

Discipline  
Aspect Moléculaire et Cellulaire de la Biologie

Par  
Séverine  
WACK

**ETUDE DE MODALITES  
MULTITHERAPEUTIQUES ET  
DIAGNOSTIQUES APPLIQUEES  
AU CANCER DU PANCREAS**

Soutenue publiquement le 8 novembre 2005

**Membres du jury**

**Président du jury:** Michel DOFFOËL, Gastro-entérologie, Strasbourg

**Rapporteur interne:** Jean-Serge REMY, Chargé de Recherche, Strasbourg

**Rapporteur externe:** Juan IOVANNA, Directeur de Recherche INSERM, Marseille

**Rapporteur externe:** Philippe LEVY, Gastro-entérologie à l'Hôpital Beaujon, Paris

**Examineur:** Amor HAJRI, Chercheur à l'IRCAD, Strasbourg

**Directeur de thèse:** Marc APRAHAMIAN, Directeur de Recherche INSERM, Strasbourg

## Étude de nouvelles modalités multi-thérapeutiques et diagnostiques du cancer du pancréas.

Les études épidémiologiques montrent une augmentation de l'incidence des cancers digestifs dans le monde occidental. Quelles que soient les modalités thérapeutiques, leurs pronostics restent mauvais surtout dans le cas du pancréas dont la cancer est probablement l'une des tumeurs solides les plus agressives. La thérapie génique offre une autre alternative thérapeutique par rapport aux traitements standards et présente de nombreuses stratégies. Son usage permet également d'exalter les voies biochimiques induites lors de la chimio- et de la radiothérapie.

Dans ce travail, nous nous sommes fixés deux objectifs: l'un concerne la thérapie et l'autre, la détection et le diagnostic. Dans un premier temps, nous avons évalué *in vitro* et *in vivo*, le potentiel d'une combinaison de plusieurs gènes d'activation de prodrogues. L'obtention de résultats très concluants nous a conduit à combiner cette stratégie à des agents anti-cancéreux en vue de potentialiser leurs effets. Afin de répondre à certains aspects critiques de la thérapie génique tels que le transfert et l'efficacité du transgène, des techniques d'imagerie *in vivo* se sont progressivement imposées au cours de la décennie passée. Nous avons étudié la sensibilité et la spécificité d'un système d'imagerie moléculaire de fluorescence appliqué sur nos modèles *in vivo*. Par la suite, ce type de dispositif nous a permis de suivre en temps réel, l'efficacité et le ciblage thérapeutique d'une autre approche de la thérapie génique qui consiste à utiliser des gènes de la voie de l'apoptose. Nous avons pu constater un important effet antitumoral dû à la surexpression des gènes pro-apoptotiques, bax et TRAIL, et une synergie entre cet effet et le traitement à la gemcitabine.

Tous les résultats obtenus dans ce travail, suggèrent qu'une thérapie basée sur plusieurs gènes est très efficace et que sa combinaison avec la chimiothérapie présente des applications thérapeutiques intéressantes pour le cancer du pancréas, reconnu pour être un cancer très chimiorésistant.

**Mot clés :** Adénocarcinome pancréatique, Thérapie génique, Système gène suicide/prodrogue, Vecteurs de transfert, Ciblage, Promoteur spécifique, Imagerie optique moléculaire.

.....

### ***Study of new multi-therapy and diagnostic modalities of pancreatic cancer.***

The epidemiological studies show an increase in the incidence of the digestive cancers in the western world. Whatever are the therapeutic modalities, their prognosis remain bad especially for the pancreas, the cancer of which is probably one of the most aggressive solid tumors. Gene therapy offers an alternative to the current treatments and presents several therapeutic approaches. It may be also used to increase biochemical pathways induced by chemotherapy and radiotherapy.

The current work deals with two objectives: one related to gene therapy, the other to detection and the diagnosis. At first, we estimated *in vitro* and *in vivo*, the potential of a simultaneous combination of several genes of prodrug activation. The very decisive results incited us to combine this strategy to anti-cancer agents. To solve some critical aspects of gene therapy such as transfer and efficiency of transgene, the necessity of *in vivo* modalities of molecular imaging appeared during the last decade. We have investigated on our *in vivo* models the sensitivity and the specificity of a molecular imaging device. Then, such a device allowed us to follow in real time, the efficiency and the therapeutic targeting of another approach of gene therapy using genes implicated in the apoptose pathway. We were able to noticed in this way a strong antitumoral effect due to the surexpression of the pro-apoptotic genes, bax and TRAIL, and a synergy between this effect and gemcitabine treatment.

All the data of this study suggest that therapy based on several genes is very effective and that her combination with current chemotherapy presents many interesting therapeutic applications for pancreatic cancer, know as a very chemoresistant cancer.

**Keywords :** Pancreatic adenocarcinoma, Gene therapy, Gene directed enzyme/prodrug therapy, Transfer vectors, Targeting, specific promoter, Molecular optique imaging.

*Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés à l'Institut de Recherche contre les cancers de l'Appareil Digestif, IRCAD (Directeur Jacques Marescaux) à Strasbourg, au sein du laboratoire de Biologie des Tumeurs et de Thérapie génique, Unité 700 de l'INSERM sous la direction de Marc Aprahamian.*

*A mon président du jury,*

**M. Michel DOFFOËL,  
Praticien Hospitalier, Strasbourg**

*Je souhaiterais simplement vous remercier d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse.*

*A mes juges,*

*Je les remercie particulièrement pour avoir accepté de faire partie de mon jury.*

**M. Philippe LEVY,  
Professeur d'Université, Praticien Hospitalier, Paris**

**M. Juan IOVANNA,  
Directeur de Recherche INSERM, Marseille**

*Je vous remercie tous les deux d'avoir accepté avec gentillesse la tâche de rapporteurs externes et d'avoir jugé mon travail de thèse. Malgré vos emplois du temps chargés, vous étiez disponibles et je tiens à vous exprimer toute ma gratitude.*

**M. Jean Serge REMY  
Chargé de Recherche CNRS, Strasbourg**

*Je le remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Nous nous retrouvons cette fois, pour l'étape ultime de ce grade. Que vous soyez assuré de ma reconnaissance sincère.*

**M. Amor HAJRI,  
Chargé de Recherche, IRCAD, Strasbourg**

*Je lui exprime tous mes remerciements pour avoir toujours cru en moi durant toutes ces années, de sa détermination pour l'élaboration et la finalité de ce travail. Je lui exprime ma profonde gratitude pour son aide, toujours très précieuse qui met en valeur ce travail et pour l'attention qu'il m'a toujours apportée.*

*A mon directeur de thèse,*

**M. Marc APRAHAMIAN,  
Directeur de Recherche INSERM, Strasbourg**

*Je vous remercie d'avoir dirigé mes travaux durant ces trois années et pour sa totale confiance tout au long de ce travail.*