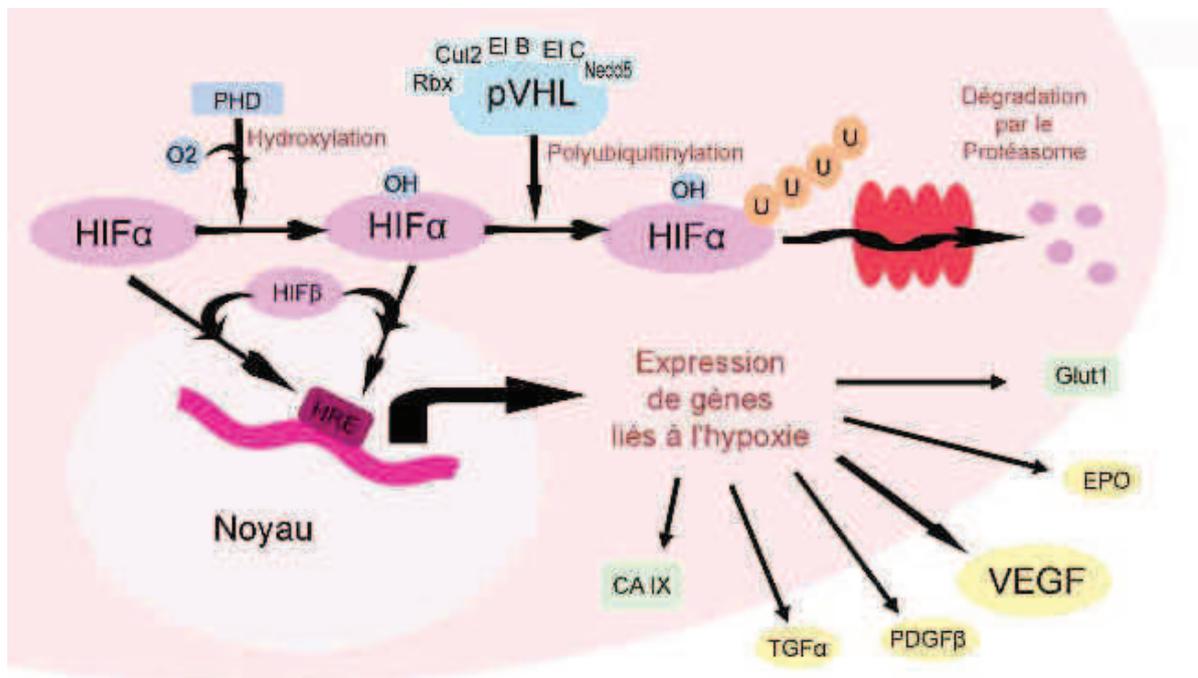


Figure 2 : Voie VHL/HIF/VEGF dans le CCR : En présence d'oxygène, la prolyl-hydroxylase (PHD) réalise l'hydroxylation de HIF. Une fois hydroxylé, HIF peut être polyubiquitinylé par le complexe poly-enzymatique formé autour de pVHL (qui comprend Rbx, Culin2 (Cul2), Elongin B (El B), Elongin C (El C) et Nedd8), et être ensuite dégradé par le protéasome. En cas d'hypoxie ou d'inactivation de VHL, HIF α va se lier à HIF β , se transloquer dans le noyau entraînant une surexpression de nombreux gènes liés à l'hypoxie en interagissant avec des domaines HRE (Hypoxia Responsive Elements) que contiennent les promoteurs de ces gènes. Ces gènes-cibles comprennent notamment le VEGF, le PDGF β , le TGF α , CA IX, l'EPO et Glut1. (J.Edeline, et al. 2010 [32])

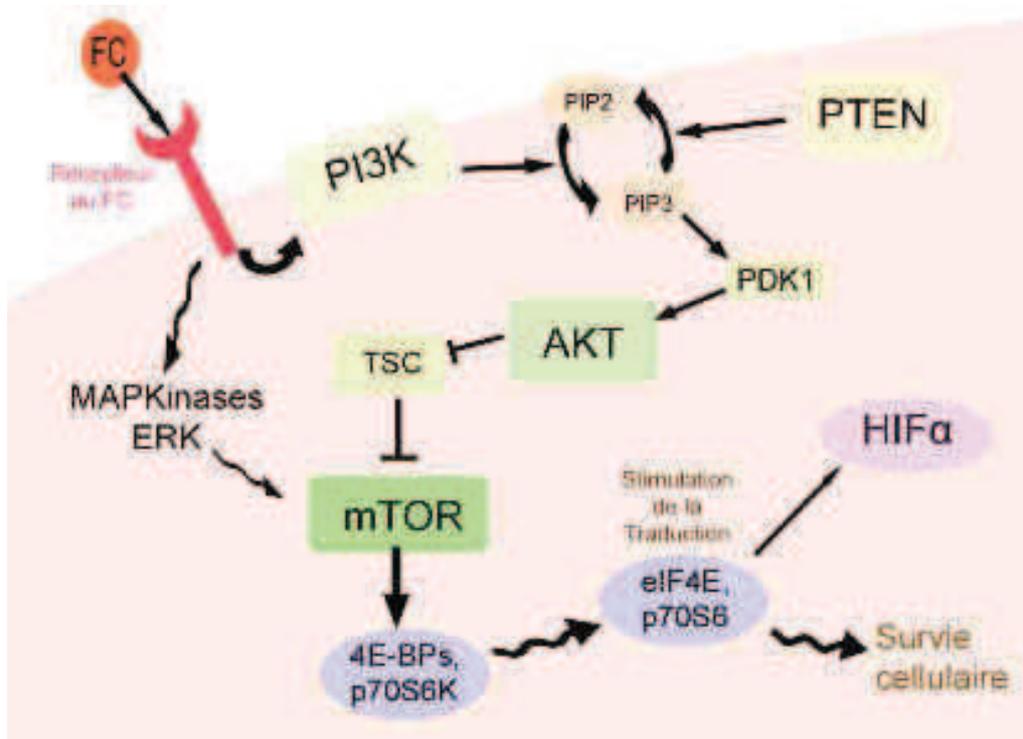


Figure 3 : Voie PI3K/Akt/mTOR dans le CCR : Après fixation du facteur de croissance (FC) sur son récepteur, celui-ci active la PI3Kinase, qui phosphoryle le phosphatidyl-inositol-diphosphate (PIP2) en phosphatidyl-inositol-triphosphate (PIP3). PTEN est une phosphatase qui induit la transformation du PIP3 en PIP2. Le PIP3 va activer PDK1, qui activera à son tour Akt. Akt va inhiber TSC (Tuberous Sclerosis Complex), qui inhibe à son tour mTOR. Finalement, mTOR joue sur la régulation de facteurs qui contrôlent eux-mêmes des protéines-clés dans la traduction : d'une part, mTOR inhibe les protéines 4E-BP qui lient en l'inhibant le facteur initiateur de la traduction eIF4E, et d'autre part, mTOR active la p70S6K qui active la protéine ribosomale p70S6. Au total, il en résulte une stimulation peu spécifique de la traduction, qui conduit notamment à une augmentation de protéines liés à la survie cellulaire, et par ailleurs à une augmentation de l'expression de HIF α . De plus, mTOR peut également être activée par la voie des MAPKinases. (J.Edeline, et al. 2010 [32])

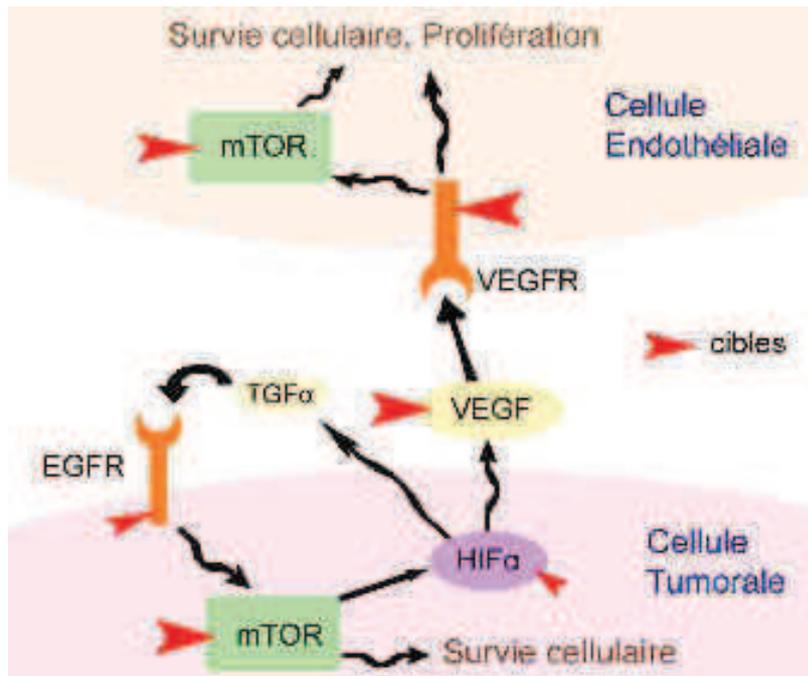


Figure 4 : Cibles thérapeutiques explorées dans le cancer du rein. Elles comprennent : dans la cellule tumorale, l'EGFR, mTOR et HIF ; en extracellulaire, le VEGF ; dans la cellule endothéliale, le VEGFR et mTOR. Les médicaments ayant obtenu l'AMM dans le cancer du rein ciblent mTOR (Temsirolimus), le VEGF (bevacizumab) et son récepteur (Sunitinib et Sorafenib). (J.Edeline, et al. 2010 [32])

1.8. Le rôle de l'angiogenèse

1.8.1. L'angiogenèse

Après la formation du plexus vasculaire primitif, de nouvelles cellules endothéliales sont formées, générant des nouveaux capillaires par bourgeonnement ou par intussusception.

L'angiogenèse est le processus de formation de ces nouveaux vaisseaux sanguins à partir du plexus vasculaire primitif ou de vaisseaux préexistants (Figure 5). L'étude moderne de l'angiogenèse a été initiée par Folkman en 1971, lorsque ce dernier émit l'idée d'une angiogenèse active nécessaire à la croissance tumorale [38].

Après la naissance, l'angiogenèse contribue à la croissance des organes, mais à l'âge adulte les vaisseaux sanguins restent quiescents et l'angiogenèse n'est présente dans les conditions

physiologiques que dans le cycle ovarien et dans la grossesse. L'angiogenèse est aussi importante dans la réparation des tissus et la cicatrisation lors d'une blessure ou d'une ischémie. Cependant, l'angiogenèse est dérégulée dans certaines pathologies avec des cas où elle est excessive (comme le cancer, la polyarthrite rhumatoïde ou encore la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), et des cas où elle est insuffisante (comme la pré-éclampsie) [39].

1.8.2. L'angiogenèse tumorale

L'oxygène diffuse dans les tissus dans un rayon de 100 µm autour d'un capillaire [40-41]. Les cellules tumorales ont donc besoin pour avoir un approvisionnement en oxygène ainsi qu'en nutriments et pour éliminer leurs déchets de mettre en place un réseau vasculaire. Cette mise en place du réseau vasculaire tumoral suit des mécanismes qui miment ceux de l'angiogenèse physiologique [42]. Cependant l'analyse fine de cette vascularisation fait apparaître des différences dans la structure des vaisseaux tumoraux par rapport à une vascularisation physiologique (Figure 6). En effet, les vaisseaux tumoraux apparaissent dilatés, tortueux, perméables suite à la fenestration de l'endothélium, d'un espace transcellulaire et d'une membrane basale incomplète [43]. De plus, la couverture en péricytes des vaisseaux tumoraux est faible [44]. Les facteurs de l'angiogenèse tumorale sont les mêmes que ceux décrits pour l'angiogenèse physiologique. Ainsi, le VEGF, induit très fortement par l'hypoxie [45-46], est sécrété par les cellules tumorales, et son niveau d'expression dans la tumeur est corrélé avec la densité des vaisseaux sanguins tumoraux [47].

Lors de cette angiogenèse tumorale, il n'y a pas de véritable phase de maturation des vaisseaux. Le recouvrement de l'endothélium par les péricytes est anormal et les jonctions sont incomplètes. Au final, les vaisseaux tumoraux sont mal formés d'où l'augmentation de la

perméabilité vasculaire observée dans les tumeurs. La tumeur est entourée d'un tissu appelé stroma contenant de nombreux types cellulaires comme les fibroblastes, les cellules inflammatoires et les macrophages. Ces cellules participent également au processus d'angiogenèse et de progression tumorale.

Microvascularisation normale Microvascularisation tumorale

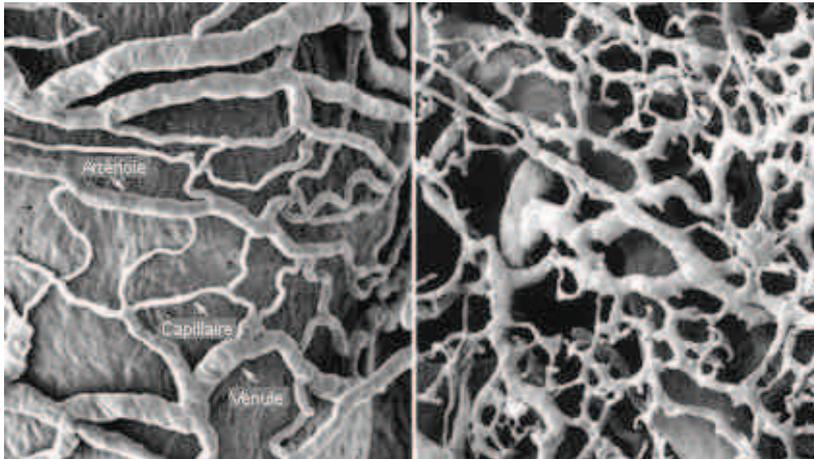


Figure 5: Contraste entre la microvascularisation normale et tumorale. D'après [48]
A gauche, vascularisation du rat avec une organisation classique composée d'artérioles et de veinules séparées par des capillaires. A droite, vascularisation d'une tumeur (xénogreffe de tumeur humaine sur une souris immunodéprimée). La vascularisation est désorganisée, sans hiérarchie et avec des branchements excessifs.

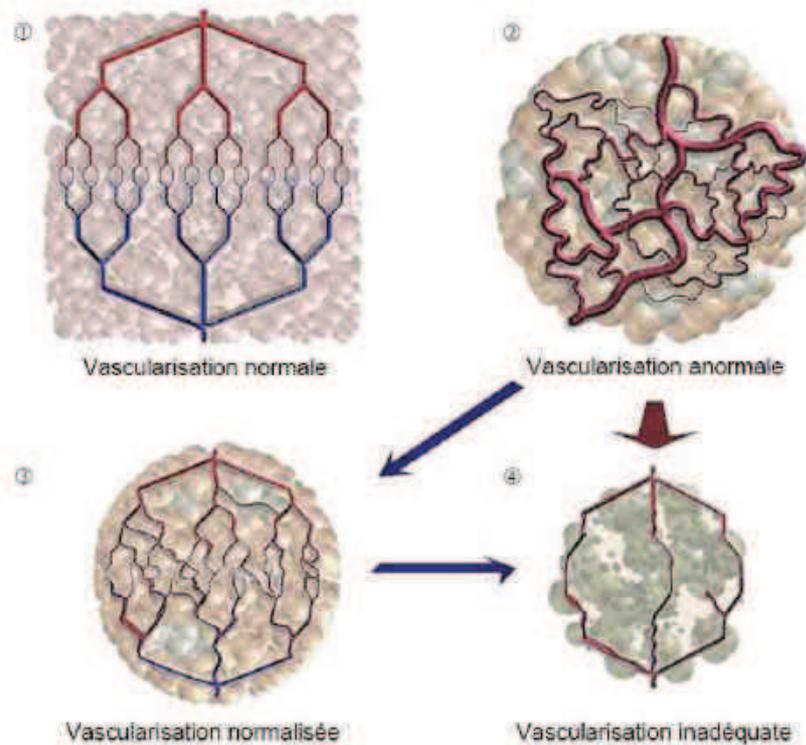


Figure 6 : Représentation de l'évolution de la vascularisation tumorale lors d'une thérapie anti-angiogénique. D'après [49].

1. Vascularisation normale
2. Vascularisation tumorale anormale,
3. Thérapies anti-angiogéniques induisant une disparition des vaisseaux immatures et aboutissant à un réseau plus structuré.
4. But ultime des thérapies anti-angiogéniques, la disparition de la vascularisation tumorale

1.8.3. Le rôle de l'angiogénine dans l'angiogénèse

L'angiogénine peut intervenir à différents niveaux de la cascade angiogénique. Elle active les cellules endothéliales en induisant la synthèse de protéases conduisant à la dégradation de la membrane basale. L'angiogénine peut induire la migration et la prolifération des cellules endothéliales ainsi que leur organisation en capillaires. L'angiogénine peut également agir sur les cellules partenaires des cellules endothéliales, les cellules vasculaires musculaires lisses en inhibant leur prolifération. Elle agit sur les cellules endothéliales et les cellules musculaires

lisses *via* des récepteurs spécifiques et stimule dans ces cellules la production de médiateurs connus de la signalisation intracellulaire

1.8.4. Gene et structure de l'angiogénine

L'angiogénine humaine, de masse moléculaire 14124 daltons, est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 123 acides aminés (Figure 7). Elle présente 3 ponts disulfures nécessaires pour ses activités et un point isoélectrique extrêmement basique $pI > 9,5$. La structure cristallographique de l'angiogénine humaine a été résolue. (Figure 8). A l'exception de la cyclisation de l'acide aminé amino-terminal (<Glu), l'angiogénine humaine ne présente pas de modification post-traductionnelle. Le gène et l'acide désoxyribonucléique complémentaire

(ADNc) de l'angiogénine humaine ont été caractérisés. Le gène angiogénine est localisé sur le chromosome humain 14, dans la région 14q11.

1.8.5. Expression de l'angiogénine

L'expression de l'angiogénine a été recherchée dans les liquides physiologiques et au niveau tissulaire chez l'homme et chez d'autres mammifères. La protéine est présente dans le plasma humain normal, le liquide amniotique (7,8-43,3 ng/ml au second trimestre) [50] et le liquide folliculaire [51].

En culture cellulaire, la protéine est sécrétée par toutes les cellules humaines à croissance dépendante d'ancrage testées, cellules normales vasculaires endothéliales et musculaires lisses, cellules épithéliales normales et tumorales, et fibroblastes. Elle atteint des concentrations de l'ordre du ng/million de cellules [52, 53].

L'ARNm de l'angiogénine d'environ 1 kb est détecté dans de nombreux tissus humains: pancréas, poumon, prostate, testicule, ovaire, intestin grêle, colon, cœur, rein, muscle squelettique et leucocytes. Le foie est l'organe où l'ARNm est le plus abondant [54].

1.8.6. Propriétés biologiques de l'angiogénine

L'angiogénine est un inducteur puissant de la croissance des vaisseaux puisqu'il suffit de 0,5ng (35 fmol) pour observer une angiogenèse dans la membrane chorioallantoïdienne de l'embryon de poulet, 50 ng (3,5 pmol) dans la cornée de lapin, 100 ng (7 pmol) dans le ménisque du lapin, et de 1 nmol dans des essais cutanés chez la souris [55].

In vitro, l'angiogénine stimule l'activité fibrinolytique de cellules endothéliales (GM 7373) cultivées sur gel de fibrine, et induit l'invasion des cellules endothéliales dans une matrice de Matrigel. Elle régule positivement les ARNm des deux types d'activateurs du plasminogène de type urokinase (u-PA) et de type tissulaire (t-PA) ainsi que l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1). L'angiogénine active la migration des cellules endothéliales dans des expériences de cicatrisation *in vitro* et induit l'organisation en capillaires des cellules endothéliales sur gel de collagène de type-I [55]

1.8.7. Angiogénine et pathologies

L'angiogénine a montré une action protectrice sur les motoneurones, il est possible qu'un lien causal existe entre mutations de l'angiogénine et la sclérose latérale amyotrophique. Des facteurs d'angiogenèse associés à l'angiogénine pourraient protéger directement le système nerveux central et les motoneurones. Des expériences avec de l'angiogénine sauvage ont montré qu'elle ralentit la dégénérescence des motoneurones chez des souris qui ont développé une sclérose latérale amyotrophique. L'expression de l'angiogénine dans la maladie de Parkinson est considérablement réduite en présence d'agrégats d' α -synucléine. L'application

d'angiogénine exogène sur des cellules produisant de la dopamine conduit à la phosphorylation de la PKB/AKT ; l'activation de ce complexe inhibe le clivage de la caspase 3 et l'apoptose lorsque les cellules sont exposées à une substance simulant la maladie de Parkinson [56].

1.8.8. Angiogénine et cancer

L'angiogénine apparaît associée au développement tumoral. En effet, sa concentration sérique est augmentée chez les patients atteints de divers cancers. L'implication de l'angiogénine dans le développement tumoral est suggérée par les corrélations observées de l'augmentation de son expression tissulaire avec l'agressivité tumorale dans le cancer pancréatique, gastrique [57], urothelial [58] et colorectal [59] et de l'augmentation de sa concentration sérique avec le grade de la tumeur de l'ovaire [60], de l'endomètre [61] et du col utérin [62]. Une expression accrue a été également détectée dans les tumeurs mammaires et localisée dans les cellules de carcinome [63].

La possibilité de réguler la production d'angiogénine est illustré dans un modèle de souris où l'indométhacine, un inhibiteur de la synthèse de prostaglandine, a été montré inhiber la production de PGE2 par les tumeurs MGG 101, réduisant la taille des tumeurs et prolongeant la survie des animaux. Chez les animaux traités, l'expression tumorale des ARNm de l'angiogénine et du FGF-2 diminuent ainsi que la vascularisation du tissu tumoral [64]. Nous n'avons pas trouvé d'études qui décrivent le rôle de l'angiogénine dans le CCR, ni l'effet du traitement anti-angiogénique ou la résistance au traitement sur l'expression de l'angiogénine.



Figure 7 : Séquence protéique de l'angiogénine humaine. Les résidus du site actif His-13, Lys-40, et His-114 sont en caractères gras. Le domaine de liaison au récepteur est souligné d'une flèche. La ligne continue indique le peptide inhibant la dégranulation des leucocytes polymorphonucléaires; la ligne pointillée indique la séquence d'adressage nucléaire; l'astérisque identifie les acides aminés du domaine liant l'héparine. <Glu: acide pyroglutamique. D'après [65]

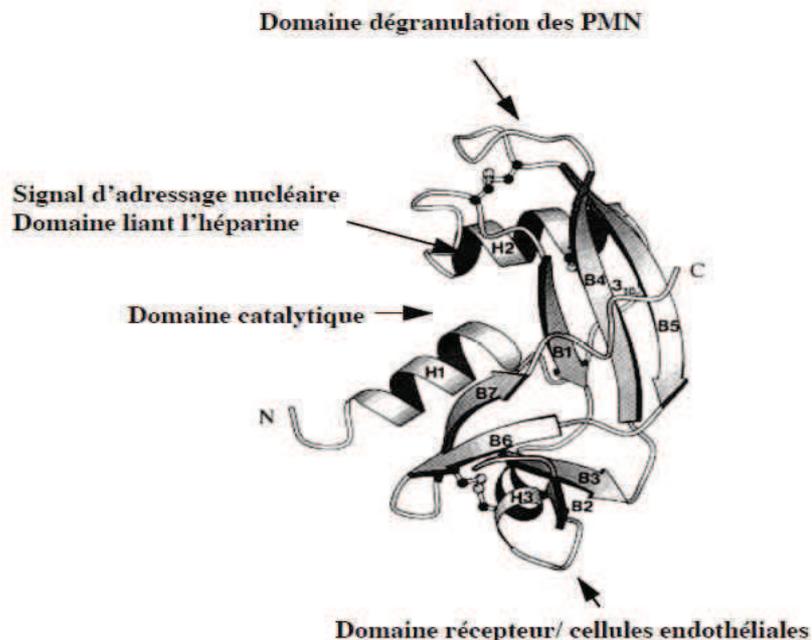


Figure 8 : Représentation tridimensionnelle de l'angiogénine. D'après [65]

1.9. Résistance aux agents thérapeutiques

1.9.1. Les antiangiogéniques : mécanisme d'action

1.9.1.1. Inhibiteurs proximaux

Le but de l'inhibition proximale est de réguler toute l'activité de HIF alpha. Elle est théoriquement très intéressante puisqu'elle bloque toutes les voies d'aval. Malheureusement elle peut conduire à des effets indésirables très importants. Il existe actuellement deux molécules principales qui ont cette propriété : le temsirolimus et l'évérolimus qui sont des inhibiteurs de mTOR.

Temsirolimus (CCI 779, Wyeth Pharmaceuticals Cambridge, MA) est un dérivé de la rapamycine métabolisé en sirolimus par oxydation hépatique. Le temsirolimus étant un substrat du cytochrome P450, sa concentration donc son efficacité sont moindres chez les patients prenant des inducteurs de P450 (anticonvulsivants notamment).

L'activation de la voie mTOR entraîne une augmentation de l'expression de protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire mais également de l'expression de HIF alpha. Le temsirolimus forme un complexe en se liant à la protéine FK-506-BP12 pour exercer son activité anti-mTOR. Il inhibe alors les cyclines nécessaires à la progression du cycle cellulaire (phase G1 à S) et diminue l'activité de HIF alpha et l'angiogénèse [66].

Everolimus (RAD001, Novartis Pharma AG, IST Anover, NJ) est un inhibiteur de mTOR par voie orale dont le mécanisme d'action est identique au temsirolimus. Cette molécule initialement développée comme immunosuppresseur en transplantation a été secondairement utilisée en oncologie. Il se lie au FK-506-BP12 pour exercer son action inhibitrice.

1.9.1.2. Inhibiteurs distaux

Ce sont des inhibiteurs de tyrosine-kinase (TKI). Le **sunitinib** (SU 11248, Sutent, Pfizer, NY, NY) est une molécule qui inhibe de multiples récepteurs de tyrosine kinase (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR, KIT récepteurs et FLT3 récepteurs [67] (Patel 7215-14). Ainsi, le sunitinib inhibe les acteurs importants qui contribuent à l'évolution de cancer du rein et notamment le VEGFA et le PDGF. Sa prise est orale à 50 mg/j, 4 semaines de traitement et 2 semaines off. Les doses peuvent être réduites à 37,5 mg/j voire 25 mg/jour en cas de toxicité importante.

Le **sorafenib** (BAY 43-9006, Nexavar, Bayer Corp., West Haven, City et Onyx pharmaceuticals, Emeryville, CA) est également un inhibiteur de kinases en l'occurrence la serine/thréonine RAF-1 kinase. Il inhibe également d'autres récepteurs de tyrosine kinase notamment VEGFR 2, VEGFR 3 et PDGFR [68].

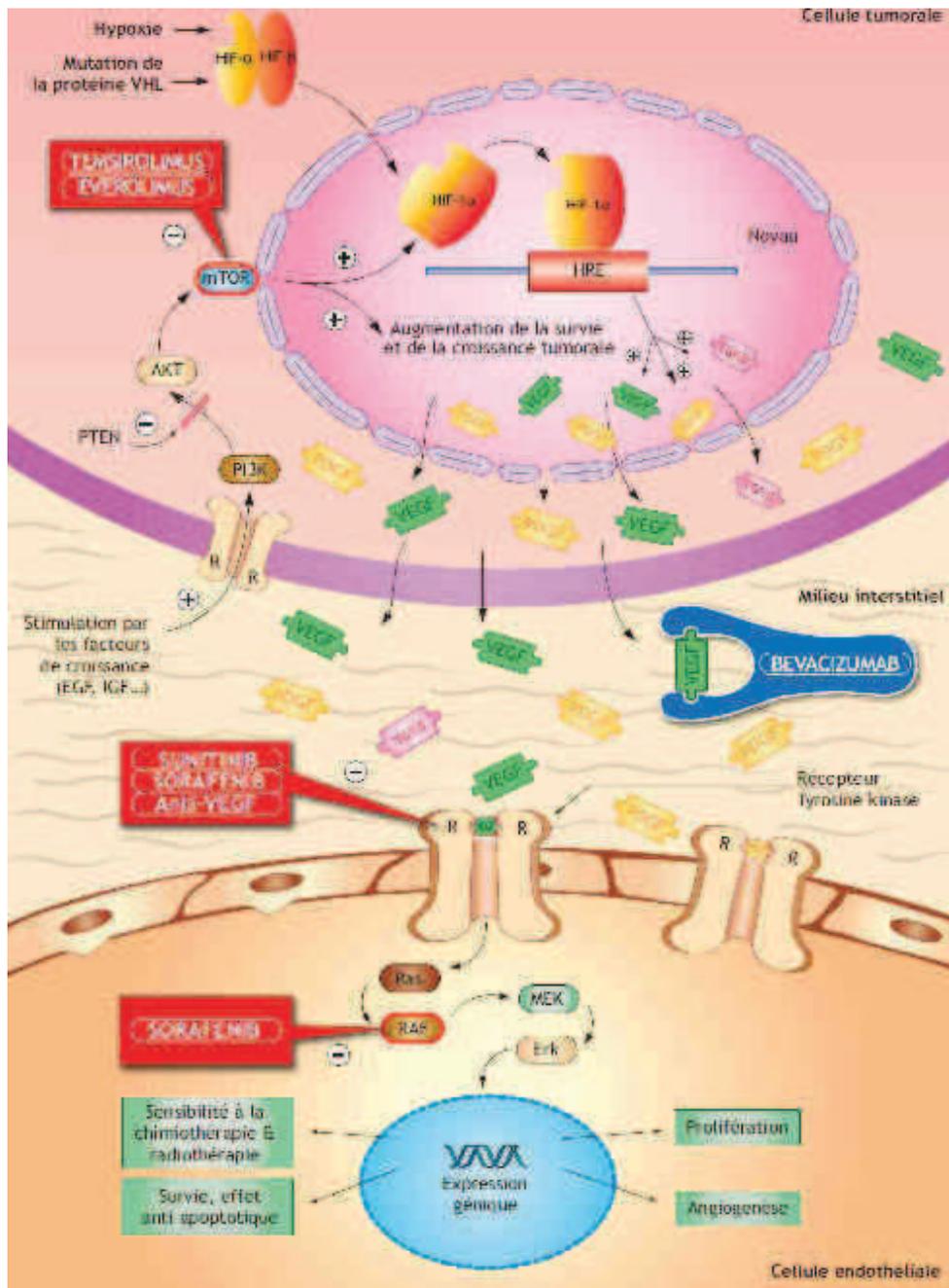


Figure 9 : les anti-angiogéniques : mécanisme d'action

Temozolimus et Everolimus forme un complexe en se liant à la protéine FK-506-BP12 pour exercer son activité anti-mTOR.

Les inhibiteurs de tyrosine-kinase : le sunitinib inhibe de multiples récepteurs de tyrosine kinase (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR, KIT récepteurs et FLT3 récepteur. Le Sorafenib, un inhibiteur de kinases, la serine/thréonine RAF-1 kinase.

1.9.2. Mécanismes impliqués dans la résistance

Les mécanismes impliqués dans la résistance aux traitements font l'objet d'une recherche très active. D'un point de vue clinique, la résistance à un traitement peut être intrinsèque / constitutive, ou apparaître de manière secondaire (résistance induite / acquise). Toutes deux résultent de nombreux changements génétiques et épigénétiques intervenant au sein de la cellule cancéreuse. Afin de prédire ces résistances et de les contrer, il est nécessaire de comprendre les mécanismes biologiques impliqués dans ce phénomène.

Un traitement peut être inefficace dès le départ en cas de résistance constitutive due aux caractéristiques de la tumeur ou du patient. Ainsi, une vascularisation insuffisante peut empêcher la diffusion voire l'arrivée de la molécule aux cellules cancéreuses. De même, pour une tumeur dont la croissance serait lente, le nombre de cellules atteintes par le traitement par rapport à la masse globale de la tumeur est faible. Or, la majorité des chimiothérapies ciblent la division cellulaire.

Des modifications génétiques spontanées vont survenir progressivement, avec apparition de variants du clone initial, entraînant une hétérogénéité de la tumeur. Ces clones variants auront des comportements prolifératifs, invasifs, antigéniques, et métastatiques hétérogènes, ou encore une sensibilité inégale à la chimiothérapie, les cellules sensibles au traitement sont rapidement détruites, menant à la sélection des cellules résistantes qui vont alors se multiplier et former une tumeur résistante.

De même, les caractéristiques du patient comme une réduction du métabolisme ou une augmentation du catabolisme peuvent empêcher l'activation de prodrogues résultant en une faible concentration sérologique et une tolérance réduite aux molécules administrées [69].

Par ailleurs, un traitement qui donnait de très bons résultats, peut rapidement devenir totalement inefficace compte tenu des capacités d'adaptation des cellules tumorales. En effet, les cellules tumorales peuvent activer ou surexprimer des pompes à efflux comme la P-

glycoprotéine et la MRP (Multidrug Resistance–associated Protein) entraînant une sortie de la drogue plus rapide que son entrée, mais aussi modifier l'activité de systèmes enzymatiques, conduisant souvent à des résistances croisées et multiples [69]. De même, les transporteurs permettant l'entrée de la drogue dans la cellule peuvent être détruits, et la cible de l'anticancéreux peut être surexprimées (aboutissant à une posologie non adaptée), ou mutée au niveau de son site de fixation.

Une autre voie de recherche repose sur les composants du microenvironnement tumoral qui est connu pour conditionner les cellules tumorales.

1.9.3. Résistance et CCR

Dans le cas du CCR, les mécanismes sus cités ne sont pas impliqués dans les phénomènes de résistances, au contraire de voies/marqueurs oncogéniques.

En effet, NF- κ B est activé en réponse aux chimiothérapies et à la radiothérapie, supprimant ainsi le potentiel apoptotique de la thérapie, par activation de la transcription de gènes antiapoptotiques [70]. La réexpression de Pax 2 dans le CCR entraîne une résistance à l'apoptose induite par le cisplatine, et son inhibition permet de retrouver le potentiel apoptotique de la thérapie [71]. De même l'inhibition spécifique de GSK-3 (glycogen synthase kinase-3) activé lors du traitement des CCR par le sorafenib, potentialise son action antitumorale [72].

Il ne faut toutefois pas se restreindre à l'étude des voies développementales qui ne constituent qu'une piste dans l'étude des résistances du CCR aux thérapies. De récentes études montrent le rôle d'autres voies cellulaires. Ainsi, il existe une corrélation entre la diminution de l'expression du gène suppresseur de tumeurs PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) et la résistance au sunitinib. Une restauration de son expression augmente de façon manifeste la

sensibilité des cellules tumorale au traitement, indiquant une possible implication dans la résistance intrinsèque au sunitinib [73].

De récentes études montrent l'implication du microenvironnement dans la mise en place d'une résistance dans d'autres types de cancers : hépatique [74], cérébral [75], pancréatique [76], cancer du sein [77-78], et également dans le cancer rénal [79].

Bien que non transformées, les cellules stromales sont subverties et contrôlées par les cellules tumorales pour répondre à leurs propres besoins, afin par exemple de bénéficier de leurs facteurs de croissance de façon paracrine [80]. La croissance tumorale provoque l'apparition de zones, au cœur de la tumeur solide, où l'apport sanguin et, par conséquent en oxygène et en nutriments, sont diminués. Cette déficience en oxygène, provoque l'activation des facteurs HIFs, déclenchant plusieurs voies de signalisation, régulant de multiples processus cellulaires tels que l'inhibition de l'apoptose, l'angiogenèse, la prolifération cellulaire, la surexpression des MRP affectant de ce fait la chémosensibilité [80-83]. De plus, les cellules souches cancéreuses présentes dans la majorité des tumeurs, semblent exprimer un arsenal de défense spécifique contre les agents anticancéreux [84-85]. Ces dernières sont donc les cellules à éradiquer en priorité.

Dans d'autres cas, l'acquisition de résistances est assurée par l'existence de voies angiogéniques redondantes. Les cellules tumorales peuvent activer un « Switch angiogénique » qui entraîne soit une surexpression de voies angiogéniques préexistantes, soit l'induction de voies VEGF-indépendantes responsables de la revascularisation tumorale [86-87].

Enfin, la perte de boucles de rétroactions négatives causées par l'inhibition de mTOR mène à une régulation positive d'effecteurs en aval de la voie PI3K/Akt et de fait à une activation des facteurs HIF, et de l'angiogenèse, phénomènes favorables à la tumorigenèse [88]. Dans le but

de contourner les résistances aux inhibiteurs de la voie mTOR, plusieurs composés sont en cours de développement, ou au cœur d'essais cliniques. Ces nouveaux composés ont une double action, ciblant directement l'activité kinase de mTOR en combinaison avec un inhibiteur spécifique de PI3K, ou d'Akt ou des MAPK, ou de MEK [89].

Exemple de mécanisme de résistance étudié : La résistance pour la protéine mTOR a été étudiée par Carew et al [90]. Étant située en aval de la voie PI3K/Akt/Mtor et ne semblant pas être mutée dans les phénomènes cancéreux [91], il était donc supposé qu'il n'y aurait pas de problème de résistance avec les inhibiteurs de mTOR. Or, la réponse à ces traitements ne serait pas durable dans le temps et se traduirait à terme par une progression de la maladie.

Différentes hypothèses sont proposées pour expliquer cette résistance [90]. Parmi elles :

- Les substrats de la protéine mTOR seraient plus ou moins sensibles à l'action des inhibiteurs de mTOR. Alors que la phosphorylation de S6K1 semble totalement inhibée, la phosphorylation de la protéine 4E-BP1 pourrait être restaurée malgré l'action des inhibiteurs de mTOR.
- L'activation de mTORC1 entraîne un rétrocontrôle négatif sur la formation de PI3K (via S6K1). L'inhibition de mTORC1 pourrait lever ce rétrocontrôle négatif, ce qui se traduirait par une activation de PI3K et d'Akt en amont de mTOR.
- Il existe un phénomène de compétition entre mTORC1 et mTORC2 pour l'accès à la protéine mTOR. L'inhibition de mTORC1 conduirait à une formation accrue du complexe mTORC2 qui serait capable d'activer Akt.
- L'inhibition de mTORC1 conduirait à une activation accrue de la voie MAPK-ERK.
- Des mutations de la protéine mTOR ou de FKBP-12 seraient possibles.

HYPOTHESES ET OBJECTIFS

Comprendre les mécanismes de résistance aux thérapies est un des enjeux majeurs de la recherche en oncologie, particulièrement pour le cancer du rein où l'efficacité des traitements reste très limitée. Les mécanismes classiques de résistance ne sont pas impliqués dans le cas du CCR ; les mécanismes sont donc à rechercher. De manière importante, quelques publications indiquent que certains marqueurs et voies oncogéniques peuvent être paradoxalement induits par les thérapies, masquant une éventuelle efficacité des traitements.

Notre hypothèse est que des voies signalétiques prolifératives, anti-apoptotiques et angiogéniques seraient paradoxalement activées par les thérapies et impliquées notamment dans la résistance induite.

Ainsi, dans le cadre de cette thèse, il s'agit de mesurer la sensibilité aux chimiothérapies et aux thérapies ciblées des lignées cellulaires du cancer du rein *in vitro* mais aussi *in vivo* sur des modèles de xénogreffes, de tumeurs rénales issues de ces lignées cellulaires humaines, chez la souris nude immunodéprimée puis d'identifier les voies de signalisation spécifiques mises en jeu par les thérapies en particulier les voies angiogéniques. Un accent particulier a été donné aux mécanismes de résistance au sunitinib, molécule thérapeutique de première ligne dans le cancer du rein avancé.

MATERIELS ET METHODES

1. Les Modèles d'étude

1.1. Les lignées cellulaires humaines

Les lignées cellulaires déficientes en VHL (786-O et A498) ou exprimant le gène VHL (Caki-1 et Caki-2) ont été obtenues chez ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Etats Unis). L'ensemble des lignées était maintenu dans du DMEM (Dulbecco Minimal Essential Medium, Gibco, Auckland, Nouvelle-Zélande), supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (FBS Invitrogen, St Aubin, France) et 1% d'un mélange d'antibiotiques, pénicilline et streptomycine (PenStrep, Gibco), à 37°C dans une enceinte humide à 10% de CO₂.

1.1.1. Le traitement

Les lignées cellulaires de CCR ont été traitées avec deux classes d'agents anticancéreux : trois anti-angiogéniques (sunitinib, sorafenib, évérolimus) et trois cytotoxiques (cisplatine, 5FU, vinblastine). Chaque molécule a été testée à différentes concentrations en fonction de l'étude réalisée. Les doses utilisées sont les suivantes : Pour les anti-angiogéniques (Abmole) : sunitinib (0,1 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM), sorafenib (0,05 µM, 0,1 µM, 0,5 µM, 1µM ; 5 µM, 10 µM) et évérolimus (0,01µM, 0,1µM,1 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM).

Pour les cytotoxiques : le 5-FU (5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM) (Sigma Aldrich St Quentin Fallavier, France), cisplatine (1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 100 µM) (Merck Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), vinblastine (0,0001 µg/ml, 0,001 µg/ml, 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml) (Sigma Aldrich).

1.2. Les tissus humains :

Le laboratoire, par convention avec la Société UROLEAD (en collaboration avec le service d'urologie du Nouvel Hôpital Civil Strasbourg, après obtention du consentement éclairé des patients), a accès à des modèles pré-cliniques de RCC basés sur des xénogreffes de tumeurs rénales humaines chez la souris nude. Des études en interne ont été réalisées, évaluant en l'occurrence l'efficacité du sunitinib sur certains de ces modèles. Les modèles STO J et DER JM ont ainsi été identifiés comme respectivement résistant et sensible au sunitinib. Les tissus prélevés ont été conservés dans l'azote liquide et implanté selon le même schéma (voir paragraphe ci-dessous).

1.3. Les souris xénogreffées

1.3.1. Protocole d'implantation des souris nude et traitement

Les expérimentations menées chez la souris ont été réalisées dans le respect des règles bioéthiques et de la législation française. Les souris mâle nude athymiques SWISS nu^{-/-} (Charles River Laboratories, l'Arbresle, France) étaient maintenues dans des conditions aseptisées : l'eau, la nourriture, les cages et la litière sont autoclavées et les manipulations réalisées dans une pièce dédiée à l'expérimentation animale. Les souris, âgées de 4 semaines à la livraison, ont subi une semaine d'habituation avant le début de l'expérimentation. L'implantation des cellules A498 et 786-O chez les souris anesthésiées à l'isoflurane (anesthésie gazeuse) était réalisée à partir de cellules en phase exponentielle de croissance (80% de confluence). Environ 10 millions de cellules étaient injectées en sous-cutané au niveau du cou dans le dos de l'animal. Lorsque le volume de la tumeur atteint environ 200 mm³, 3 à 4 semaines après injection, les souris ont été utilisées pour tester les différents

traitements. Deux souris ont été sacrifiées avant le début du traitement afin de servir de contrôle interne.

Les souris étaient randomisées en plusieurs groupes de volume tumoral équivalent : des groupes contrôles recevront le solvant uniquement, alors que les autres groupes seront traités avec deux classes d'agents anticancéreux : deux anti-angiogéniques et trois cytotoxiques. Le nombre de de souris par groupe était de 5 (3 souris pour le contrôle et 2 souris traitées).

Le protocole de traitement était le suivant : évérolimus 10 mg/kg per os 5 fois par semaine, sunitinib 40 mg/kg per os 3 fois par semaine.

Pour les cytotoxiques : 5-FU 10 mg/kg IP 5 fois par semaine, cisplatine 5 mg/kg IP 1 fois par semaine, Vinblastine 0,4 mg/ kg IP 2 fois par semaine.

Les solutions stock étaient préparées dans du DMSO 100%. La concentration finale maximale de DMSO dans les solutions injectées aux souris est de 0,01%.

1.3.2. Mesure de la croissance tumorale et traitement

Le volume des tumeurs était mesuré deux fois par semaine à l'aide d'un pied à coulisse électronique, puis calculé selon la formule : Longueur x Largeur² x 0,5236 (Massfelder et al. 2004). Un suivi du poids et de la température de chaque souris était effectué, ainsi qu'une surveillance régulière de l'état général. A l'issue du traitement, les souris sont sacrifiées. Les tumeurs sont collectées, pesées et mesurées. Après dissection des régions nécrotiques, une partie de la tumeur était conservée dans le formol pour les analyses immuno-histochimiques, le reste était conservé dans l'azote liquide pour les analyses de biologie moléculaire (PCR en temps réel, Western Blot, proteome array).

1.3.3. Analyses immunohistochimiques

1.3.3.1. Néovascularisation tumorale

Pour mesurer les effets des traitements sur la densité microvasculaire, les coupes sont préparées comme décrit dans le paragraphe (Mesure de la croissance tumorale et traitement), puis marquées avec un anticorps anti-facteur VIII (DAKO). Après digestion enzymatique à la protéinase K, les coupes sont incubées avec l'anticorps primaire (dilution 1/40) pendant 30 minutes à température ambiante. La visualisation du marquage se fait selon une procédure identique à celle décrite ci-dessus par le Ki-67. La densité microvasculaire était déterminée en comptant pour chaque tumeur, d'une part le nombre d'intersections de vaisseaux dans 4 champs à grossissement 40 ; et d'autre part le nombre de branchements dans 5 champs de 0.25mm² chacun.

2. Etude de l'expression des ARNs

2.1. Extraction à partir des tissus

L'ARN totale était extrait des tissus humains par la technique au TRIzol (Invitrogen) selon protocole défini par le fournisseur. Le TRIzol est une solution mono-phasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidine qui permet de lyser les cellules et de dissoudre les composants cellulaires tout en préservant l'intégrité des ARN. Brièvement, les tissus sont broyés à l'aide d'un broyeur à billes dans 1 ml de TRIzol et les cellules sont lysées dans ce même réactif. Afin d'assurer une dissociation des complexes nucléoprotéiques, les échantillons sont laissés à reposer pendant 5 minutes à température ambiante. Après addition de 200µl de chloroforme, le mélange est agité vigoureusement à la main pendant 15 secondes et incubé pendant 10 minutes à température ambiante. Une séparation de phase est effectuée par centrifugation à 4°C pendant 15 minutes à 14000 G, puis les ARN contenus dans la phase aqueuse sont

recupérés et précipités par addition de 500µl d’isopropanol. Les tubes sont alors agités, incubés à température ambiante pendant une dizaine de minutes puis centrifugés à 14000 G pendant 10 minutes à 4°C. Les culots sont lavés à l’éthanol 75% séchés à l’air, puis repris dans 10 à 50µl d’eau distillée additionnée de 0.1% de diéthyl-pyrocarbonate, un inhibiteur de nucléases. Les concentrations sont déterminées par densité optique à 260nm et la pureté des échantillons d’ARN est calculée par le rapport des densités optiques à 260nm et 280 nm. Un rapport égal ou supérieur à 1.8 indique l’absence de contamination de la préparation d’ARN par les protéines.

2.2. La transcription inverse

Le kit SsoAdvanced™ Universal SYBR®Green Supermix a été utilisé. Le volume total à tester était de 20 µl. Le mélange comprenait 2µl d’échantillons, 7 µl de H₂O, 10µl SYBR Green supermix, et 1 µl de miScript Reverse Transcriptase Mix (amorce sens et antisens).L’étape de RT s’est déroulée à 37°C pendant 60 min, suivie d’une dénaturation à 95°C pendant 5 minutes. L’ADNc a été conservé à -20°C.

Liste des amorces utilisées :

Gène	Amorce sens 5’->3’	Amorce anti-sens 5’->3’
Angiogénine	TTTCCATTGTCCTGCCCGTT	CCCAAGCTGCCTCTACTAGG
Cyclophiline A	CCACCGCCGAGGAAAACCG	TGGACAAGATGCCAGGACCCGT
Gli1	GTGCAAGTCAAGCCAGAACA	ATAGGGGCCTGACTGGAGAT
Gli2	TTTATGGGCATCCTCTCTGG	AAGGCTGGAAAGCACTGTGT
Gli3	CTTTGCAAGCCAGGAGAAAC	TGTTGGACTGTGTGCCATT

2.3. La quantification

L'appareil Applied Biosystem 7500 permet une manipulation rapide et facile. Le grand intérêt de cet appareil est d'analyser 96 puits en même temps en éliminant les différences entre séries. Les puits sont excités par une longueur d'onde spécifique. La lumière filtrée de la lampe halogène est capable d'exciter le SYBR Green®. La longueur d'onde choisie est 494 nm (longueur d'onde maximale d'excitation de l'agent intercalant). Lorsque cette molécule est liée à l'ADN, le SYBR Green® émet une forte fluorescence. La lumière sélectionnée est captée par un détecteur photoélectrique. Les signaux électriques sont envoyés au logiciel pour effectuer l'analyse.

3. Etude de l'expression protéique

3.1. Extractions à partir des cellules en culture

Après lavage des cellules adhérentes avec du PBS (phosphate buffer saline), l'extraction des protéines totales était réalisée dans un tampon de lyse (50mM Tris-HCL, 150mM NaCL, 0.02% azide de sodium, 100µg/ml PMSF, 1µg/ml aprotinine, 1% NP-40) de 300µl pour une boîte de culture de 25cm². Vingt minutes d'incubation à 4°C étaient nécessaires suite à un premier grattage des cellules à l'aide d'un grattoir. Les cellules étaient ensuite grattées une deuxième fois et centrifugées à 14000 G pendant 5 minutes. Le surnageant contenant les protéines était récupéré et conservé à -80°C jusqu'à l'analyse.

3.2. Extractions à partir des tissus

Dans le cas des tissus, une première étape était de broyer les tissus à l'aide d'un broyeur à billes. Le tampon de lyse était rajouté pour une concentration finale de 2mg/ml. Après centrifugation à 14000 G pendant 15 minutes à 4°C, on retrouve différentes phases dans les

tubes : un culot de débris cellulaires, une phase protéique et une phase lipidique en surface. On pipete la phase protéique qui sera transformé dans un autre tube.

3.3. Dosage des protéines

Le dosage des protéines contenues dans les surnageant de la phase protéique et lipidiques a été réalisé par un kit BCA, après préparation de la gamme standards BSA (Bovine Sérum Albumine) La lecture des échantillons se fait par rapport à une gamme étalon établie à partir d'une solution d'albumine de sérum bovin.

3.4. Western blot

Après ajout du tampon de charge de Laemmli (contenant 5% de 2beta mercaptoethanol) à l'échantillon de surnageant contenant les protéines totales (tampon : échantillon v/v), celles-ci sont dénaturées à 100°C et les extraits (15-30µg) sont déposés sur un gel de polyacrylamide 10% (acrylamide/bisacrylamide 30%, Tris 1M , SDS 10%, APS 10%, TEMED). Les protéines sont séparées par électrophorèse (150V pendant 1h30). Le transfert est réalisé sur une membrane de Polyvinylidene Difluoride en utilisant le système de transfert « iBlot dry blotting system » selon les recommandations du fournisseur (Invitrogen). Après rinçage pendant 10 minutes sous agitation légère dans un tampon Tris (TBS), pH 7.5, contenant 0.1% de Tween-20 (TBST), la membrane est saturée 1h sous agitation à température ambiante dans du TBST contenant 5% de lait écrémé. La membrane est ensuite incubée la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire à la dilution optimale dans le TBST/lait. La membrane est ensuite lavée trois fois sous agitation dans le TBST, puis incubée pendant 1h avec l'anticorps secondaire correspondant couplé à la peroxydase et dilué dans le TBST, à température ambiante. Après trois lavages avec le TBST, le complexe d'anticorps est révélé par chimioluminescence avec un kit de détection (ECL, Millipore). L'imageur « fusion FX7 » (Vilbert-Lourmat, Marne la

vallée, France) permet l'acquisition du signal de chimioluminescence pour une exposition optimale des membranes, et une capture par camera CDD refroidie. L'exploitation numérique de l'image obtenue est réalisée à l'aide du logiciel « Bio1D » (Vilbert-Lourmat).

4. Etude *in vitro* de la croissance cellulaire

4.1. La densité cellulaire

La densité cellulaire a été évaluée par la méthode de coloration au cristal violet. Son principe est basé sur la fixation du cristal violet aux noyaux des cellules. En pratique, les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 24 puits 20 000 cellules par puits. Après 24, 48 ou 72 h de traitement, les cellules étaient fixées avec du paraformaldéhyde à 10% (Sigma Aldrich) pour une durée de 20 mn, puis colorées au cristal violet pendant 20 mn. Finalement, les cellules ont été traitées à l'acide acétique à 33% pendant 10 mn, et la coloration est mesurée par spectrophotométrie à 590 nm. L'intensité obtenue est proportionnelle à la densité cellulaire.

4.2. La prolifération cellulaire

La prolifération est évaluée par incorporation de BrdU (Bromodéoxyuridine). Le BrdU s'incorpore à la place de la thymidine dans l'ADN au cours de la phase S du cycle cellulaire. Le test est effectué selon le protocole du Kit Calbiochem[®] (Merck Millipore). Lors de cette expérience, les cellules des 4 lignées ont été réparties dans des plaques de 96 puits (3200 cellules par puits). Après 48h de traitement, les cellules ont été supplémentées en BrdU pendant 4 heures puis fixées et perméabilisées à l'aide d'une solution de fixation et de dénaturation. Les cellules ont été alors mises en contact avec l'anticorps primaire anti-BrdU dilué au 1/100 pendant 1 h à température ambiante. Après trois lavages, les cellules étaient

incubées avec l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase catalysant la conversion du tétraméthylbenzidine incolore en un composé bleu. L'intensité de la coloration, proportionnelle à la quantité de BrdU incorporée aux noyaux, était quantifiée par spectrophotométrie aux longueurs d'onde de 450 et 540 nm.

4.3. L'apoptose

La cytométrie en flux est une méthode permettant de compter, trier et caractériser des cellules (marquées ou non) en les faisant défiler individuellement devant un faisceau laser. Ces expériences ont été réalisées à l'Institut de Virologie de Strasbourg sur un cytomètre LSR II (Becton Dickinson, New York, Etats-Unis) avec l'aide du Dr J. Barths. Un double marquage annexine V/iodure de propidium permet de distinguer les cellules apoptotiques des cellules nécrotiques et de les quantifier. L'annexine V marque spécifiquement la phosphatidyl-sérine, alors que l'iodure de propidium s'intercale entre les bases de l'ADN des cellules nécrotiques. Cette analyse en cytométrie en flux permet de visualiser l'apoptose et de différencier les cellules vivantes, des cellules en phase précoce d'apoptose et celles en phase tardive d'apoptose. Les cellules vivantes (Annexine-V et IP négatives) les cellules en phase précoce d'apoptose (Annexine-V positives, IP négatives) ou en phase tardive d'apoptose (Annexine-V positives, IP positives).

Les cellules 786-O et A498 ont été traitées par différents agents pharmacologiques pendant 24 ou 48 h. A la fin du traitement, les cellules contenues dans le surnageant de culture ont été récupérées. Les cellules adhérentes ont été recueillies par trypsinisation, puis soumises à plusieurs cycles de lavages au PBS et de centrifugations (2000 rpm, 5 mn, 4°C). Le culot constitué des corps cellulaires du surnageant et des cellules adhérentes non perméabilisées a été remis en suspension et incubé 10 mn à l'abri de la lumière dans un tampon d'incubation

(140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM HEPES) contenant 0,5% d'annexine V couplée au FITC (Invitrogen) et 5 µg/ml d'iodure de propidium (Sigma-Aldrich). Les cellules ont été ensuite fixées avec du formol 1% et peuvent être conservées une semaine à 4°C à l'abri de la lumière. Le jour de l'analyse FACS, les tubes ont été homogénéisés et filtrés pour ne pas boucher le capillaire du cytomètre qui prélève les cellules en suspension. L'analyse était ensuite réalisée à l'aide du logiciel FCSEXPRESS (De Novo Software, Los Angeles, CA, Etats Unis).

5. Les biopuces à protéines

5.1. Principe

L'array protéique est une technique d'analyse rapide et semi-quantitative de l'expression des protéines reposant sur le principe de l'Elisa sur membrane et couplée à une technique de détection par chimiluminescence. Des anticorps spécifiques reconnaissant 55 protéines impliquées dans l'angiogenèse (Cf. tableau), 43 protéines dans la phosphokinase et 35 protéines de l'apoptose ont été fixées sur une membrane de nitrocellulose sous forme de spot, en duplicat par le fabricant. L'échantillon est mélangé avec les anticorps de détection et déposé sur la membrane. Après quelques lavages pour éliminer les protéines non liées, la streptavidine-HRP (horseradish peroxidase) et les réactifs de détection par chimiluminescence sont ajoutés. La lumière est émise par chaque spot et est proportionnelle au taux de protéines liées. Trois contrôles positifs et un contrôle négatif sont également répartis sur la membrane afin de tenir compte des liaisons non spécifiques.

5.2. Protocole

Le dosage du contenu total en protéines dans les milieux conditionnés a été réalisé selon le principe de la méthode de Lowry (Kit BCA) conformément aux recommandations fournies par le fabricant. (Tableau 7)

Le kit « Proteome Profiler Array » a été utilisé conformément aux recommandations faites par le fabricant. Les réactifs du kit ont été placés 30 minutes à température ambiante avant d'être utilisés.

Les sites de liaison non spécifiques de la membrane de nitrocellulose ont été bloqués pendant 1 heure sous agitation à température ambiante avec le tampon fourni par le kit. 900µg/ml de protéines ont été mélangés dans un microtube avec 500µl de tampon de dilution et 15µl d'anticorps de détection biotinylés et laissé incubé pendant 1 heure à température ambiante. Le mélange échantillon/anticorps de détection est déposé sur la membrane et laissé à incuber pendant une nuit à + 4°C après élimination de la solution de blocage. Trois lavages sont réalisés avec le tampon de lavage fourni dans le kit. 1,5 mL de streptavidine-HRP sont déposés dans le fond de la boîte. La membrane est égouttée puis retournée sur la solution de streptavidine et incubée pendant 30 minutes à température ambiante. Trois lavages sont réalisés avec le tampon de lavage fourni dans le kit. La détection de la chimiluminescence est réalisée selon les recommandations fournies par le fabricant) : les membranes sont égouttées et déposées sur le plateau de l'analyseur d'image. 450 µL de solution de révélation sont déposés sur chaque membrane. Après avoir effectué la mise au point, les spots sont révélés par une illumination de 10 minutes. Le niveau de gris est déterminé pour chaque spot et le niveau du bruit de fond est soustrait à cette valeur. Le seuil de détection limite a été fixé à trois fois le niveau du bruit de fond. Les protéines détectées sont identifiées à l'aide d'un film transparent représentant les coordonnées de chaque spot. (Tableau 7)

Position	Cible	Position	Cible	Position	Cible
A1, A2	Positive Control (+)	D21, D22	IGF-1	D31, D32	PDGF-AA
A3, A5	Actifin A	D29, D31	IGF-1/IGFBP-1	D33, D35	PDGF-AA/PDGF-BB
A7, A8	ADVAMEP 1	C1, C2	GDNF	D37, D38	Perlecan
AS, A20	Asiaticum (ASG)	C3, C4	SHG-CSP	D39, D40	Placenta Factor 4 (PF4)
A11, A12	Asiaticoside 1 (Asig 1)	C5, C6	HM-LGM	D43, D44	SPARC
A13, A14	Asiaticoside 2 (Asig 2)	C7, C8	HGF	D45, D46	Proctactin
A17, A18	Angiostatin (Angiost)	C9, C10	ICRFP-1	E7, E8	Serpin B5 (Maspin)
A19, A18	Amphogelin (AR)	C11, C12	ICRFP-2	E9, E4	Serpin E1 (PAI-1)
A19, A16	Asiaticum	C13, C14	ICRFP-5	E5, E6	Serpin F1 (SPSP)
A23, A24	Positive Control (+)	C15, C16	IL-1β (IL-1β)		USP-1
B1, B2	Coagulation Factor III (TF)	C17, C18	IL-6 (CXCL6)		USP-1
B3, B4	CXCL10	C19, C20	LAP (TGF-β)	F11, F12	Urokinase-type 1 (uPA)
B5, B6	OPBN (CD24)	C21, C22	Leptin	L11, L11	Urokinase-type 2 (uPA 2)
B7, B8	IGF	C23, C24	MCP-1 (CC1-2)	L33, L33	uPA
B9, B10	FGF/VEGF/FGF-1	D1, D2	MIP-1 (CC1-1)	F13, F13	Vasculon
B11, B12	Endoglin (CD105)	D3, D4	MMP-8	F19, F19	VEGF
B13, B14	Endostatin (Collagen XVII)	D5, D6	MMP-9	F21, F22	VEGF-2
B17, B18	Endostatin-1 (ET-1)	D7, D8	NRG1-β1 (HRC1-β1)	F3, F3	Western Control (+)
B17, B18	FGF-acidic (FGF-3)	D9, D10	Perlecan 2 (PLX2)	F23, F24	Negative Control (-)
B19, B20	FGF basic (FGF-2)	D11, D12	PG-ECGF		

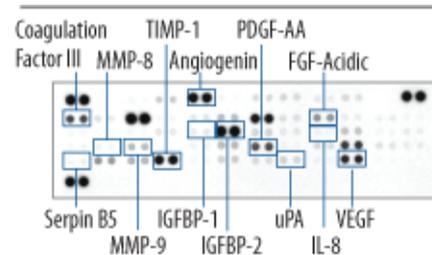


Tableau 7: Kit proteome array-angiogénèse

6. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm l'erreur standard (ESM) pour les variables quantitatives. Une analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée avec comparaison des échantillons par un test de Bonferroni/Dunn. Les valeurs de probabilité (p) inférieures à 0,05 % ont été considérées comme statistiquement significatives.

RESULTATS

1. Études *in vitro* de la chimiosensibilité des lignées cellulaires de CCR humain à différents agents thérapeutiques

La première étape de l'étude sur les mécanismes de résistance a consisté en l'évaluation *in vitro* de la sensibilité de lignées cellulaires de CCC à deux classes d'agents thérapeutiques : 3 anti-angiogéniques (évérolimus, sorafenib et sunitinib) et 3 cytotoxiques (5-FU, cisplatine et vinblastine).

1.1. Effet de différents agents thérapeutiques sur la densité cellulaire

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet des différents traitements sur la densité cellulaire par la méthode du Cristal violet. Quatre lignées cellulaires de CCC ont été utilisées : 2 lignées déficientes en VHL (786-O et A498) et 2 lignées exprimant le VHL (Caki-1 et Caki-2). Les différents agents thérapeutiques ont été testés à 6 concentrations différentes pendant 24, 48 et 72h.

1.1.1. Effets des anti-angiogéniques

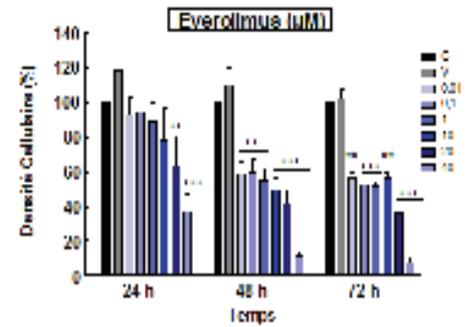
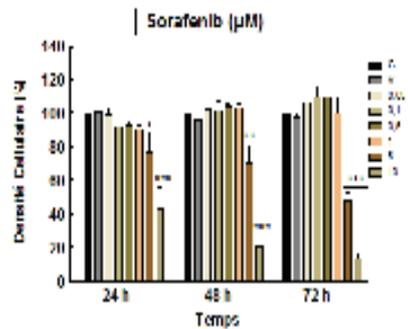
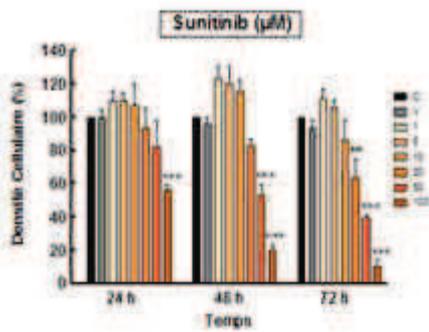
En réponse aux agents anti-angiogéniques, après 48 h de traitement et à la plus forte concentration, la densité cellulaire est diminuée de 80, 79 et 89% après traitement respectivement par le sunitinib (100 μ M), le sorafenib (10 μ M) et l'évérolimus (40 μ M) dans les cellules 786-O. Des résultats similaires ont été obtenus dans les lignées Caki-2, A498 et Caki-1. (Figure 10)

1.1.1. Effets des cytotoxiques

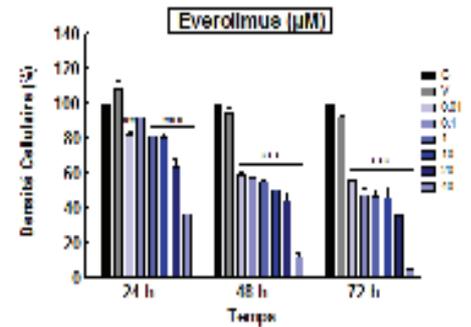
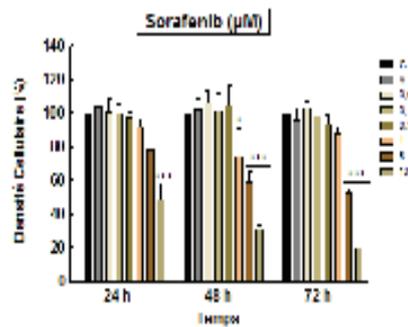
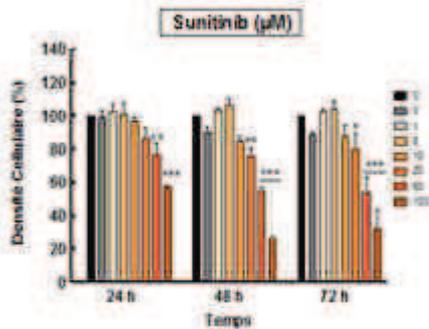
Concernant les agents cytotoxiques, après 48 h de traitement et à la plus forte concentration, nous mettons en évidence une diminution de la densité cellulaire de 67% pour le 5-FU (200 μ M), 92% pour le cisplatine (100 μ M) et 72% pour la vinblastine (10 μ g/ml) dans les cellules 786-O (Figure 4a). Des résultats similaires ont été obtenus avec les cellules caki-1, caki-2 et A498. (Figure 11).

En conclusion, tous les types cellulaires sont sensibles aux traitements testés, et ceci indépendamment de leur statut en VHL. Nous montrons que la baisse de la densité cellulaire induite par les traitements est concentration-dépendante et s'amplifie avec la durée des traitements.

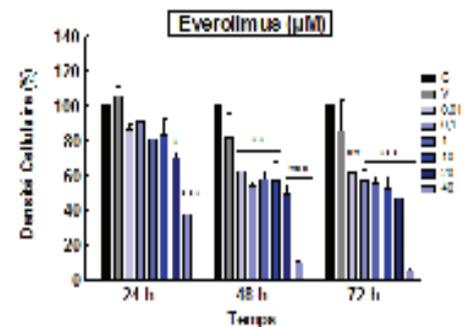
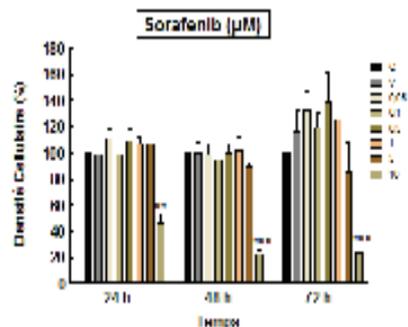
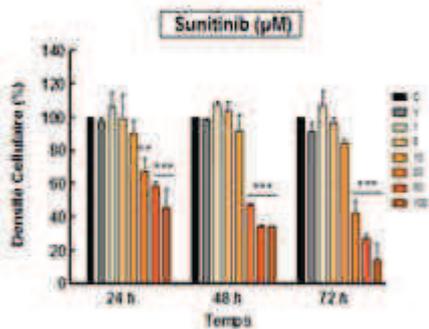
786-O



A498



Caki-1



Caki-2

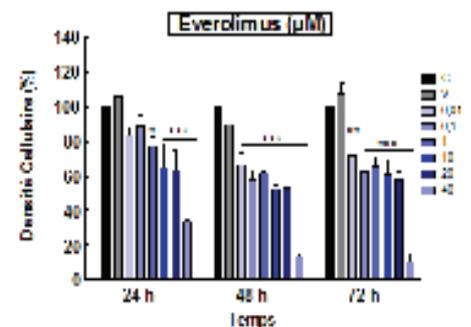
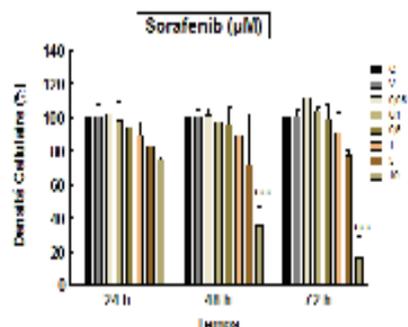
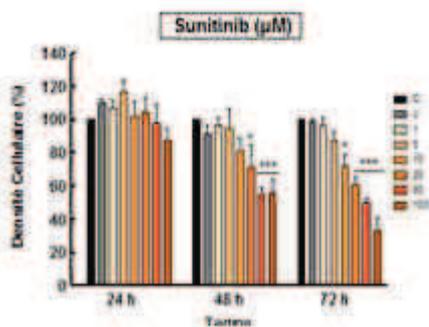
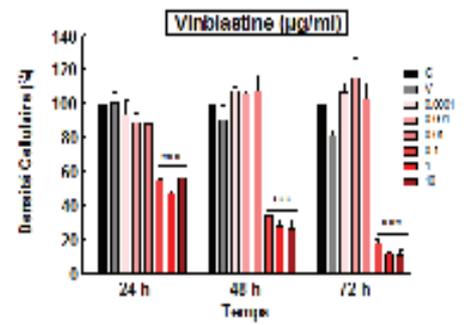
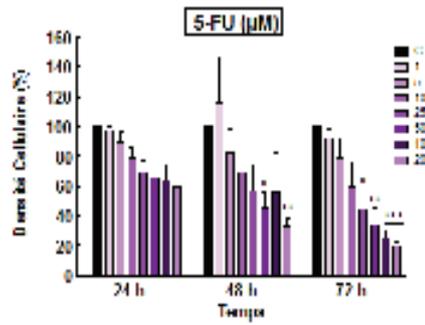
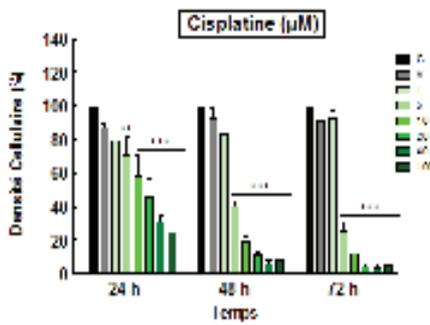
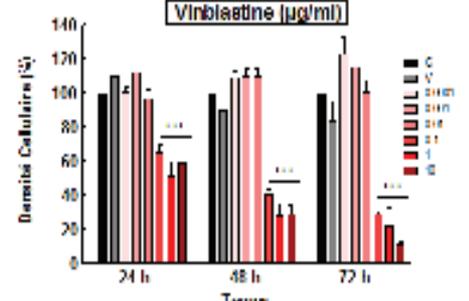
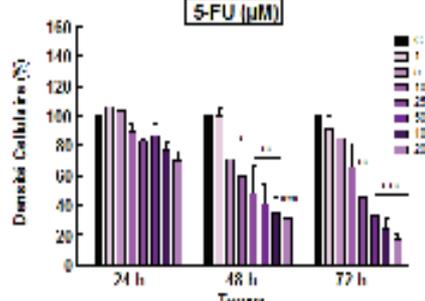
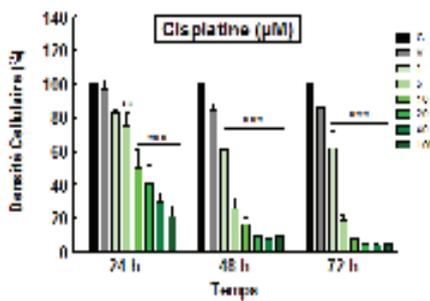


Figure 10 : Effet des thérapies ciblées sur la croissance cellulaire de lignées cellulaires de CCC humain. Les lignées 786-O et A498 ($VHL^{-/-}$), Caki-1 et Caki-2 ($VHL^{+/+}$) ont été traitées par sunitinib, sorafénib ou évérolimus à différentes concentrations, pendant 24, 48 ou 72 h, comme indiqué sur la figure. La densité cellulaire a été évaluée par la méthode du cristal violet. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle (C). Ils sont représentés par leur moyenne \pm E.S.M ($n=3$). C: Contrôle, V: Véhicule.* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ par rapport au contrôle.

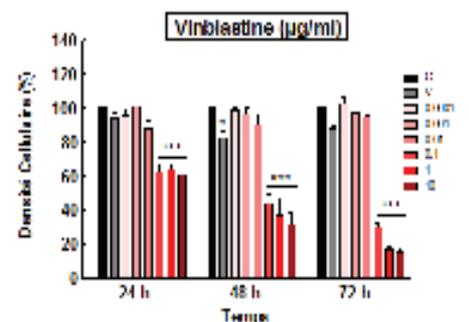
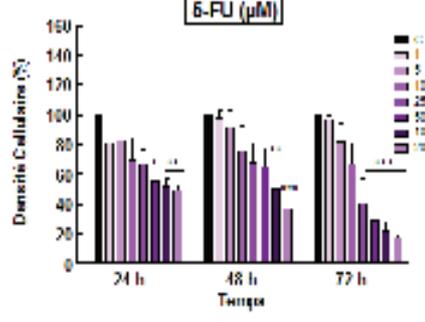
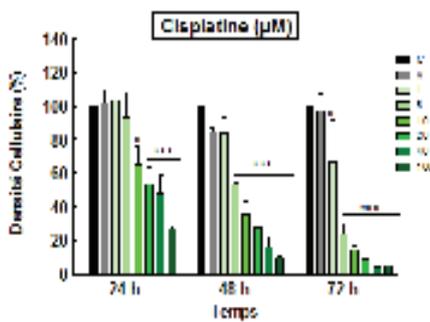
786-O



A498



Caki-1



Caki-2

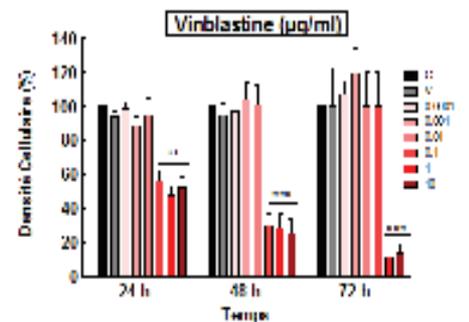
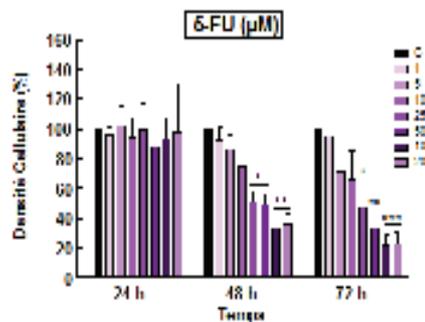
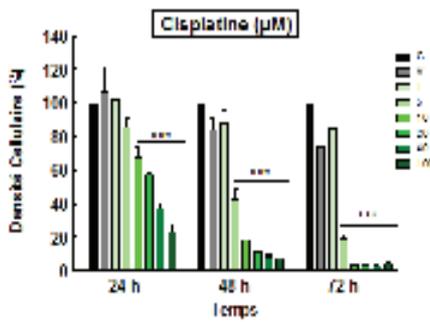


Figure 11 : Effet des cytotoxiques sur la croissance cellulaire de lignées cellulaires de CCC humain. Les lignées 786-O et A498 ($VHL^{-/-}$), Caki-1 et Caki-2 ($VHL^{+/+}$) ont été traitées par Cisplatine, 5-FU et Vinblastine à différentes concentrations, pendant 24, 48 ou 72 h, comme indiqué sur la figure. La densité cellulaire a été évaluée par la méthode du cristal violet. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle (C). Ils sont représentés par leur moyenne \pm E.S.M ($n=3$). C: Contrôle, V: Véhicule. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ par rapport au contrôle.

1.2. Effet des différents agents thérapeutiques sur la prolifération cellulaire

Afin d'approfondir les résultats obtenus précédemment, nous avons étudié l'impact des traitements sur la prolifération cellulaire des lignées 786-O (VHL^{-/-}) et Caki-2 (VHL^{+/+}) par la mesure de l'incorporation de BrdU. Les cellules ont été traitées durant 48h avec les anti-angiogéniques et les cytotoxiques, à 2 concentrations différentes.

1.2.1. Effet des anti-angiogéniques

Dans la lignée 786-O, nous observons une inhibition de la prolifération de 14% avec le sunitinib [10µM], de 7% avec le sorafenib [1µM] et de 35% avec l'évérolimus [1µM]. Cette inhibition atteint 74% avec le sunitinib, 65% avec le sorafenib et 76% avec l'évérolimus aux concentrations respectivement 100 µM, 10 µM et 40µM.

Dans les cellules Caki-2, nous observons une inhibition de la prolifération de 25% avec le sunitinib [10µM], de 20% avec le sorafenib [1µM] et de 55% avec l'évérolimus [1µM] après 48h de traitement. Cette inhibition atteint 90% avec le sunitinib et 68% avec le sorafenib et 94% avec l'évérolimus aux concentrations respectivement de 100 µM et 10 µM et 40µM (Figure 12 A)

1.2.2. Effet des agents cytotoxiques

Dans les cellules 786-O, toujours après 48h de traitement, nous observons une inhibition de la prolifération de 57% avec le 5-FU, 21 % avec le cisplatine et de 16% avec la vinblastine, respectivement à 10 µM, 5 µM et 0,05 µg/ml. Cette inhibition atteint 57%, 79% et 81% aux concentrations inhibant la densité cellulaire de 80%, respectivement 100 µM, 40 µM et 1µM

Dans les Caki-2, après 48h de traitement, nous observons une inhibition de la prolifération de 17% avec le 5-FU, 38 % avec le cisplatine et 55% avec la vinblastine, respectivement 10 µM,

5 μ M et 0,05 μ g/ml. Cette inhibition atteint 72%, 62% et 81% aux concentrations inhibant la densité cellulaire de 80%, respectivement à 100 μ M, 40 μ M et 1 μ M. (Figure 12B).

L'étude de la prolifération donc permis de conclure qu'il existe une différence significative, au niveau de l'inhibition de la prolifération cellulaire, entre le groupe contrôle et le groupe traité et cela indépendamment de la lignée.

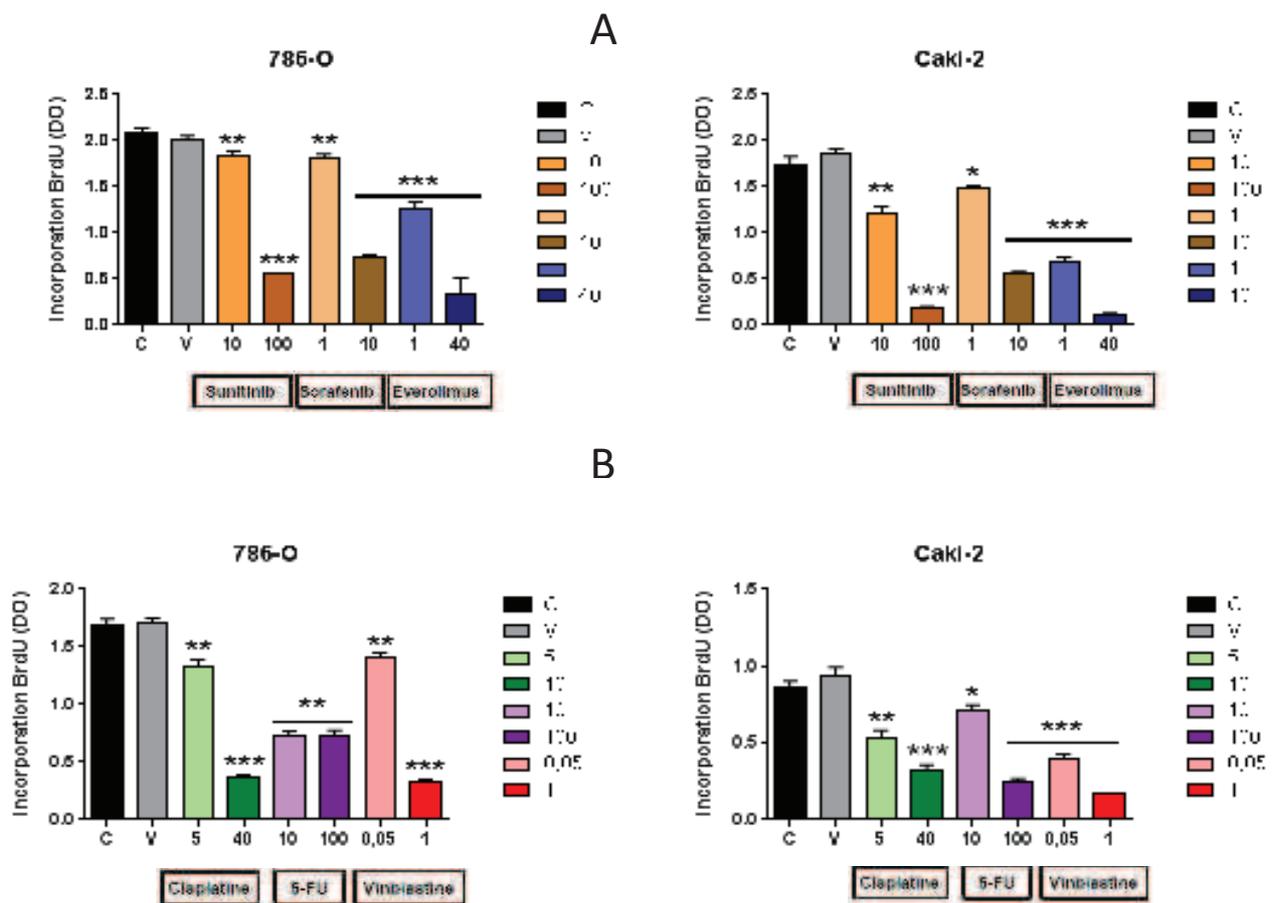


Figure 12 : Etude de la prolifération des cellules humaines de CCC après traitement par différents agents thérapeutiques. Les lignés 786-O (VHL^{-/-}) (A) et Caki-2 (VHL^{+/+}) (B) ont été traitées par les 3 thérapies ciblées (sunitinib, sorafénib et évérolimus) ou par les 3 agents cytotoxiques (cisplatine, 5-FU et vinblastine) à 2 concentrations comme indiqué sur la figure. L'incorporation de BrdU a été mesurée 48h post-traitement. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm E.S.M, n=3. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ par rapport au contrôle.

1.3. Effet des différents agents thérapeutiques sur l'apoptose

Nous avons cherché à savoir si les différents traitements induisaient l'apoptose des lignées de CCR, en utilisant la technique de cytométrie en flux. Les cellules 786-O et A498 (sont traitées par différents agents pharmacologiques aux mêmes temps et concentrations utilisés pour l'étude de la prolifération.

Nos résultats montrent que les différents traitements induisent l'apoptose de la lignée cellulaire 786-O et A498. (Des résultats complémentaires sont en Annexe 1)

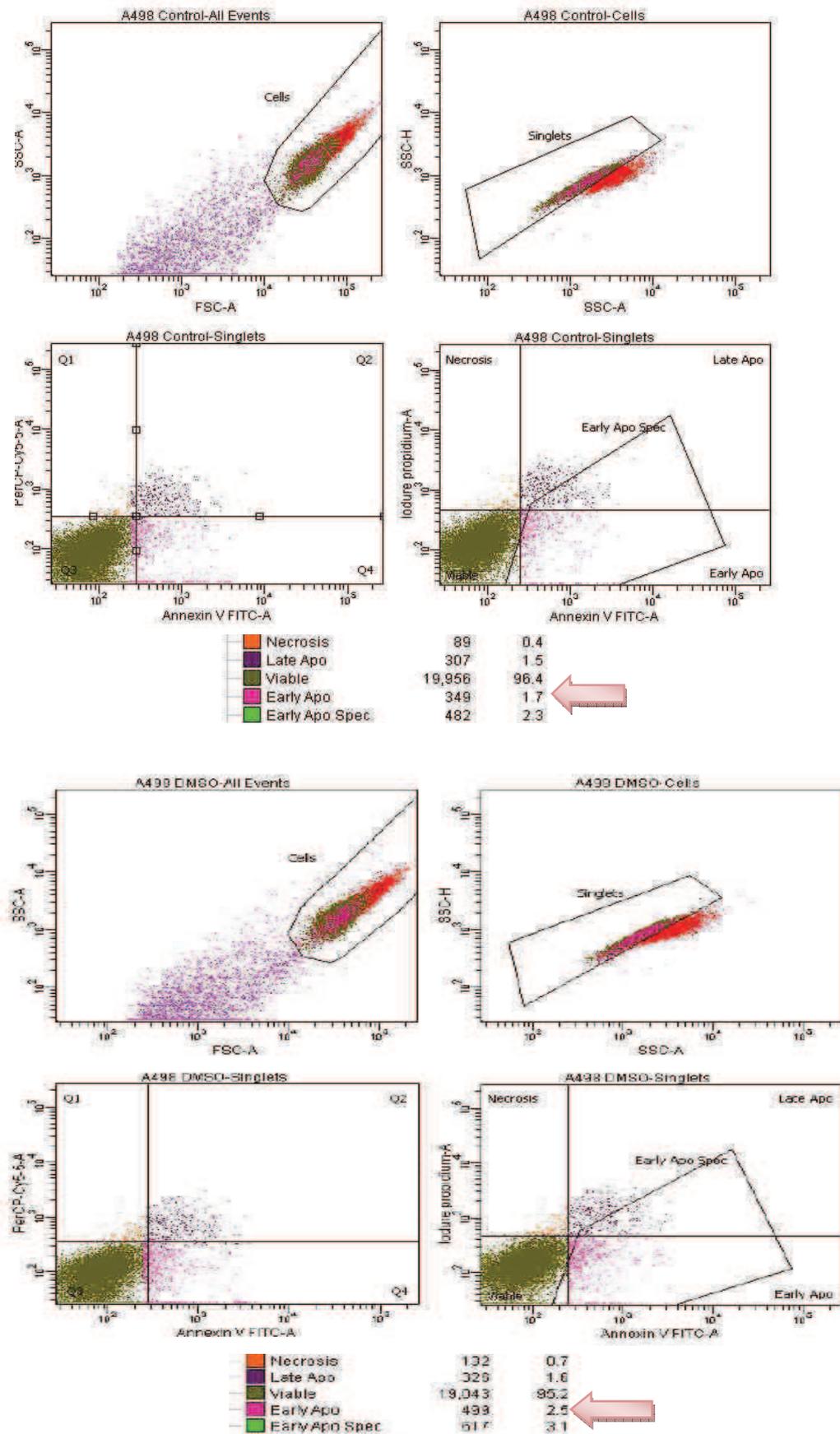
1.3.1. Effet des anti-angiogéniques

L'apoptose basale mesurée est de 1,7 et 2,5% respectivement pour le contrôle et le véhicule. L'effet apoptotique est noté dès la concentration faible d'anti-angiogénique. Pour les concentrations fortes, l'apoptose n'était plus mesurable du fait qu'il ne restait plus de cellules adhérentes. A la concentration 10 μ M, le pourcentage d'apoptose induit par le sunitinib était de 26,2%, à 1 μ M de sorafenib le taux était de 13%, et à 1 μ M d'évérolimus le taux était de 20% pour la lignée A498 (Figure 13).

1.3.2. Effet des cytotoxiques

Pour les cytotoxiques, à la dose inhibant la densité cellulaire de 50%, nous n'observons pas d'apoptose puisque le % de cellules apoptotiques reste au niveau basal : 2,8% pour le 5-FU (10 μ M), 2,7% pour le cisplatine (5 μ M) et 3,9% pour la vinblastine (0,05 μ g/ml). Toutefois, nos résultats montrent que pour la dose correspondant à 80% d'inhibition de la densité cellulaire, les pourcentages de cellules apoptotiques augmentent à 15,3%, 10%, et 39%

respectivement pour le 5-FU (100 μ M), le cisplatine (40 μ M) et la Vinblastine (1 μ M) pour la lignée O-786 (Annexe 2)



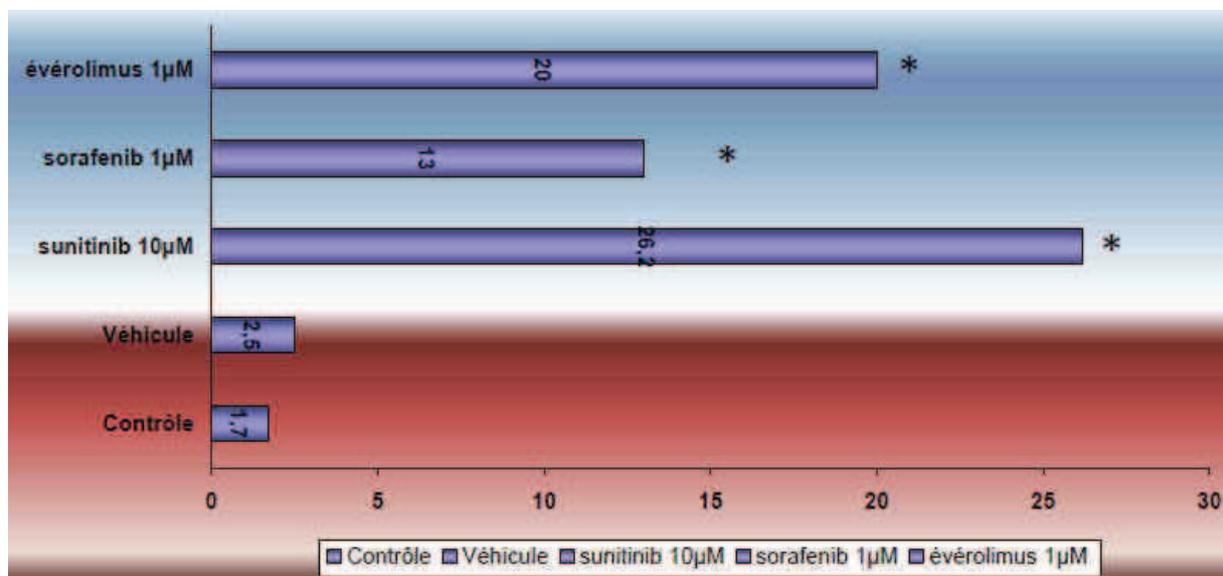
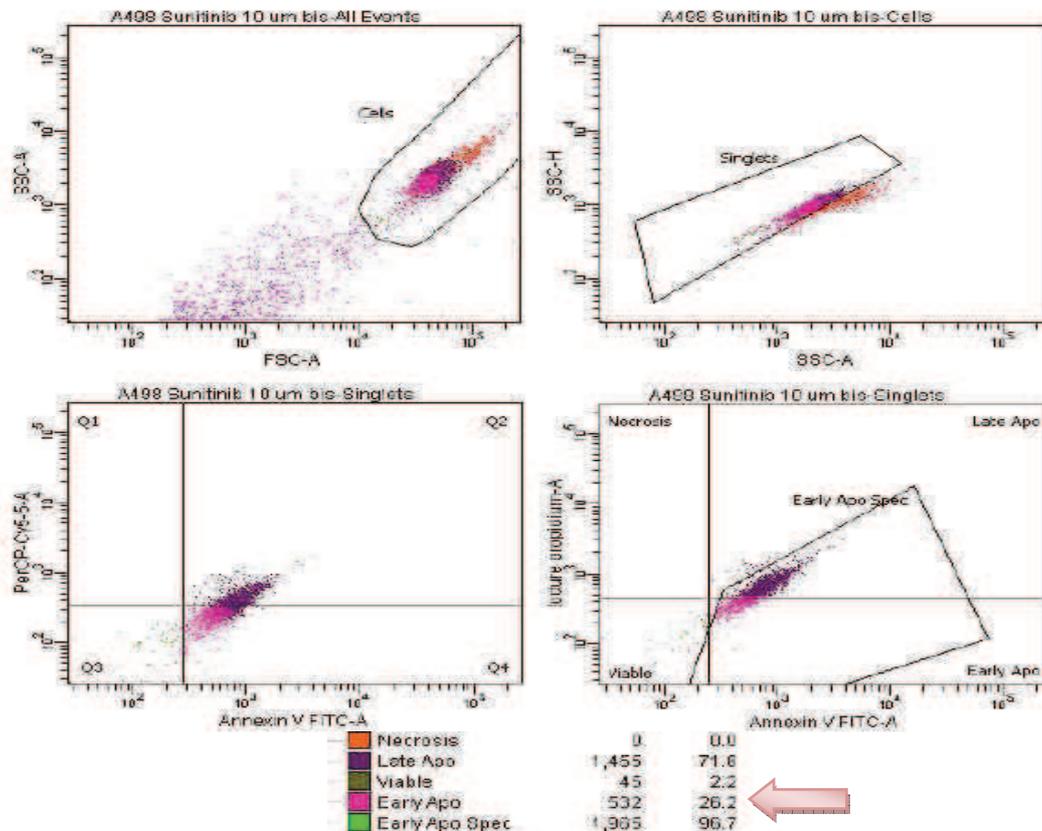


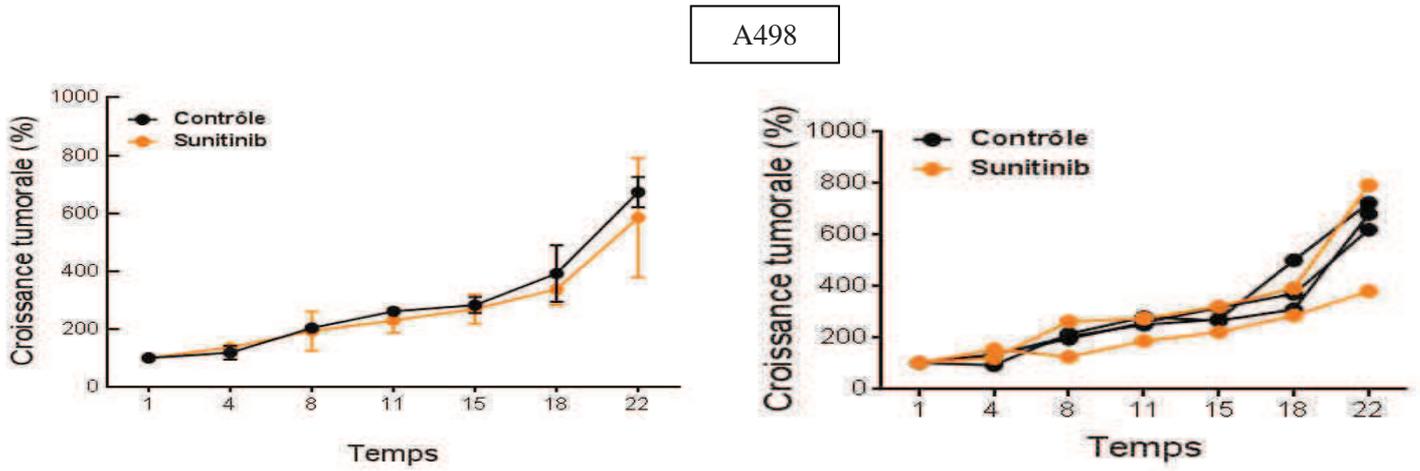
Figure 13 : Effet de différents agents thérapeutiques sur la mort cellulaire de lignées cellulaires de CCC humain. Analyse par FACS à 24h post-traitement, des cellules A498 traitées respectivement pour le sunitinib. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm E.S.M, n=3. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ par rapport au contrôle. Exemples d'analyse par FAC.

2. Études *in vivo* de la chimiosensibilité des lignées cellulaires de CCR à différents agents thérapeutiques

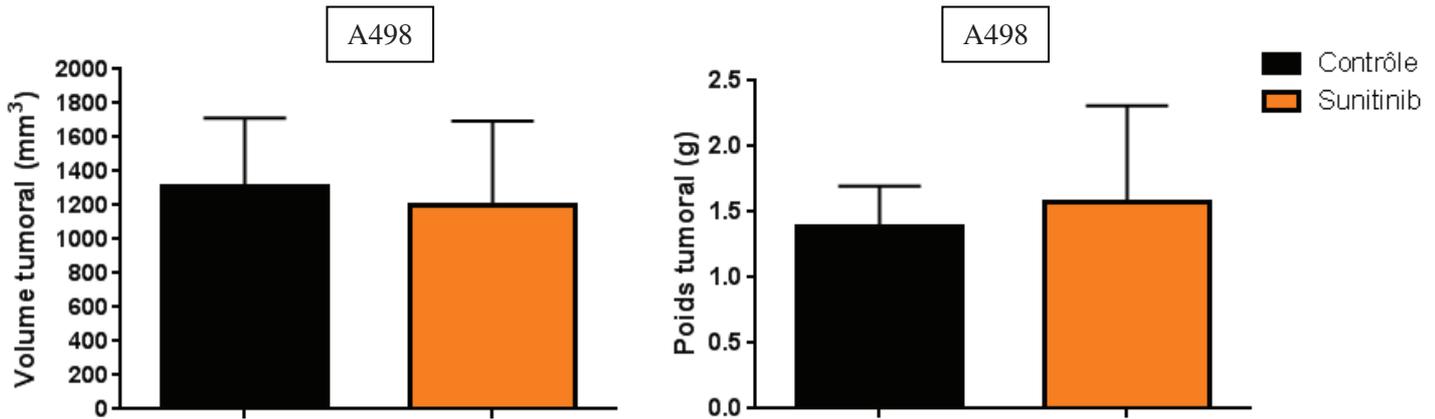
2.1. Effet des agents thérapeutiques sur la croissance tumorale de CCR humain *in vivo* chez la souris nude

Limiter l'étude des mécanismes de résistance aux travaux *in vitro* s'avère donc artificiel. Ces lignées sensibles *in vitro* peuvent être résistantes dans un microenvironnement *in vivo*. Nous avons donc conduit une étude pilote *in vivo* sur des modèles de xénogreffe chez la souris nude. En l'occurrence, la lignée A498 a été implantée chez la souris nude. Un développement tumoral a été obtenu au bout de trois semaines après injection des cellules tumorales. Les souris ont alors été séparées en différents groupes de volume tumoral moyen équivalent de 300mm³ : le groupe contrôle (n=3) a reçu le solvant uniquement, alors que les autres groupes (n=2) ont été traités avec deux classes d'agents anticancéreux : 2 anti-angiogéniques (sunitinib et évérolimus) et trois cytotoxiques (cisplatine, 5-FU et vinblastine). A l'issue du traitement, les souris ont été sacrifiées et les tumeurs collectées, pesées et mesurées. Dans le cas du sunitinib, nos résultats ne retrouvent pas d'inhibition de la croissance tumorale (Figure 14 A, à gauche : croissance tumorale en fonction du temps par groupe, à droite : croissance tumorale en fonction du temps par souris). De même, nous n'avons pas observé de différence concernant le poids et le volume des tumeurs au moment du sacrifice (Figure 14 B). Ces résultats, obtenus sur un nombre restreint de souris, suggèrent que les tumeurs A498 sont résistantes au sunitinib *in vivo*. De même, nos résultats suggèrent que les autres thérapeutiques testées n'ont pas d'activité anti-tumorale à l'exception de l'évérolimus (Annexe 3).

A



B



C

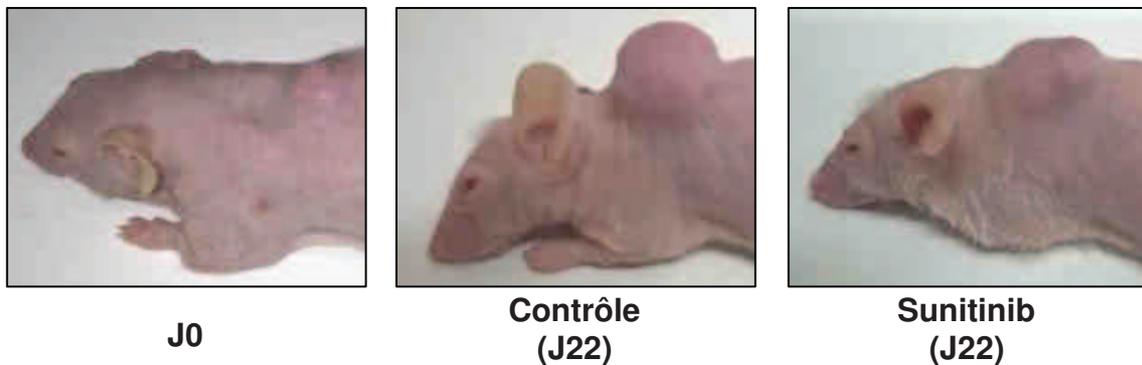


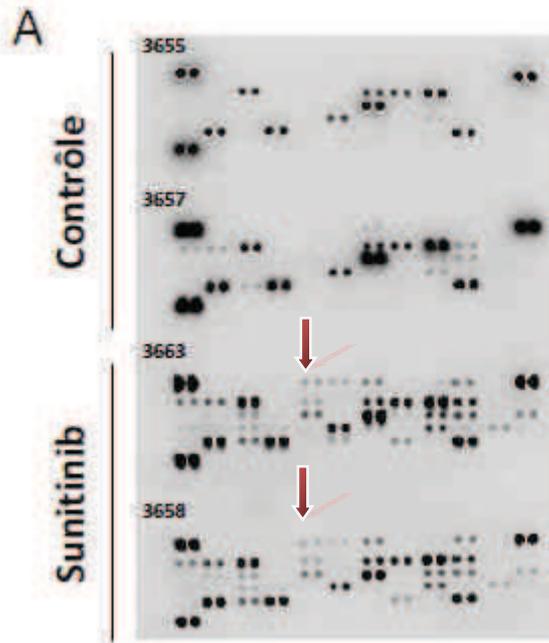
Figure 14: Effet du sunitinib sur la croissance tumorale de CCC humain *in vivo* chez la souris nude. (A) Etude pilote évaluant la croissance tumorale chez des souris nude xénotreffées par la lignée A498 et traitées pendant 3 semaines par sunitinib (40mg/kg, 3 fois/semaine) per os. À gauche : croissance tumorale en fonction du temps par groupe, à droite : croissance tumorale en fonction du temps par souris. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm E.S.M, n=3 pour le groupe contrôle et n=2 pour le groupe traité par sunitinib. (B) A la fin du traitement, les souris sont sacrifiées et les tumeurs prélevées, pesées et mesurées. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm E.S.M, n=3 pour le groupe CTRL et n=2 pour le groupe traité par sunitinib. (C) Photographies des tumeurs chez une souris représentative du premier jour de traitement (jour 0, J0), chez une souris représentative du groupe CTRL (jour 22, J22) et chez une souris représentative du groupe traité (jour 22, J22).

3. Recherche des marqueurs moléculaires induits par le sunitinib

3.1. Analyse par une approche à large spectre : kits de biopuces à protéines

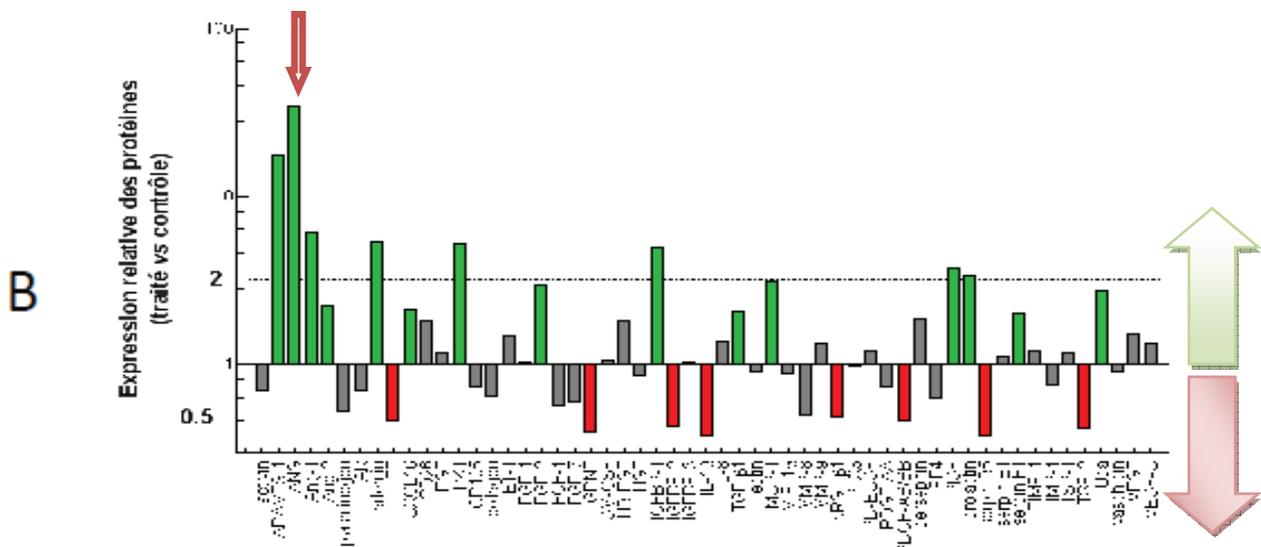
Le modèle de résistance au sunitinib identifié ci-dessus a constitué la base pour la recherche de marqueurs moléculaires induit par ce traitement. Des analyses de biopuces à protéines (proteome arrays) ont été réalisées en l'occurrence *via* trois kits: les kits Angiogénèse, Apoptose et Phosphokinases. La Figure 15A présente les membranes du kit Angiogénèse avant traitement des données et analyse quantitative par le logiciel Bio1D. On note déjà que des spots apparaissent plus intenses pour les tissus tumoraux des souris traitées par sunitinib *vs* contrôle. Nos résultats indiquent que plusieurs protéines de l'angiogénèse ont une expression augmentée (ratio >2) dans les tumeurs des souris traitées : ADAMTS-1, angiogénine, Ang-1, Ang-2, artémine, CXCL16, PK1, FGF-2, IGFBP-1, TGF- β 1, MCP-1, PlGF, prolactine, serpine F1, Upa. Nous notons à l'inverse que 5 protéines ont une expression diminuée (ratio <0,5), mais cette diminution reste faible (Figure 15B). Par ailleurs, nous n'avons pas observé d'effets du traitement sur l'expression des protéines de l'apoptose testées. Enfin, pour le kit Phosphokinase (Annexe 4), nous retrouvons 2 protéines dont la phosphorylation serait augmentée suite au traitement : p53 (S392), p53 (S46), et Akt (T308). D'autres protéines semblent au contraire avoir une phosphorylation diminuée: STAT5b (Y699) et hck (Y411). La Figure 15C récapitule les protéines dont l'expression est modulée suite au traitement par sunitinib.

En conclusion, ce crible de protéines de l'angiogénèse, de l'apoptose et du phosphokinome a permis d'identifier de potentiels marqueurs moléculaires pouvant appartenir aux voies de signalisation impliquées dans la résistance au sunitinib. Le faible nombre d'échantillon ne nous permet pas d'analyse statistique, et nécessitera une étude à plus large échelle.



Proteome array/angiogenèse

A498



C

	Cible	C	S	Ratio
PROTEOME ANGIOGENESE	IL-1b	0,0161	0,0061	0,38
	serpin	0,0193	0,0073	0,38
	GDNF	0,0147	0,0059	0,40
	TSP-2	0,0064	0,0027	0,42
	IGFBP-2	0,0108	0,0046	0,43
	PDGF-AB	0,0088	0,0040	0,46
	TF	0,5333	0,2503	0,47
	NRG1-b1	0,0159	0,0077	0,48
	serpin	0,0130	0,0266	2,05
	TGF-b1	0,0132	0,0271	2,06
	CXCL16	0,0136	0,0288	2,12
	Ang-2	0,0090	0,0202	2,23
	Upa	0,0047	0,0129	2,77
	FGF-2	0,0152	0,0449	2,95
	MCP-1	0,0046	0,0142	3,12
	prolactin	0,0013	0,0045	3,42
	PIGF	0,0031	0,0117	3,78
	IGFBP-1	0,0047	0,0235	5,04
	PK1	0,0021	0,0108	5,24
	artemin	0,0033	0,0179	5,37
Ang-1	0,0013	0,0082	6,13	
ADAMTS-1	0,0001	0,0018	17,54	
ANG	0,0003	0,0101	34,65	

	Cible	C	S	Ratio
Phosphokinome	hck (Y411)	0,0548	0,0217	0,40
	STAT5b (Y699)	0,0497	0,0230	0,46
	Akt (T308)	0,0049	0,0135	2,77
	p53 (S46)	0,0047	0,0141	3,01
	p53 (S392)	0,0009	0,0040	4,63

Figure 15 : Analyse des marqueurs moléculaires induits par le sunitinib par une approche à large spectre (biopuces à protéines / angiogénèse). (A) chimioluminescence obtenue après lecture des 2 membranes par l'imageur pour le kit Angiogénèse. (B) Ratios d'expression des protéines (échelle logarithmique) testées dans les tumeurs traitées par sunitinib vs contrôle. En vert sont représentées les protéines dont le ratio est supérieur à 2. En rouge, les protéines dont le ratio est inférieur à 0,5. (C) Tableau présentant les ratios d'augmentation ou d'inhibition des protéines d'intérêt identifiées par les biopuces à protéines. Cible : protéines du kit, C : contrôle, S : traitement par sunitinib.

3.2. Validation de l'augmentation d'expression de l'angiogénine

3.2.1. *In vivo* sur le modèle de xénogreffe A498.

La protéine qui a retenu le plus notre attention est l'angiogénine dans la mesure où elle est surexprimée de façon significative avec un ratio de 1/34. Dans la littérature, on retrouve que l'angiogénine a été déjà isolée à partir de cellules tumorales et présente un intérêt dans la réponse au traitement. Aussi, nous avons axé la suite du travail sur cette protéine. En particulier, nous avons réalisé une étude de l'angiogénine en Western blot à partir des extraits protéiques utilisés pour l'analyse des biopuces à protéines. L'angiogénine est constitutivement exprimée dans les tumeurs des souris contrôle et dans celles traitées par sunitinib mais avec une nette augmentation dans les tumeurs des 2 souris traitées *vs* contrôle (Figure 16A). Bien que non quantitatif, le ratio d'augmentation de l'angiogénine en Western blot semble toutefois être inférieur à celui observé avec les biopuces à protéines. Nous avons également étudié l'expression de l'angiogénine au niveau de l'ARNm. Nos résultats de RT-qPCR montrent une augmentation de son ARNm dans les tumeurs des souris traitées par sunitinib *vs* contrôle (Figure 16B), suggérant que l'augmentation de l'expression de l'angiogénine est due, au moins en partie, à une augmentation de sa transcription.

Nous avons également cherché à savoir si, *in vitro*, sur des lignées de CCR sensibles au sunitinib, le traitement par sunitinib modulait l'expression de l'angiogénine. Nous avons traité par sunitinib à 100 μ M les 4 lignées de CCR puis étudié l'expression de l'angiogénine en Western blot après 24, 48 et 72 h de traitement. Pour la lignée A498, nous observons dès 24 h une augmentation de l'expression de l'angiogénine dans les cellules traitées par sunitinib. Cette augmentation est encore plus nette à 48 heures, mais n'est plus retrouvée à 72 h. Pour la lignée 786-O, le traitement par sunitinib induit également une augmentation de l'expression de l'angiogénine. Celle-ci apparaît à 48h et est plus nette à 72 h. Pour la lignée Caki-1,

l'augmentation de l'angiogénine s'observe de façon semblable à 24 h, 48 h et 72 h de traitement. Enfin, pour la lignée Caki-2, il existe dès 24 h une augmentation de l'angiogénine dans les cellules traitées, qui se maintient à 48h et semble s'atténuer à 72h (Annexe 5). Nos résultats montrent donc une augmentation de l'expression de l'angiogénine *in vitro* sous l'effet du traitement par sunitinib dans l'ensemble des 4 lignées testées, indépendamment du statut VHL. Cette modulation d'expression a une cinétique dans le temps différente pour chaque lignée.

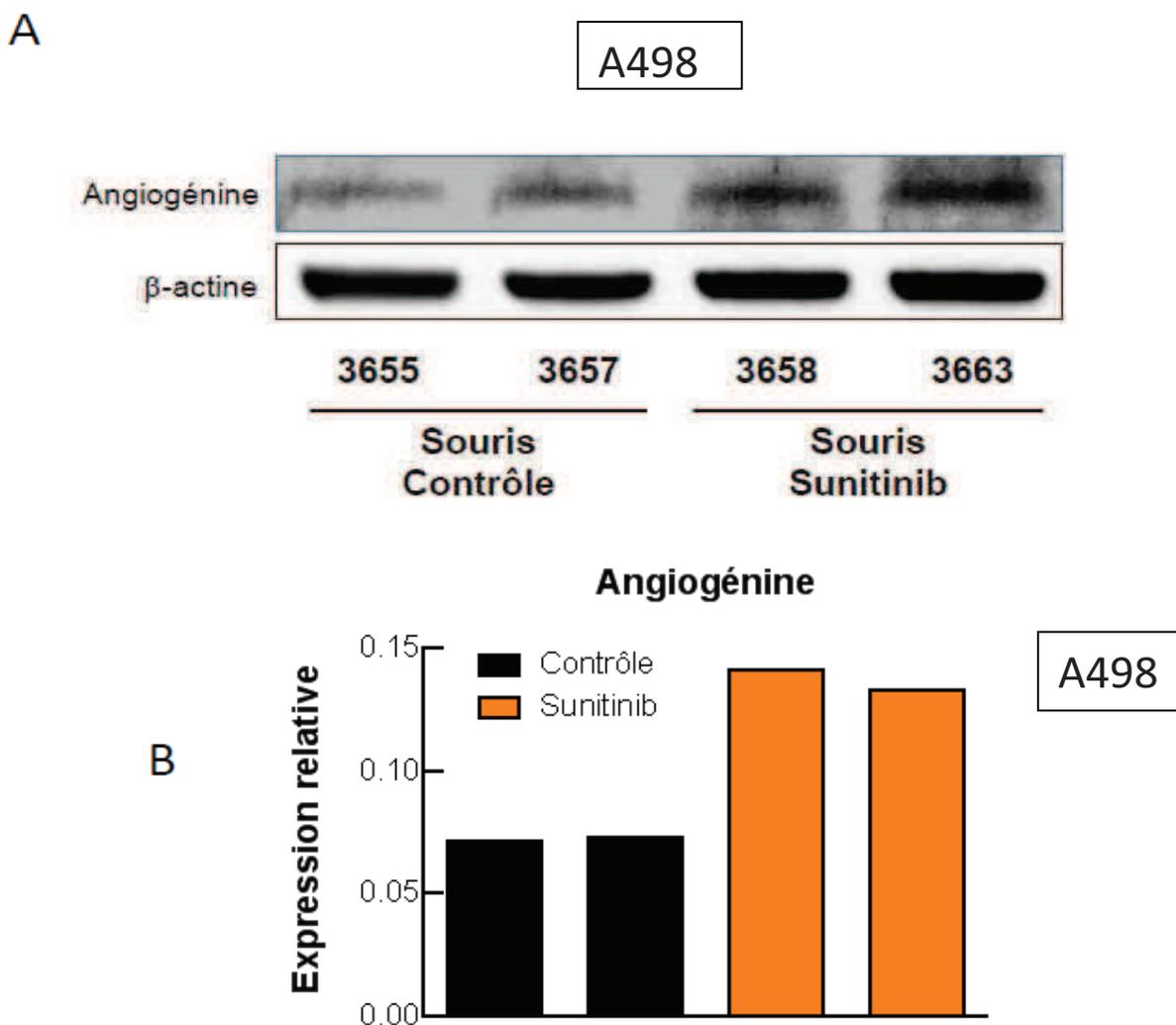
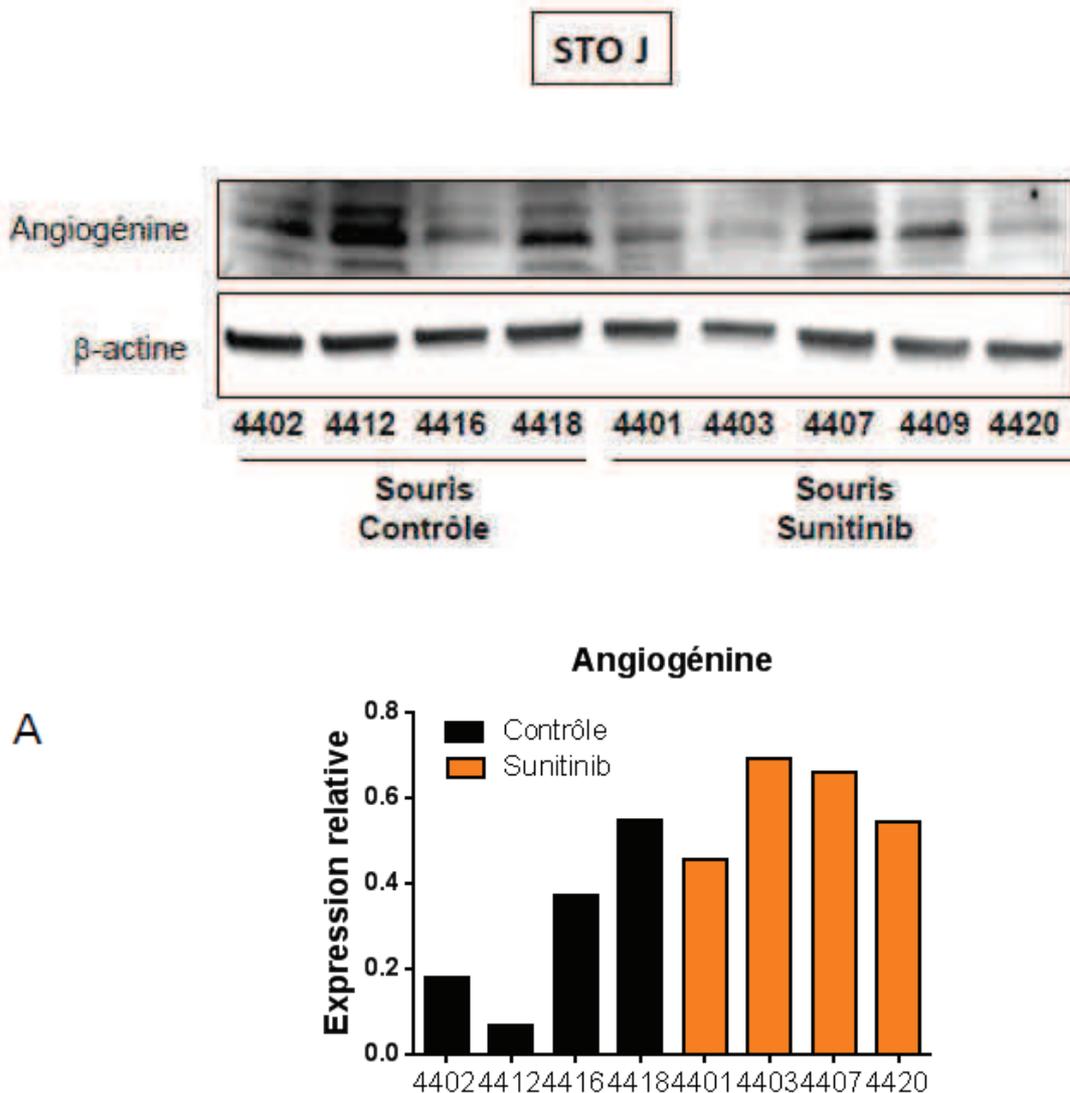
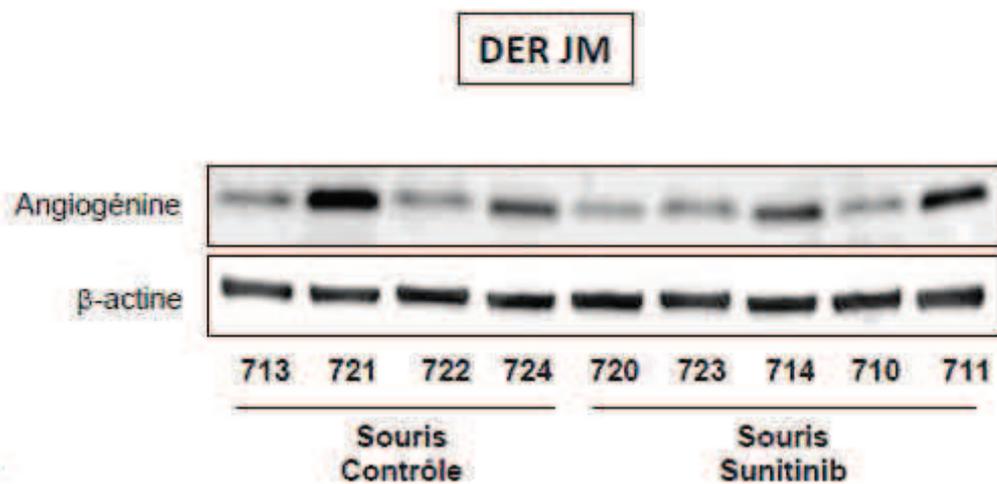


Figure 16 : Effet du sunitinib sur l'expression de l'angiogénine *in vivo* sur la lignée A498. Analyse de l'expression de l'angiogénine dans les lysats de tumeurs A498 xéno greffées chez les 4 souris de l'étude pilote traitées ou non par sunitinib évaluée par Western Blot (A) et RT-qPCR (B). Les résultats présentés sont représentatifs d'au moins 3 expériences.

3.2.2. *In vivo* sur les modèles précliniques

Le laboratoire, par convention avec la Société UROLEAD, a accès à des modèles pré-cliniques de CCR basé sur des xénogreffes de tumeurs rénales humaines chez la souris nude. Des études en interne ont été réalisées, évaluant en l'occurrence l'efficacité du sunitinib sur certains de ces modèles. Les modèles STO J et DER JM ont ainsi été identifiés comme respectivement résistant et sensible au sunitinib (courbe de croissance en Annexe 3). Nous les avons donc exploités pour étudier l'expression de l'angiogénine sur des modèles précliniques de CCR traités ou non par sunitinib. L'analyse par WB et RT-qPCR montre que l'angiogénine est exprimée de manière constitutive dans les tumeurs de CCR mais sans différence entre les souris contrôle et les souris traités sur ces 2 modèles. (Figure 17)





B

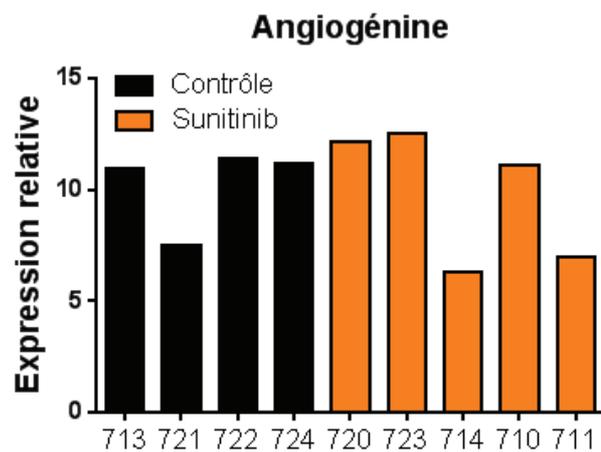
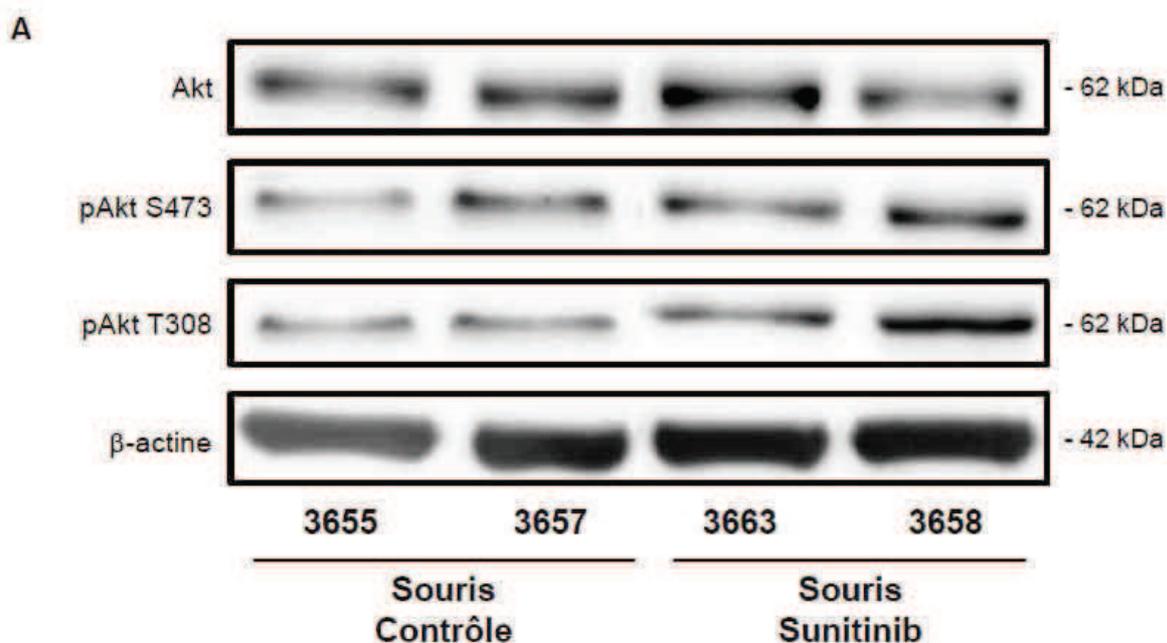


Figure 17 : Effet du sunitinib sur l'expression de l'angiogénine *in vivo* à partir de modèles précliniques. Analyse par Western Blot, RT-qPCR de l'expression de l'angiogénine dans les lysats de tumeurs xénotransplantées par des tumeurs résistantes au sunitinib STO J (A) et des tumeurs sensibles au sunitinib DER JM (B). Les résultats présentés sont représentatifs d'au moins 3 expériences.

3.3. Impact du sunitinib sur les voies signalétiques Akt et NFκB *in vivo*

L'équipe a précédemment montré que la voies PI3K-AKT et la voie NFκB étaient impliquées dans la tumorigenèse rénale. Conformément à notre hypothèse de travail, nous avons voulu savoir si le sunitinib modulait les voies Akt et NFκB. Nous avons étudié l'expression de NfκB et de sa forme phosphorylée ainsi que l'Akt avec ses 2 formes phosphorylées en S473 et en T308, par Western blot sur le modèle *in vivo* A498. Nous observons une diminution de la forme phosphorylée de NFκB et une augmentation des formes phosphorylées de l'Akt dans les tumeurs des souris traitées; l'expression de la forme totale reste inchangée. (Figure 18).

Les résultats de western blot sur les modèles précliniques (donnée non représentée), montraient une hétérogénéité de l'expression d'Akt et ses formes phosphorylées entre le groupe traité et le groupe contrôle.



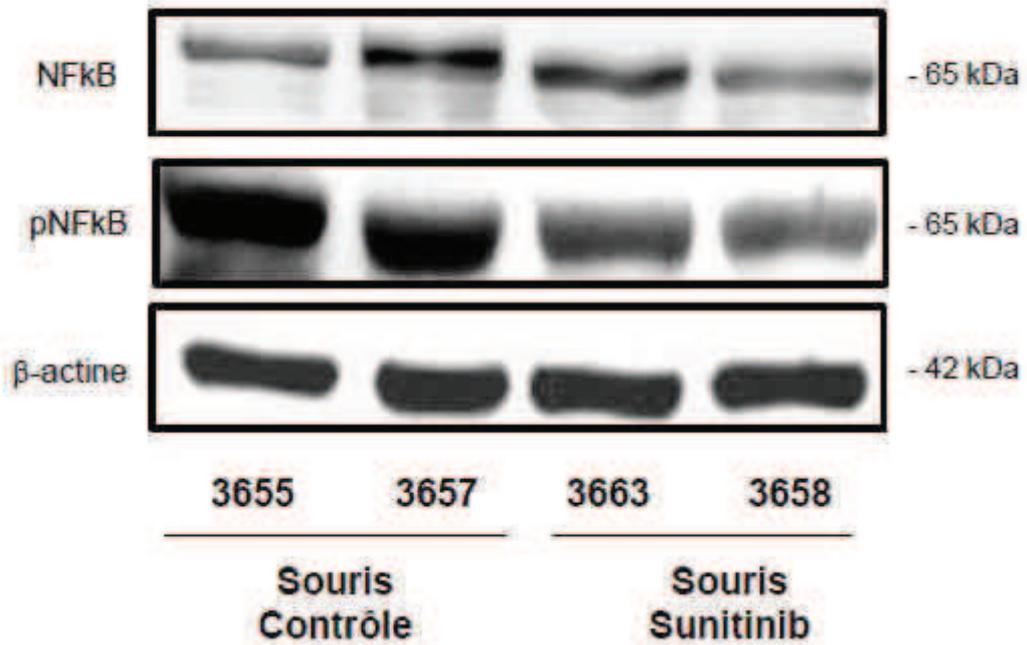
B

Figure 18 : Impact du traitement par sunitinib sur les voies AKT et NFκB *in vivo* sur la lignée A498. (A) Analyse par WB de l'expression Akt et de ses formes phosphorylées (S473 et T308) dans les tumeurs A498 des souris xénotreffées et traitées par sunitinib vs contrôle. (B) Analyse par WB de l'expression NFκB et de sa forme phosphorylée (S536) dans les tumeurs A498 des souris xénotreffées et traitées par sunitinib vs contrôle. Les résultats présentés sont représentatifs d'au moins 3 expériences.

3.4. Impact du sunitinib sur l'expression protéique de Lim1 *in vivo*

De nombreux travaux soulignent la contribution des voies néphrogéniques dans le développement du CCR. L'équipe a notamment montré l'implication du facteur de transcription Lim1. Nous avons donc recherché si l'expression de Lim1 était modulée par le traitement par sunitinib. Dans les tumeurs des souris xéno greffées par la lignée A498, nous notons que l'expression protéique de Lim1 est augmentée dans les tumeurs des souris xéno greffées traitées par sunitinib *vs* contrôle (Figure 19 A). Nous retrouvons également en RT-qPCR une augmentation de la transcription de Lim1 dans les 2 souris traitées *vs* contrôle (Figure 20). Cette augmentation n'est pas observable dans les modèles précliniques (Figure 19 B, C), ou on note une hétérogénéité de l'expression de Lim1.

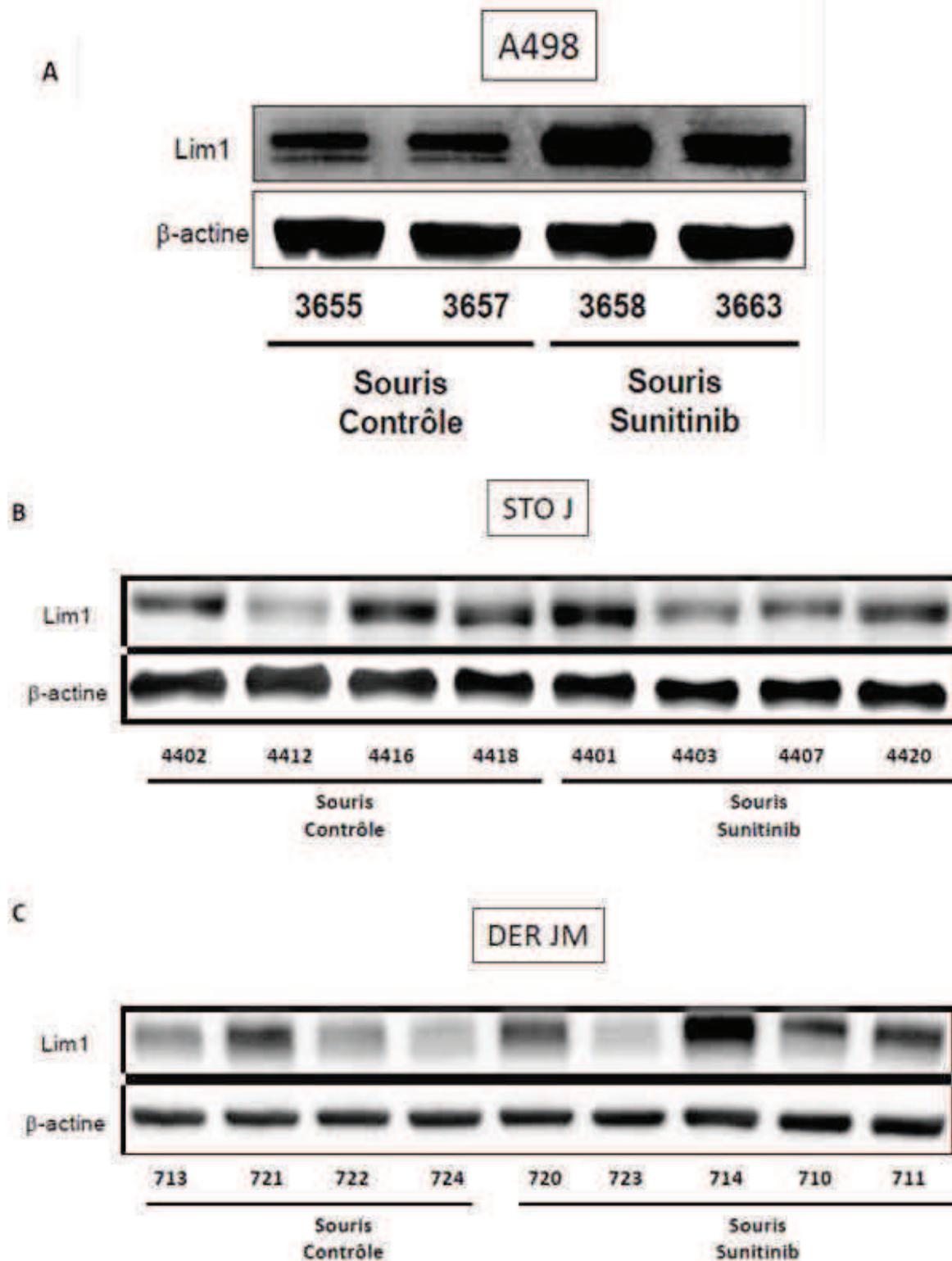


Figure 19 : Impact du traitement par sunitinib sur le facteur de transcription Lim1 *in vivo* sur la lignée A498 et les modèles précliniques. (A) Analyse par WB de l'expression de Lim1 dans les lysats de tumeurs de A498 xéno greffées (A), de tumeurs xéno greffées par la tumeur du patient STO J résistant au sunitinib (B) et de tumeurs xéno greffées par la tumeur du patient DER JM sensible au sunitinib (C). Les résultats présentés sont représentatifs d'au moins 3 expériences.

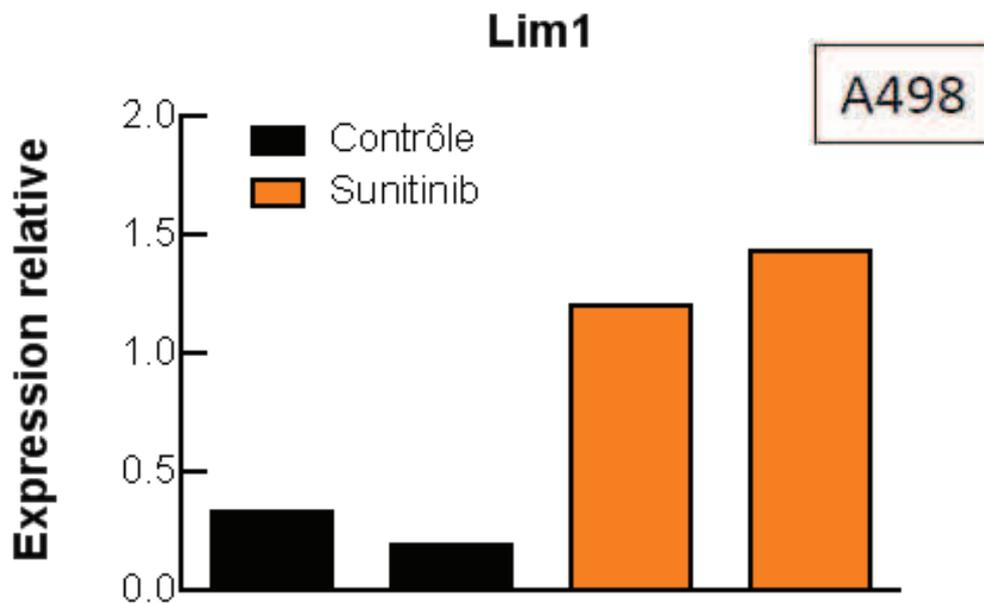


Figure 20 : Etude *in vivo* de l'expression du gène du facteur de transcription Lim1 après traitement par sunitinib. Analyse de l'expression de Lim1 par RT-qPCR dans les lysats de tumeurs de la lignée A498 xéno greffées.

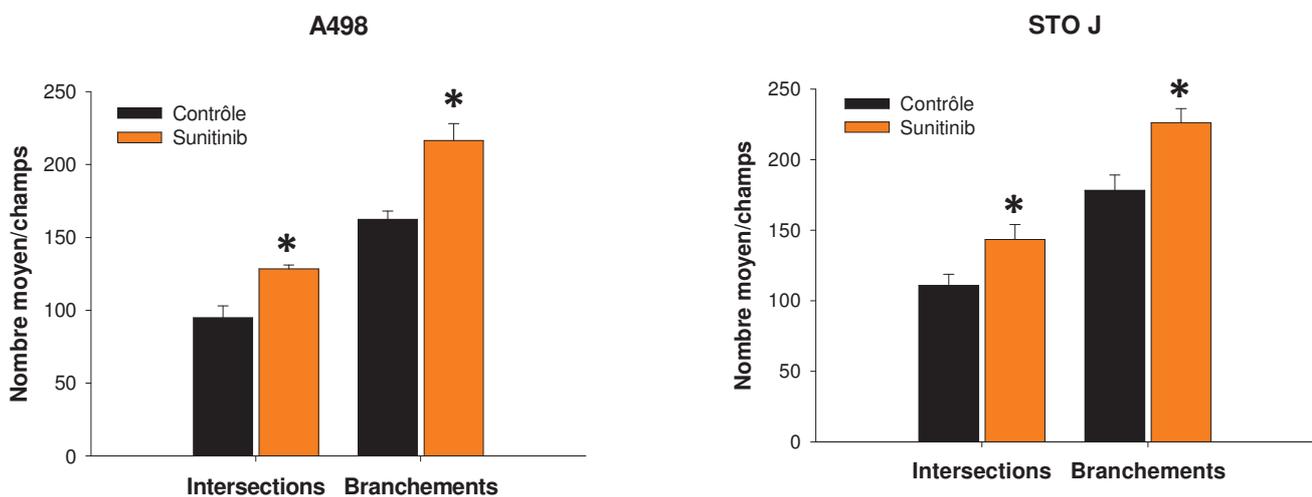
3.5. Impact du sunitinib sur la néovascularisation tumorale

Les thérapies anti-angiogéniques induisant une disparition des vaisseaux immatures et aboutissant à un réseau plus structuré. Le but ultime des thérapies anti-angiogéniques étant la disparition de la vascularisation tumorale.

Afin de confirmer l'impact du sunitinib sur la néovascularisation tumorale, nous avons réalisé une étude immunohistochimique sur les différents modèles *in vivo*.

On note dans les deux modèles résistants A498 et STO J, un nombre de branchements et un nombre d'intersections de vaisseaux plus importants dans le groupe traité que le groupe de contrôle, alors que dans le modèle sensible (DER JM), on ne retrouve pas cette tendance.

En résumé, dans la forme résistante au sunitinib, le traitement n'a pas permis de réduire le nombre de branchements ou le nombre d'intersections, éléments de la néovascularisation tumorale. (Figure 21)



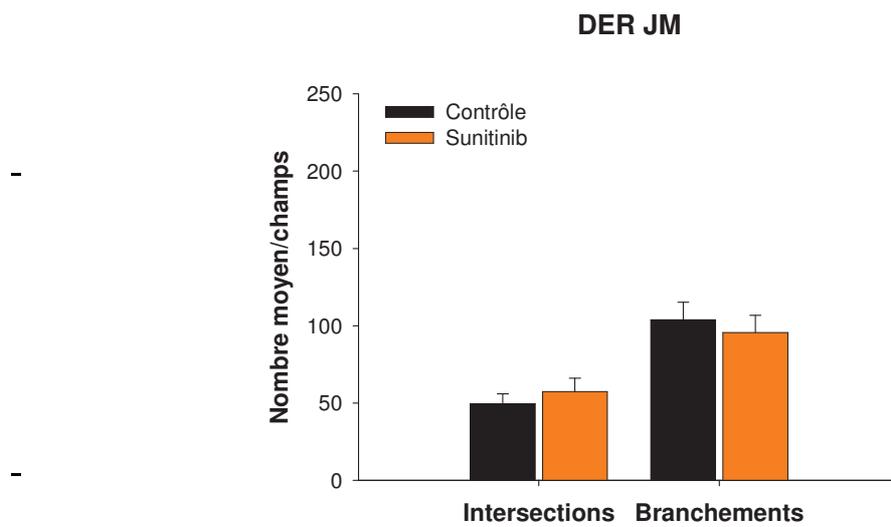


Figure 21 : Impact du Sunitinib sur la vascularisation tumorale *in vivo* chez la souris nude. La densité microvasculaire est déterminée en comptant pour chaque tumeur, le nombre d'intersections de vaisseaux dans 4 champs à grossissement 40 et le nombre branchements dans 5 champs. Elle a été étudiée sur le modèle de xénogreffe A498 résistant au sunitinib (A) et les 2 modèles précliniques, STO J résistant au sunitinib (B) et DER JM sensible au sunitinib (C).

DISCUSSION

Depuis l'introduction du concept des traitements anti-angiogéniques dans les CCR, ces molécules ont été considérées comme un des traitements anticancéreux de référence pour les CCC métastatiques. L'amélioration de la durée de vie des patients traités est restée faible, pourtant, l'apport des anti-angiogéniques dans ces cancers n'est pas négligeable car très peu d'autres alternatives thérapeutiques sont proposées.

Différentes molécules ont été utilisées dans les CCR ainsi que dans d'autres cancers. Plus d'une centaine d'études cliniques sont en cours pour évaluer l'efficacité de douzaines de nouvelles molécules anti-angiogéniques ciblant ou non le VEGF. Comme pour les autres thérapies ciblées, l'apparition de résistances est un frein à l'efficacité de ces molécules et réduit considérablement l'espérance de vie espérée des patients.

L'enjeu majeur est de comprendre pourquoi la majorité des patients arrêtent de répondre en cours de traitement ou sont réfractaires dès le départ et comment peut-on contrebalancer ces limitations. Beaucoup de mécanismes pouvant expliquer ces résistances sont évoqués dans beaucoup d'études, néanmoins le bénéfice clinique des traitements anti-angiogéniques reste très limité du fait que la traduction clinique de ces mécanismes retrouvés reste théorique.

L'angiogenèse joue un rôle clé dans la croissance et la progression tumorales [38]. Les tumeurs s'approvisionnent par divers moyens, y compris la vasculogenèse, la cooptation de vaisseaux existants et par mimétisme vasculaire [91, 92]. Les efforts visant à cibler l'angiogenèse tumorale ont porté sur la voie du facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) [93]. Le ciblage du VEGF s'est montré prometteur pour certains cancers, mais ne s'est pas avéré aussi efficace qu'on l'avait espéré [94,95]. Les données semblent indiquer des mécanismes d'échappement intervenant sous la médiation de cellules tumorales et de

membres du microenvironnement, ce qui conduit à l'hypothèse que le ciblage simultané de voies complémentaires et redondantes peut s'avérer une approche prometteuse dans le traitement des tumeurs rénales.

Compte tenu de nos connaissances grandissantes concernant les nombreuses voies alternatives pour le développement et le maintien du réseau vasculaire tumoral, plusieurs nouveaux inhibiteurs ont été développés pour bloquer les multiples voies de signalisation proangiogénique. Le sorafénib, l'axitinib, le sunitinib, le cediranib, et le pazopanib ciblent diversement les cascades de signalisation proangiogénique.

En se concentrant sur les voies prolifératives, angiogéniques et anti-apoptotiques dans le CCR, l'équipe a pu montrer que l'axe signalétique PI3K/Akt (Phosphatidyl-inositol 3-Phosphate Kinase/ Akt), la voie NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) et la voie des MAPK (Mitogen-Associated Protein Kinase) sont constitutivement activés dans le CCR, et ce, indépendamment du système VHL/HIF [70, 96-97].

Depuis quelques années, l'exploration des voies développementales et de leur implication dans la croissance tumorale et le développement de métastases a permis de mettre en relief les voies Notch et Wnt (Wingless-type) [98] et de démontrer que la voie néphrogénique du sonic hedgehog (SHH)-Gli est réactivée dans le CCR [37]. En effet, la liaison de SHH à son récepteur permet d'activer les facteurs de transcription Gli qui vont permettre la transcription de nombreux gènes cible (cycline D1, Wnt, Insulin-like growth factor 2 (IGF2), platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF)...) participant à la croissance tumorale. Il a été également mis en évidence de divers facteurs de transcription développementaux en aval de SHH, comme Pax2 et Lim1. Ces deux protéines ne sont normalement pas exprimées dans les cellules tubulaires du rein adulte,

mais sont exprimées de façon constitutive dans le CCC. Bien que Pax2 soit réexprimé par un mécanisme encore inconnu, il est prouvé que la quantité d'ARNm de Pax2 augmente en fonction du grade de Fuhrman de la tumeur [99]. Quant à Lim1, sa réactivation dans le CCC joue un rôle déterminant tant pour la croissance que pour l'invasion tumorale [100]. Des travaux sont en cours afin d'étudier son rôle dans le cancer du rein avancé et donc dans l'invasion métastatique.

Dans cette étude, nous nous sommes tout particulièrement intéressés à identifier les voies de signalisation spécifiques mises en jeu par le sunitinib dans un modèle *in vivo* résistant à cette thérapie. Cette approche a pour but d'identifier les voies de résistance du CCR afin de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques, voire d'élaborer des biomarqueurs prédictifs de la réponse (résistance ou sensibilité) aux thérapies ciblées.

Nous avons commencé notre étude par des expérimentations *in vitro* révélant une sensibilité de ces lignées cellulaires de CCR aux diverses thérapies testées, à savoir 3 cytotoxiques (cisplatine, 5-FU et vinblastine) et 3 anti-angiogéniques (sunitinib, sorafénib et évérolimus); et ceci quel que soit le paramètre analysé : densité cellulaire, prolifération ou apoptose. Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature. En effet, il est démontré que les cytotoxiques agissent principalement sur la prolifération cellulaire et que les anti-angiogéniques, en plus de leur effet anti-angiogénique, ont un effet cytotoxique et/ou cytostatique directement sur les cellules tumorales [101]. Or le CCR est caractérisé par une forte résistance aux thérapies *in vivo*. Ces modèles *in vitro* peuvent donc être quelque peu artificiels et il était nécessaire de valider ces études sur des modèles *in vivo*.

Dans le CCR, les modèles d'étude se limitent aux lignées tumorigéniques utilisables *in vitro* et *in vivo*. Ce constat a poussé le laboratoire de développer des modèles d'étude obtenus par

xénogreffe de tumeur de patient en collaboration avec le NHC reproduisant l'hétérogénéité tumorale retrouvée chez le patient.

Le modèle de xénogreffe était défini par une greffe de cellules ou tissus humains sur des souris nude. Ces souris sont dépourvus de lymphocytes B et T. Ils ont cependant des lymphocytes "naturel killer" NK et des macrophages qui peuvent être un handicap dans la greffe tumorale. Etant donné que la greffe orthotopique n'a pas de valeur prédictive par rapport à la situation clinique, la xénogreffe dans ce travail a été réalisée en sous cutanée. Le problème de ce modèle de souris nude est la nécessité de posséder une structure d'animalerie aux normes qui puissent garantir ces animaux fragiles, des germes pathogènes.

L'étude pilote que nous avons menée nous a permis d'identifier un modèle de CCC *in vivo* résistant au traitement par sunitinib (le modèle A498). Nous avons basé notre travail sur ce modèle afin d'identifier des voies de signalisation qui participent ou qui sont responsables de la résistance aux anti-angiogéniques. Le nombre de souris par groupe dans les différents modèles était restreint. Le but ultime reste de confirmer tous ces résultats sur des groupes plus importants.

Le laboratoire d'accueil, a démontré l'implication des voies oncogéniques PI3K/Akt et NF- κ B dans la prolifération et la résistance à l'apoptose des tumeurs rénales et mis en évidence les voies développementales néphrogéniques sont réactivées et détournées pour la croissance du CCC. Conformément à notre hypothèse, nous avons testés l'implication potentielle de ces voies dans la résistance. Concernant les voies oncogéniques Akt, nous avons pu retrouver comme dans la littérature l'implication de cette voie dans le CCC. L'expression des formes phosphorylées est plus importante chez les souris traitées et résistantes au sunitinib dans le modèle A498. Les analyses protéiques sur les voies développementales trouvaient une surexpression de Lim1 et Gli1 (donnée non présentée) sur le modèle A498 résistant aussi bien

au niveau protéique que messenger. Ce résultat est en adéquation avec les précédents résultats du laboratoire. Quant à la réexpression du Lim1 dans le CCC, Cette réexpression est plus importante chez les souris traitées et résistantes au sunitinib. Est-ce que ces surexpressions sont en réponse au traitement ou jouent un rôle dans la résistance? La question reste entière. Il faudrait compléter cette étude par des analyses *in vivo* après adjonction d'inhibiteur ou siRNA (ARN interférent) de Lim1 et voir si on arrive à récupérer une sensibilité de cette lignée *in vivo*.

Nous n'avons pas pu retrouver les mêmes résultats *in vivo* sur les modèles précliniques. Il existait une hétérogénéité de l'expression protéique et génomique de Lim1 et Akt sur les différents western blot et RT-qPCR. Cette hétérogénéité peut être liée à l'hétérogénéité des prélèvements réalisés sur la tumeur (prélèvements centraux, périphériques, dans de la nécrose). Une piste pour réduire cette hétérogénéité est de réaliser des analyses sur la l'ensemble de la tumeur.

Étant donné que les voies angiogéniques ont un rôle primordial dans le CCR métastatique, il était nécessaire d'exploiter notre modèle de résistance à la recherche de voie angiogéniques susceptibles de jouer un rôle dans la résistance au traitement. C'est ainsi que nous avons opté pour un large screening des protéines de l'angiogenèse mais également des protéines de l'apoptose et de phosphokinome. Une telle approche a été utilisée dans la littérature, comme par exemple dans l'identification de l'expression du gène l'endocan (ESM1) sur des puces à ADN sur des xénogreffes de tumeur rénales traitées par sunitinib.

Ces biopuces à protéines nous ont permis d'identifier un ensemble de cibles potentiellement impliquées dans les mécanismes de la résistance. L'angiogénine a particulièrement retenu notre attention avec ratio de 34. Ce résultat est en adéquation avec les données de la littérature, puisqu'on retrouve que l'angiogénine a été déjà isolée à partir de cellules

tumorales [57-63]. Elle existe à des concentrations plus faibles dans les tissus normaux et a déjà été mise en évidence dans le foie foetal. Elle n'est bien entendu pas le seul facteur de l'angiogenèse. La possibilité de réguler la production d'angiogénine est illustré dans un modèle de souris où l'indométhacine, un inhibiteur de la synthèse de prostaglandine, a été montré inhiber la production de PGE2 par les tumeurs MGG 101, réduisant la taille des tumeurs et prolongeant la survie des animaux. Chez les animaux traités, l'expression tumorale des ARNm de l'angiogénine et du FGF-2 diminuent ainsi que la vascularisation du tissu tumoral [64]. A notre connaissance, dans la littérature, aucune publication ne décrit le rôle de l'angiogénine dans le CCR, ni l'effet du traitement anti-angiogénique ou la résistance au traitement sur l'expression de l'angiogénine.

Etant donné que le protéome array/angiogenèse sur xénogreffes de la lignée A498 montrait une expression en Angiogénine 34 fois plus importante chez les souris traitées par rapport aux souris de contrôle, nous avons confirmé cette augmentation par western blot et RT-qPCR sur le modèle *in vivo* A498 résistant au sunitinib, suggérant que l'augmentation de l'expression de l'angiogénine est due, au moins en partie, à une augmentation de sa transcription.

Cet "up regulation" de l'expression de l'angiogénine dans ce modèle traité, ne permet pas à elle seule de confirmer l'implication de l'angiogénine dans la résistance. La comparaison à un bras sensible au sunitinib *in vivo* aurait permis de répondre à cette question mais ce modèle ne peut pas être assuré sur la même lignée. C'est ainsi que nous avons exploité deux modèles mis à disponibilité par UROLEAD pour confirmer ces résultats, deux modèles précliniques l'un sensible « DER JM » et l'autre résistant « STO J » au sunitinib. Malheureusement les résultats précédents n'ont pas pu être confirmés sur ces modèles de tumeurs CCR humaines. Il existait une hétérogénéité de l'expression de l'angiogénine dans ces modèles.

Par ailleurs il est à noter que cette augmentation de l'expression de l'angiogénine a été observée *in vitro* sur des lignées de CCR sensible au sunitinib. La question qui persistait avec l'avancement des résultats, était la suivante : pourquoi l'expression de l'angiogénine, est augmentée *in vivo* dans le modèle A498 résistant au sunitinib, elle est aussi augmentée *in vitro* sur les lignées sensibles au sunitinib mais pas sur les modèles humains qu'ils soient sensibles ou résistants au sunitinib?

En analysant l'expression de l'angiogénine sur culture cellulaire, on note que l'expression de l'angiogénine est plus importante à 24 et 48h après traitement par rapport à 72h. Il est fort probable que l'absence de surexpression de l'angiogénine dans notre modèle humain résistant « STO J » vient du fait que les tumeurs humaines xénogreffées ont été récupérées assez tardivement par rapport au traitement. La demi-vie de l'angiogénine étant de 12h [102].

L'étude de la vascularisation en immunohistochimie retrouve dans les deux modèles résistants A498 et STO J, un nombre de branchements et un nombre d'intersections de vaisseaux plus importants dans le groupe traité que le groupe de contrôle, faisant évoqué un phénomène d'activation de la neovascularisation sous effet du traitement résistant. Traiter *in vivo* la lignée A498 par du sunitinib pour lequel elle est résistante, paraît induire une surexpression de l'angiogénine et une augmentation de la vascularisation tumorale par rapport au contrôle.

Dans le modèle sensible DER JM, on ne retrouve pas de diminution de la néovascularisation tumorale, ce qui pourrait suggérer un mécanisme d'action du sunitinib dans ce modèle sensible autre qu'anti-angiogénique.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse, montre la complexité des voies de signalisations dans le CCC dans une ère ou l'enjeu majeur est de comprendre les différents mécanismes de résistance aux anti-angiogéniques.

La surexpression en angiogénine, en Lim1 et les formes phosphorylées de Akt, dans le modèle résistant ne permet pas à elle seule d'affirmer sa responsabilité dans la résistance au sunitinib. Nous avons pu montrer l'implication de ces facteurs dans un modèle traité et résistant au sunitinib. Il nous reste encore du travail afin de valider définitivement ces résultats, cela doit passer par une étude sur des échantillons plus importants de 2 modèles l'un sensible et l'autre résistant en prenant compte le timing pour optimiser les prélèvements à analyser par rapport aux caractéristiques de l'angiogénine. Il est intéressant aussi de poursuivre ce travail par une étude *in vivo* sur l'adjonction d'inhibiteur de l'angiogénine ou siRNA à des modèles résistants afin d'analyser la réponse au traitement.

La tendance dans la prise en charge des cancers est au développement des thérapies personnalisées. Le développement de marqueurs de la résistance aux thérapies par des modèles de xénogreffes de tumeurs rénales métastatiques sur des souris nude paraît intéressant afin de prédire *in vivo* sur xénogreffes de la résistance ou sensibilité au traitement.

Le but de cette thèse est de permettre au chercheur dans son laboratoire et l'urologue dans son bloc opératoire de participer au parcours personnalisé de soin du patient présentant un CCR métastatique.

Références

- [1] Linehan W.M., Srinivasan R., Schmidt L.S. The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease. *Nat Rev Urol* 2010;7:277-285.
- [2] Lonser R.R., Glenn G.M., Walther M., Chew E.Y., Libutti S.K., Linehan W., et al. Von Hippel - Lindau disease. *Lancet* 2003;361:2059-2067.
- [3] Maher E.R., Neumann H.P.H., Richard S. Von Hippel - Lindau disease: a clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet* 2011;19:617-623.
- [4] Schmidt L.S., Nickerson M.L., Angeloni D., Glenn G.M., Walther M.M., Albert P.S., et al. Early onset hereditary papillary renal carcinoma: germline missense mutations in the tyrosine kinase domain of the Met proto-oncogene. *J Urol* 2004;172:1256-1261.
- [5] Grubb R.L., Franks M.E., Toro J., Middleton L., Choyke L., Fowler S., et al. Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer: a syndrome associated with an aggressive form of inherited renal cancer. *J Urol* 2007;177:2074-2079.
- [6] Menko F.H., van Steensel M.A., Giraud S., Friis-Hansen L., Richard S., Ungari S., et al. Birt-Hogg-Dubé syndrome: diagnosis and management. *Lancet Oncol* 2009;10:1199-1206.
- [7] Jewett M.A., Mattar K., Basiuk J., Morash C.G., Pautler S.E., Siemens D.R., et al. Active surveillance of small renal masses: progression patterns of early stage kidney cancer. *Eur Urol* 2011;60:39-44.
- [8] Kunkle D.A., Crispen P.L., Chen D.Y., Greenberg R.E., Uzzo R.G. Enhancing renal masses with zero net growth during active surveillance. *J Urol* 2007;177:849-853 discussion 853-4.
- [9] Chawla S.N., Crispen P.L., Hanlon A.L., Greenberg R.E., Chen D.Y., Uzzo R.G. The natural history of observed enhancing renal masses: meta-analysis and review of the world literature. *J Urol* 2006;175:425-431.
- [10] Van Poppel H., Joniau S. Is surveillance an option for the treatment of small renal masses?. *Eur Urol* 2007;52:1323-1330.
- [11] Crispen P.L., Viterbo R., Boorjian S.A., Greenberg R.E., Chen D.Y., Uzzo R.G. Natural history, growth kinetics, and outcomes of untreated clinically localized renal tumors under active surveillance. *Cancer* 2009;115:2844-2852.
- [12] Kunkle D.A., Egleston B.L., Uzzo R.G. Excise, ablate or observe: the small renal mass dilemma: a meta-analysis and review. *J Urol* 2008;179:1227-1233 discussion 1233-4.
- [13] Motzer R.J., Hutson T.E., Tomczak P., Michaelson M.D., Bukowski R.M., Rixe O., et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007;356:115-124.
- [14] Escudier B., Eisen T., Stadler W.M., Szczylik C., Oudard S., Siebels M., et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007;356:125-134.

- [15] Escudier B., Pluzanska A., Koralewski P., Ravaud A., Bracarda S., Szczylik C., et al. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* 2007;370:2103-2111.
- [16] Hudes G., Carducci M., Tomczak P., Dutcher J., Figlin R., Kapoor A., et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007;356:2271-2281.
- [17] Motzer R.J., Escudier B., Oudard S., Hutson T.E., Porta C., Bracarda S., et al. Efficacy of Everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet* 2008;372:449-456.
- [18] Hutson T.E., Davis I.D., Machiels J.P., De Souza P.L., Rottey S., Hong B.F., et al. Efficacy and safety of pazopanib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2010;28:475-480.
- [19] Rini B.I., Escudier B., Tomczak P., Kaprin A., Szczylik C., Hutson T.E., et al. Comparative effectiveness of axitinib versus Sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): a randomised phase 3 trial. *Lancet* 2011;378:1931-1939 .
- [20] Escudier B., Albiges L., Sonpavde G. Optimal management of metastatic renal cell carcinoma: current status. *Drugs* 2013;73:427-438.
- [21] Antonelli A, Cozzoli A, Zani D, Zanotelli T, Nicolai M, Cunico SC, Simeone C. The follow-up management of non-metastatic renal cell carcinoma: definition of a surveillance protocol. *BJU Int* 2007;99:296-300.
- [22] Eggener SE, Yossepowitch O, Pettus JA, Snyder ME, Motzer RJ, Russo P. Renal cell carcinoma recurrence after nephrectomy for localized disease: predicting survival from time of recurrence. *J Clin Oncol* 2006;24:3101-6.
- [23] Hoffmann NE, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML. Differences in organ system of distant metastasis by renal cell carcinoma subtype. *J Urol* 2008;179:474-7.
- [24] Iliopoulos O, Kibel A, Gray S and Kaelin WG, Jr. Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat Med* 1995; 1: 822-6.
- [25] Foster K, Prowse A, van den Berg A, Fleming S, Hulsbeek MM, Crossey PA, et al. Somatic mutations of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene in non-familial clear cell renal carcinoma. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 2169-73.
- [26] Kondo K and Kaelin WG, Jr. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Exp Cell Res* 2001; 264: 117-25.
- [27] Ferrara N, Gerber HP and LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-76.
- [28] Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003; 9: 685-93.
- [29] Vivanco I and Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 489-501.

- [30] Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 729-34.
- [31] Everitt JJ, Walker CL, Goldsworthy TW and Wolf DC. Altered expression of transforming growth factor-alpha: an early event in renal cell carcinoma development. *Mol Carcinog* 1997; 19: 213-9.
- [32] Julien Edeline, Cécile Vigneau, Jean-Jacques Patard, Nathalie Rioux-Leclercq. Voies moléculaires dans le cancer du rein : de la biologie aux traitements de demain. *Bulletin du Cancer, John Libbey Eurotext*, 2010, 97 :5-15
- [33] McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol* 2003 ; 53 : 1-114.
- [34] Lee JJ, Ekker SC, von Kessler DP, Porter JA, Sun BI, Beachy PA. Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science* 1994 ; 266 : 1528-37.
- [35] Kogerman P, Grimm T, Kogerman L, Krause D, Undén AB, Sandstedt B, et al. Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nat Cell Biol* 1999 ; 1 : 312-9.
- [36] Torroja C, Gorfinkiel N, Guerrero I. Patched controls the Hedgehog gradient by endocytosis in a dynamin-dependent manner, but this internalization does not play a major role in signal transduction. *Development* 2004 ; 131 : 2395-408.
- [37] Dormoy V., Danilin S., Lindner V., Thomas L., Rothhut S., Coquard C., Helwig JJ., Jacqmin D., Lang H., Massfelder T. The Sonic Hedgehog signaling pathway is reactivated in human renal cell carcinoma and plays orchestral role in tumor growth. *Molecular Cancer*, 2009; 16, 8:123
- [38] Folkman J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 1971 ; 285: 1182-1186.
- [39] Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 2003; 9: 653-660.
- [40] Folkman J., Hahnfeldt P. & Hlatky L. Cancer: looking outside the genome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000; 1: 76-79
- [41] Gatenby R. A. & Gillies R. J.. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*, 2004; 4: 891-899.
- [42] Holash J., Maisonpierre P. C., Compton D., Boland P., Alexander C. R., Zagzag D., Yancopoulos G. D. & Wiegand S. J.. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*, 1999; 284: 1994-1998.
- [43] Carmeliet P., Mackman N., Moons L., Luther T., Gressens P., Van Vlaenderen I., Demunck H., Kasper M., Breier G., Evrard P., Muller M., Risau W., Edgington T. & Collen D. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature*, 1996 ; 383: 73-75

- [44] Benjamin L. E., Golijanin D., Itin A., Podes D. & Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest*, 1999; 103: 159-165.
- [45] Liu Y., Cox S. R., Morita T. & Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res*, 1995 ; 77: 638-643.
- [46] Wang G. L., Jiang B. H., Rue E. A. & Semenza G. L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci*, 1995; 92: 5510-5514.
- [47] Takahashi Y., Kitadai Y., Bucana C. D., Cleary K. R. & Ellis L. M. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res*, 1995; 55: 3964-3968.
- [48] McDonald D. M. & Baluk P. 2005. Imaging of angiogenesis in inflamed airways and tumors: newly formed blood vessels are not alike and may be wildly abnormal: Parker B. Francis lecture. *Chest* 128: 602S-608S.
- [49] Jain R. K. 2001. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med* 7: 987-989.
- [50] Spong CY, Ghidini A, Sherer DM, Pezzullo JC, Ossandon M, Eglinton GS. Angiogenin: a marker for preterm delivery in midtrimester amniotic fluid. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1997 ; 176 : 415-8.
- [51] Koga K, Osuga Y, Tsutsumi O, Momoeda M, Suenaga A, Kugu K, Fujiwara T, Yano T, Yano T, Taketani Y. Evidence for the presence of angiogenin in human follicular fluid and the up-regulation of its production by human chorionic gonadotropin and hypoxia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000 ; 85 : 3352-5.
- [52] Rybak SM, Fett JW, Yao Q-Z, Vallee BL. Angiogenin mRNA in human tumor and normal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987 ; 146 : 1240-8.
- [53] Moenner M, Gusse M, Hatzi E, Badet J. The widespread expression of angiogenin in different human cells suggests a biological function not only related to angiogenesis. *Eur. J. Biochem.* 1994 ; 226 : 483-90.
- [54] Futami J, Tsushima Y, Murato Y, Tada H, Sasaki J, Seno M, Yamada H. Tissue-specific expression of pancreatic-type RNases and RNase inhibitor in humans. *DNA Cell Biol.* 1997 ; 16 : 413-9.
- [55] Badet J. Angiogenin. In Bikfalvi A, ed. *Encyclopaedic Reference of Vascular Biology & Pathology*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 2000, 16-29.
- [56] Trent U, Steidinger, David G, Standaert et Talene A, Yacoubian, « *A neuroprotective role for angiogenin in models of Parkinson's disease* », *Journal of Neurochemistry*, 2011; 116, 334-341.

- [57] Shimoyama S, Kaminishi M. Increased angiogenin expression in gastric cancer correlated with cancer progression. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2000 ; 126 : 468-74.
- [58] Miyake H, Hara I, Yamanaka K, Gohji K, Arakawa S, Kamidono S. Increased angiogenin expression in the tumor tissue and serum of urothelial carcinoma patients is related to disease progression and recurrence. *Cancer* 1999 ; 86 : 316-24.
- [59] Shimoyama S, Yamasaki K, Kawahara M, Kaminishi M. Increased serum angiogenin concentration in colorectal cancer is correlated with cancer progression. *Clin. Cancer Res.* 1999 ; 5 : 1125-30.
- [60] Chopra V, Dinh TV, Hannigan EV. Angiogenin, interleukins, and growth-factor levels in serum of patients with ovarian cancer: correlation with angiogenesis. *Cancer J. Sci. Am.* 1996 ; 2 : 279-85.
- [61] Chopra V, Dinh TV, Hannigan EV. Serum levels of interleukins, growth factors and angiogenin in patients with endometrial cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1997 ; 123 : 167-72.
- [62] Chopra V, Dinh TV, Hannigan EV. Circulating serum levels of cytokines and angiogenic factors in patients with cervical cancer. *Cancer Invest.* 1998 ; 16 : 152-9.
- [63] Montero S, Guzman C, Cortés-Funes H, Colomer R. Angiogenin expression and prognosis in primary breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 1998 ; 4 : 2161-8.
- [64] Lönnroth C, Svaninger G, Gelin J, Cahlin C, Iresjö B-M, Cvetkovska E, Edström S, Andersson M, Svanberg E, Lundholm K. Effects related to indomethacin prolonged survival and decreased tumor growth in a mouse tumor model with cytokine dependent cancer cachexia. *Int. J. Oncol.* 1995 ; 7 : 1405-13.
- [65] Pavlov N, Badet J. L'angiogénine : implication dans l'angiogénèse et le développement tumoral *Bull Cancer.* 2001 Aug;88(8):725-32.
- [66] Thomas GV, Tran C, Mellinghoff IK, Welsbie DS, Chan E, Fueger B, Czernin J, Sawyers CL. Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer. *Nat Med* 2006;12:122-7.
- [67] Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, et al. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 2003;9:327-37.
- [68] Wilhelm SM, Carter C, Tang L, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004;64:7099-109
- [69] Gottesman M. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu. Rev. Med.* 2002;53, 615–27.

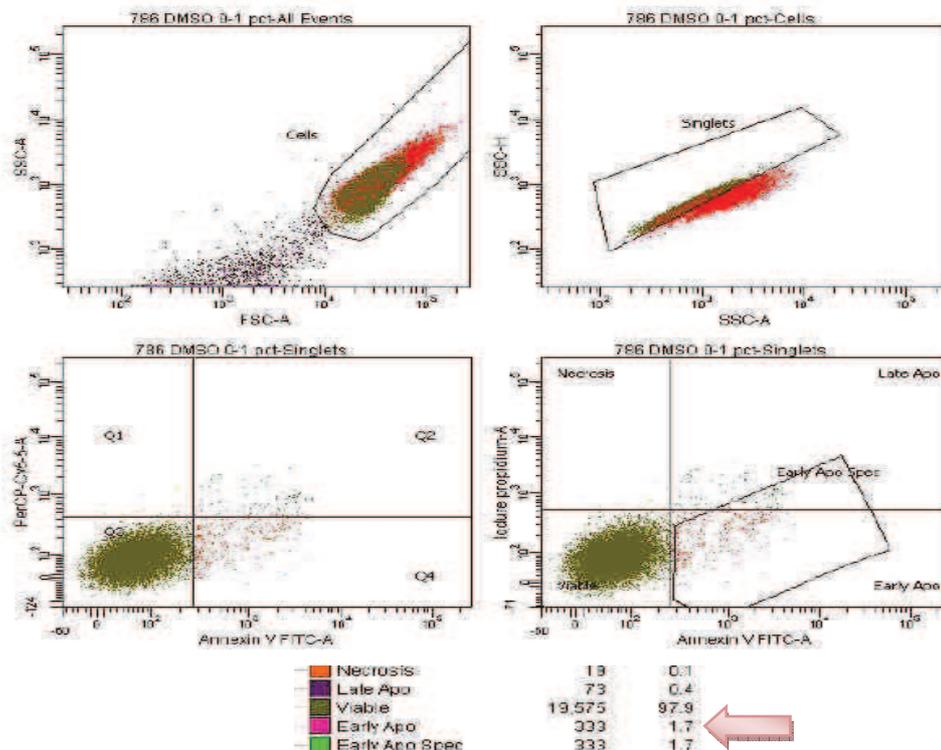
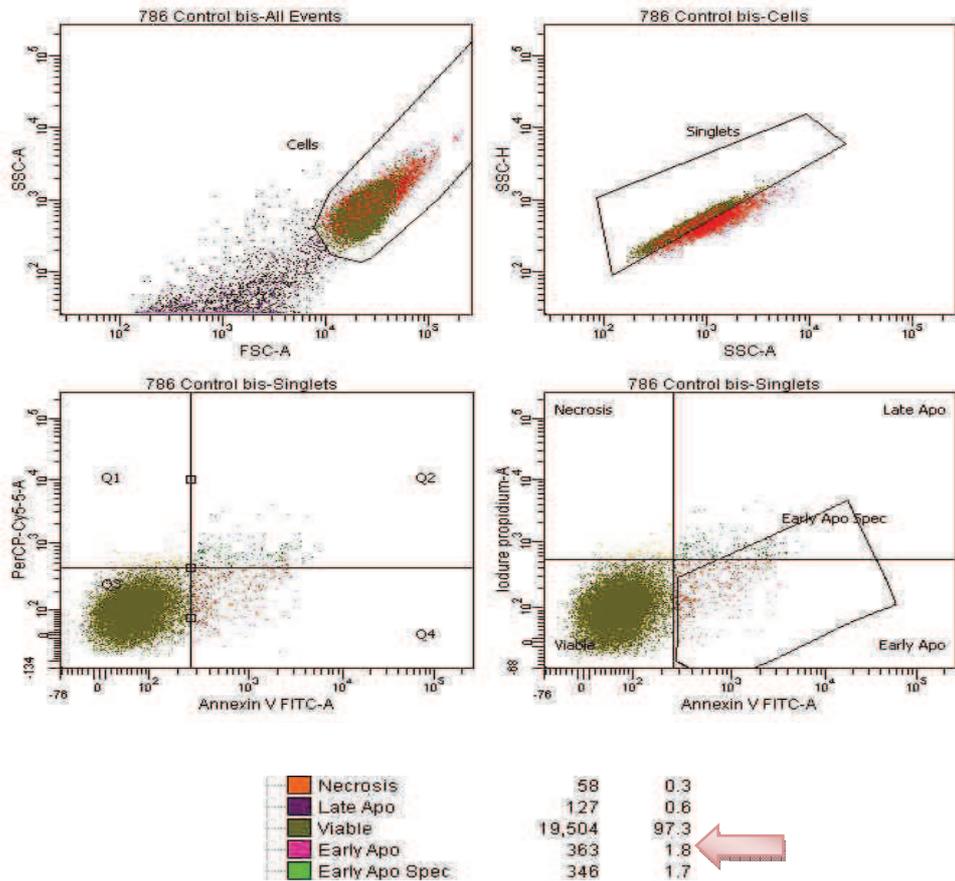
- [70] Sourbier C., Danilin S., Lindner V., Steger J., Rothhut S., Meyer N., Jacqmin D., Helwig JJ., Lang H., Massfelder T. Targeting the nuclear factor-kappaB rescue pathway has promising future in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Res*, 2007; 67, 11668-76.
- [71] Hueber PA., Waters P., Clark P., Eccles M., Goodyer P. (). PAX2 inactivation enhances cisplatin-induced apoptosis in renal carcinoma cells. *Kidney Int*. 2006; 69, 1139-45.
- [72] Kawazoe H., Bilim VN., Ugolkov AV., Yuuki K., Naito S., Nagaoka A., Kato T., Tomita Y. GSK-3 inhibition in vitro and in vivo enhances antitumor effect of Sorafenib in renal cell carcinoma (RCC). *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 ; 423, 490-5.
- [73] Makhov PB., Golovine K., Kutikov A., Teper E., Canter DJ., Simhan J., Uzzo RG., Kolenko VM. Modulation of Akt/mTOR signaling overcomes Sunitinib resistance in renal and prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2012; 11, 1510-7
- [74] Coulouarn C., Corlu A., Glaise D., Guénon I., Thorgeirsson SS., Clément B. Hepatocyte-stellate cell cross-talk in the liver engenders a permissive inflammatory microenvironment that drives progression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2012; 72, 2533-42.
- [75] Saidi A., Hagedorn M., Allain N., Verpelli C., Sala C., Bello L., Bikfalvi A., Javerzat S. Combined targeting of interleukin- 6 and vascular endothelial growth factor potently inhibits glioma growth and invasiveness. *Int J Cancer*. 2009 ; 125, 1054-64.
- [76] Dumartin L., Quemener C., Laklai H., Herbert J., Bicknell R., Bousquet C., Pyronnet S., Castronovo V., Schilling MK., Bikfalvi A., et al. Netrin-1 mediates early events in pancreatic adenocarcinoma progression, acting on tumor and endothelial cells. *Gastroenterology*, 2010 ; 138,1595-606.
- [77] Rebutti M., Michiels C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochem Pharmacol*. 2013; 85,1219-26
- [78] Le Floch, R., Chiche J., Marchiq I., Naiken T., Ilc K., Murray CM., Critchlow SE., Roux D., Simon MP., Pouyssegur J. CD147 subunit of lactate/ H⁺ symporters MCT1 and hypoxiainducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 ; 108,16663-8.
- [79] Fergelot P, Bernhard JC., Soulet F., Kilarski WW., Léon C., Courtois N., Deminière C., Herbert JM., Antczak P., Falciani F., et al. The experimental renal cell carcinoma model in the chick embryo. *Angiogenesis* 2013; 16, 181-94.
- [80] Straussman R., Morikawa T., Shee K., Barzily-Rokni M., Qian ZR., Du J., Davis A., Mongare MM., Gould J., Frederick DT. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*. 2012; 487,500-4.
- [81] Vaupel P., Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev*. 2007; 26,225-39

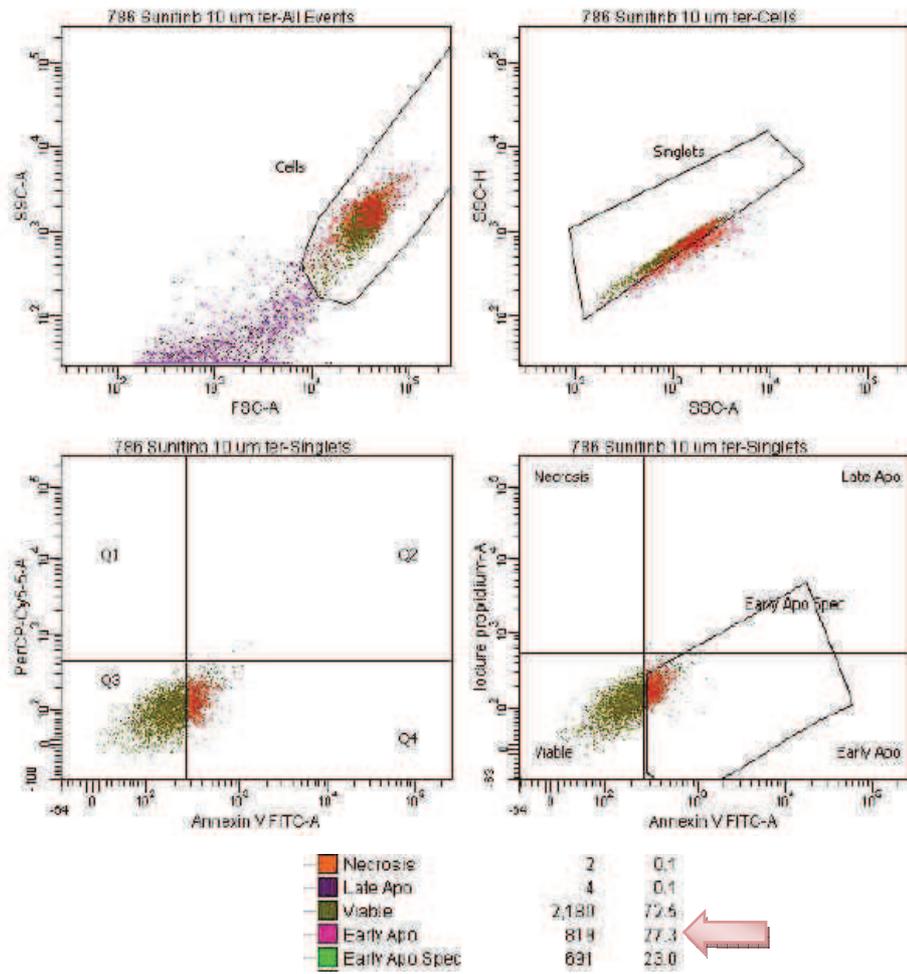
- [82] Rohwer N., Cramer T. Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist Updat.* 2011; 14,191-201
- [83] Cosse JP., Michiels C. Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Anticancer Agents Med Chem.* 2008; 8,790-7.
- [84] Ward RJ., Dirks PB. Cancer stem cells: at the headwaters of tumor development. *Annu Rev Pathol.* 2007; 2,175-89.
- [85] Borst P. Cancer drug pan-resistance: pumps, cancer stem cells, quiescence, epithelial to mesenchymal transition, blocked cell death pathways, persists or what? *Open Biol.*2012; 2.
- [86] Tamaskar I., Dhillon J., Pili R. Resistance to angiogenesis inhibitors in renal cell carcinoma. *Clin Adv Hematol Oncol.*2011; 9, 101-10.
- [87] Figlin RA., Kaufmann I., Brechbiel J. Targeting PI3K and mTORC2 in metastatic renal cell carcinoma: new strategies for overcoming resistance to VEGFR and mTORC1 inhibitors. *Int J Cancer.* 2013 ; 133, 788-96.
- [88] Santoni M., Pantano F., Amantini C., Nabissi M., Conti A., Burattini L., Zoccoli A., Berardi R., Santoni G., Tonini G., et al. Emerging strategies to overcome the resistance to current mTOR inhibitors in renal cell carcinoma *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1845(2):221-31
- [89] Carew Js, Kelly Kr, Nawrocki St : Mechanisms of mTOR inhibitor resistance in cancer therapy, *Targeted Oncology.* 2012; 6 (1): 17-27.
- [90] Battelli C, Cho C.D : mTOR inhibitors in renal cell carcinoma, *Therapy.* 2011 ; 8(4): 359-367.
- [91] Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P: Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell,* 2011; 146: 873- 887,
- [92] Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011; 144:646-674,
- [93] Spannuth WA, Sood AK, Coleman RL: Angiogenesis as a strategic target for ovarian cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol,* 2008; 5:194-204.
- [94]Eskander RN, Randall LM: Bevacizumab in the treatment of ovarian cancer. *Biologics,* 2011; 5:1-5,
- [95] Beal K, Abrey LE, Gutin PH: Antiangiogenic agents in the treatment of recurrent or newly diagnosed glioblastoma: Analysis of single-agent and combined modality approaches. *Radiat Oncol* 2011, 6:2,
- [96] Sourbier C., Lindner V., Lang H., Agouni A., Schordan E., Danilin S., Rothhut S., Jacqmin D., Helwig JJ., Massfelder T. The phosphoinositide 3 kinase/Akt pathway, a new target in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Res.* 2006; 66, 5130-42.

- [97] Sourbier C., Massfelder T. Parathyroid Hormone related Protein in human renal cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2006; 240, 170-182.
- [98] Sjölund J., Johansson M., Manna S., Norin C., Pietras A., Beckman S., Nilsson E., Ljungberg B., Axelson H. Suppression of renal cell carcinoma growth by inhibition of Notch signaling in vitro and in vivo. *J Clin Invest*, 2008; 118, 217-28.
- [99] Patrício P, Ramalho-Carvalho J, Costa-Pinheiro P, Almeida M, Barros-Silva JD, Vieira J, Dias PC, Lobo F, Oliveira J, Teixeira MR, Henrique R, Jeronimo C. Deregulation of PAX2 expression in renal cell tumours: mechanisms and potential use in differential diagnosis. *J Cell Mol Med.* 2013; 17(8):1048-58.
- [100] Dormoy V., Béraud C., Lindner V., Thomas L., Coquard C., Barthelmebs M., Jacqmin D., Lang H., Massfelder T. Lim class homeobox gene Lim-1, a novel oncogene in human renal cell carcinoma. *Oncogene*, 2011; 30, 1753-63
- [101] Küpeli S., Beksac M., Küpeli B., Baltaci S., Süzer O. Determination of in vitro drug sensitivity to a panel of cystostatic drugs and interferon alpha-2b in patients with renal cell carcinoma. *Int Urol Nephrol.*1997 ; 29, 421-6.
- [102] Hatzi E, Bassaglia Y, Badet J. Internalization and processing of human angiogenin by cultured aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Jan 27;267(3):719-25.

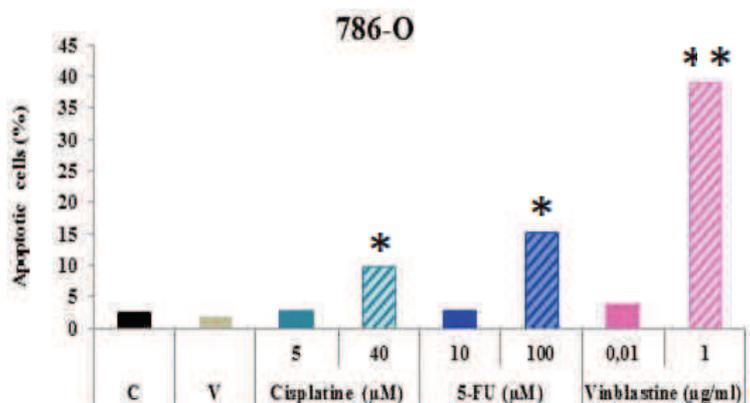
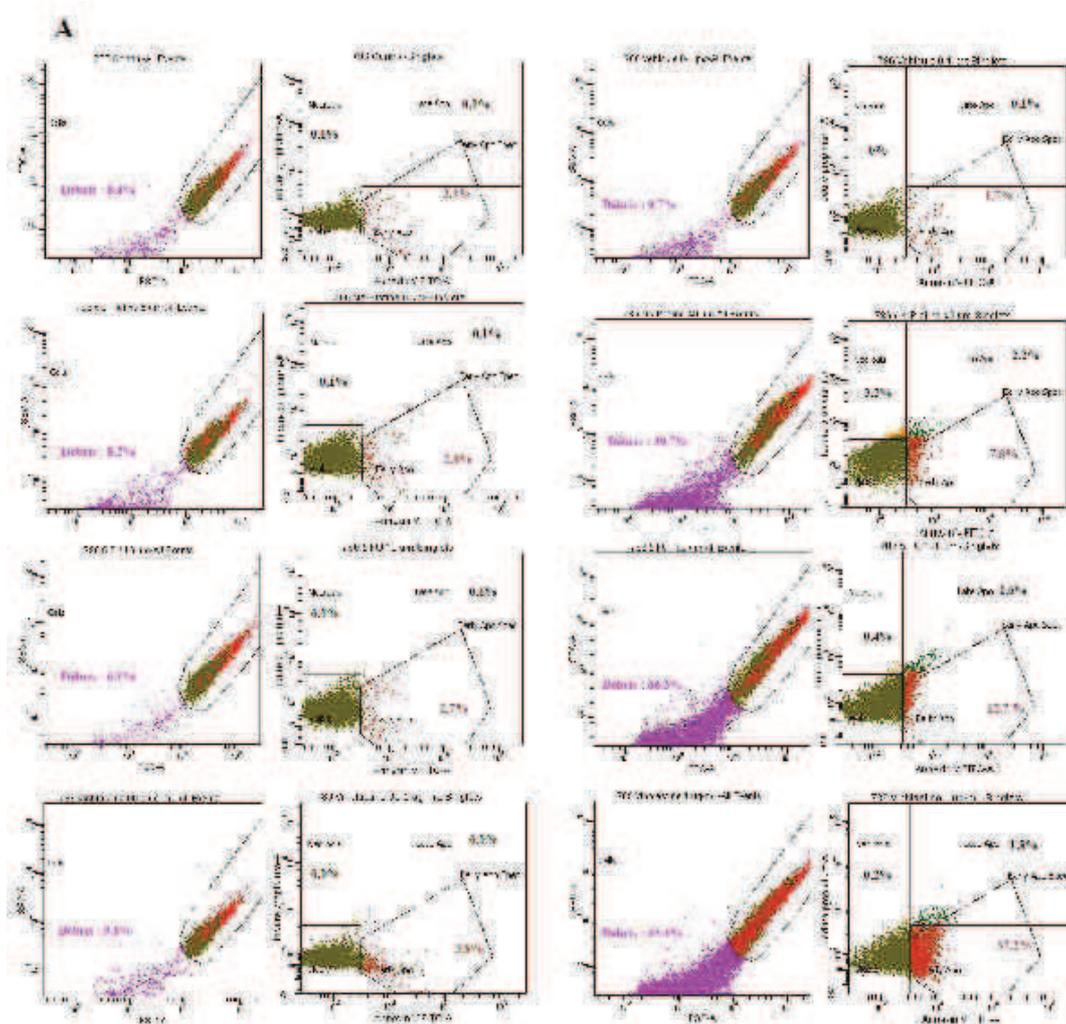
ANNEXES

Annexe 1 : Effet de différents agents thérapeutiques sur la mort cellulaire de lignées cellulaires de CCR humain. Analyse par FACS à 24h post-traitement, des cellules O-786 traitées respectivement pour le sunitinib. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm E.S.M, n=3. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ par rapport au CTRL. Exemples d'analyse par FACS.





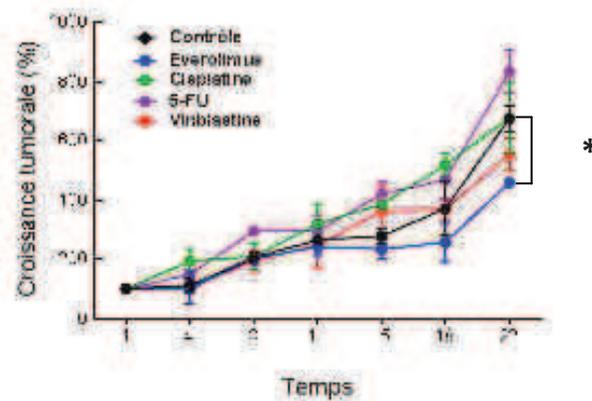
Annexe 2 : Effet de différents agents cytotoxiques sur la mort cellulaire de lignées cellulaires de CCR humain. Analyse par FACS à 48h post-traitement, des cellules 0-786 traitées par les cytotoxiques. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm E.S.M, n=3. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ par rapport au CTRL. Exemples d'analyse par FACS.



Annexe 3: Effet de différents agents thérapeutiques sur la croissance tumorale de CCC humain *in vivo* chez la souris nude. (A) Etude pilote évaluant la croissance tumorale chez des souris nude xéno greffées par la lignée A498 et traitées pendant 3 semaines par Everolimus (10mg/kg, 5 fois/semaine) per os, Cisplatine, 5-FU et Vinblastine. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm E.S.M, n=3 pour le groupe CTRL et n=2 pour les groupes tts. (B) Croissance tumorale chez des souris nude xéno greffées par des tumeurs de patients atteints de CCR (STO J et DER JM) et traitées pendant 2 périodes de 3 semaines, séparées par une semaine de wash out, par sunitinib (40mg/kg, 3 fois/semaine) per os, séparées par une semaine de wash out.

A

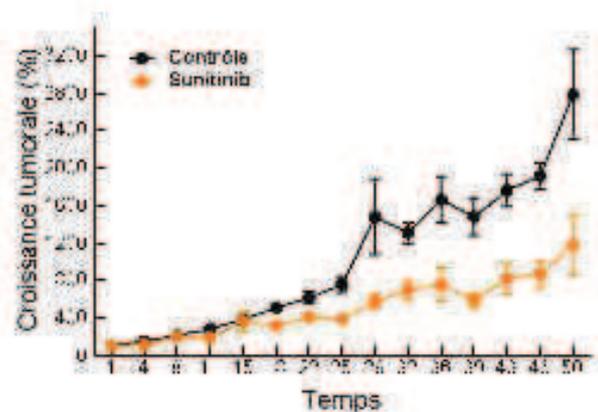
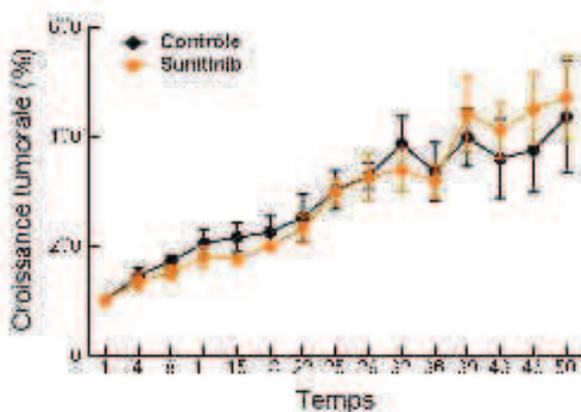
A498



B

STO J

DER JM



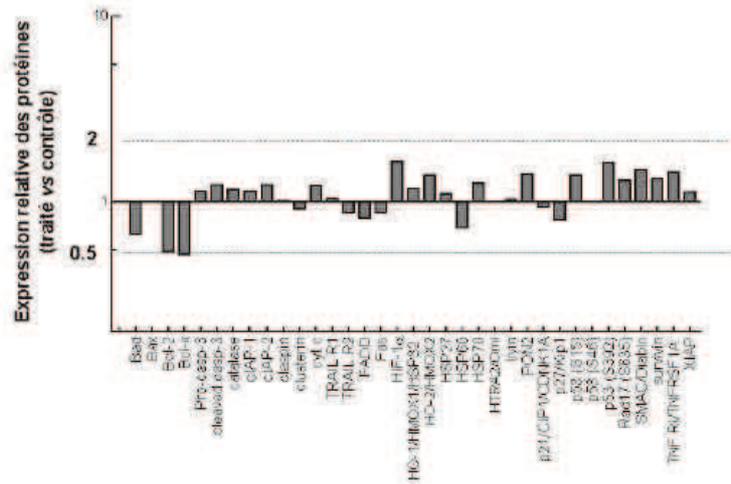
Annexe 4 : Analyse des marqueurs moléculaires induits par le sunitinib par une approche à large spectre (biopuces à protéines). Ratios d'expression des protéines (échelle logarithmique) testées dans les tumeurs traitées par sunitinib vs contrôle pour les kit Apoptose (A) et Phosphokinase (B). En vert sont représentées les protéines dont le ratio d'augmentation est supérieur à 2. En rouge, les protéines dont le ratio est inférieur à 0,5.

A498

A



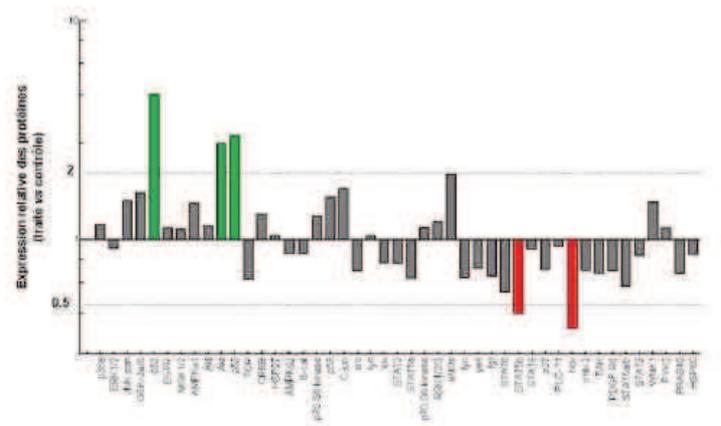
Proteome array Apoptose



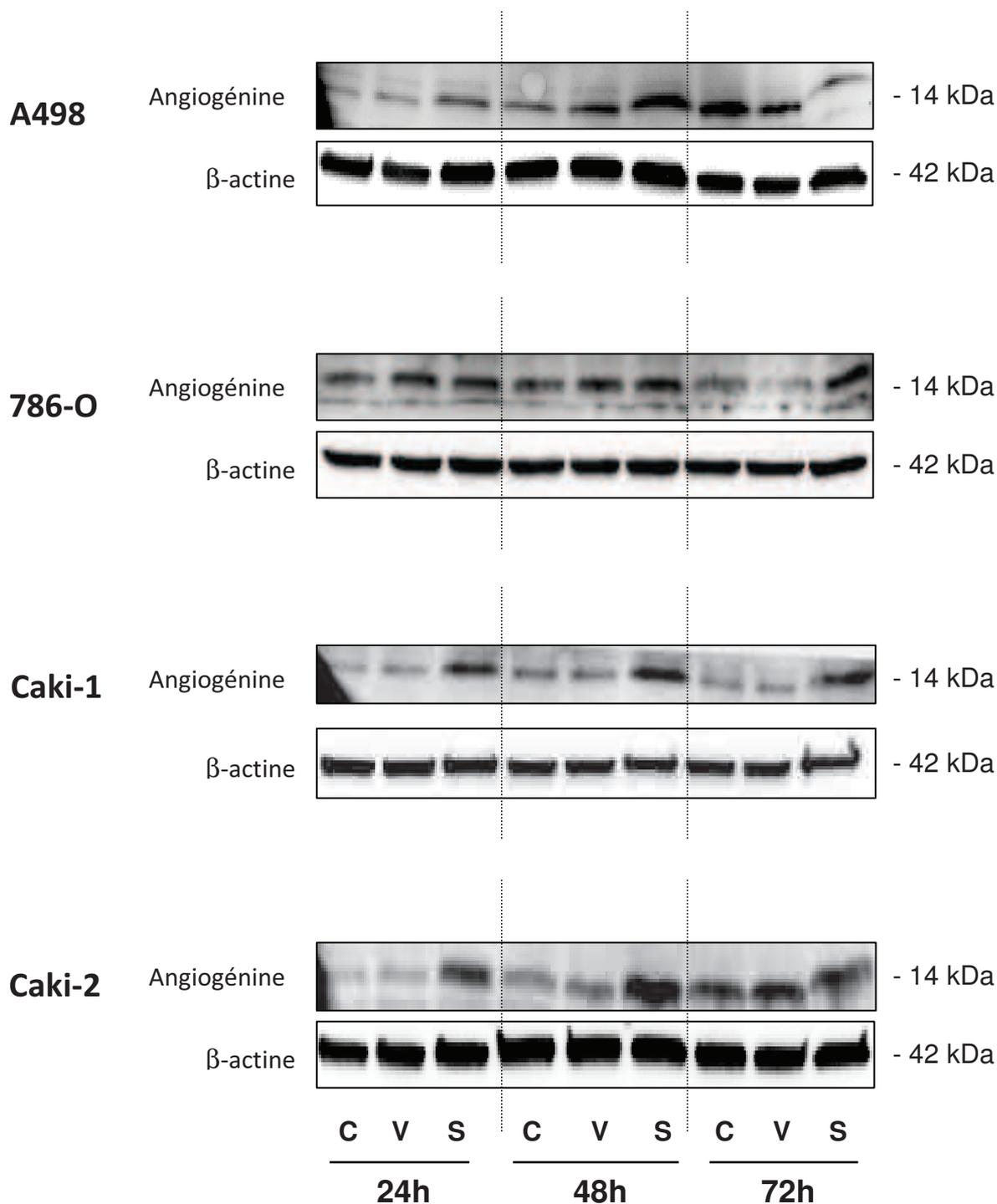
B



Proteome array Phosphokinome



Annexe 5 : Expression *in vitro* de l'angiogénine dans les 4 lignées cellulaires de CCC humain traitées par sunitinib. Analyse en Western blot de l'expression de l'angiogénine dans les lignées A498, 786-O, Caki-2 et Caki-1. L'analyse a été réalisée après 24, 48 ou 72 h de traitement par sunitinib (100µM). C : Contrôle, V : Véhicule, S : sunitinib 100 µM. Les résultats présentés sont représentatifs d'au moins 3 expériences.



Etude des voies signalétiques impliquées dans la
résistance aux agents thérapeutiques dans le carcinome
à cellules rénales humain

Résumé

Le carcinome à cellules rénales (CCR) se caractérise par une résistance importante aux thérapies. Notre hypothèse était que des voies signalétiques prolifératives, anti-apoptotiques et/ou angiogéniques sont mises en jeu dans la résistance aux thérapies. Il s'agissait de mesurer la sensibilité de lignées cellulaires de CCR humain à différentes classes thérapeutiques *in vitro* et *in vivo*. Une étude pilote a été réalisée sur la base de xénogreffes de la lignée A498 chez la souris nude, puis exploitée pour des analyses sur biopuces à protéines afin d'identifier les voies de signalisation induites par le sunitinib. *In vitro*, les lignées cellulaires de CCR se sont révélées sensibles aux thérapies indépendamment du statut VHL. *In vivo*, la lignée A498 est apparue résistante au sunitinib. L'approche par biopuces a montré que plusieurs protéines de l'angiogenèse sont modulées sous l'effet du traitement, notamment l'angiogénine. Il n'y a pas de modification de l'expression des protéines de l'apoptose testées. Les formes phosphorylées d'Akt sont également augmentées dans les tumeurs traitées, de même que Lim1 alors que la forme phosphorylée de NFκB est diminuée. Ce travail a ainsi identifié de potentielles cibles impliquées dans les mécanismes de résistance et devraient permettre de définir de nouvelles options thérapeutiques dans le cancer du rein.

Mots clés : carcinome rénal, résistance au traitement, cytotoxiques, thérapies ciblées, angiogénine, Lim1

Résumé en anglais

The renal cell carcinoma is characterized by a high resistance to therapies. Our working hypothesis was that proliferative signaling pathways, anti-apoptotic and / or angiogenic are involved in resistance to therapies. Thus, as part of this thesis, we measured the sensitivity to chemotherapy and targeted therapies in kidney cancer cell lines *in vitro* as well *in vivo*.

A pilot study was conducted on the basis of the A498 cell line xenografts in nude mice, and then used for analysis on proteome arrays to identify the signaling pathways induced by sunitinib. *In vitro*, the cell lines of RCC were sensitive to therapy regardless of the VHL status. *In vivo*, the line A498 appeared resistant to sunitinib. The approach using the proteome array has shown that several angiogenesis proteins are modulated as a result of treatment, including angiogenin. There was no change in the expression of proteins of apoptosis. Phosphorylated forms of Akt were also increased in the treated tumors, as well as Lim1 whereas the phosphorylated form of NFκB was reduced. This work has identified potential targets involved in resistance mechanisms and should define new therapeutic options in renal cancer.

Keywords: renal carcinoma, resistance to treatment, cytotoxic agents, targeted therapy, angiogenin, Lim1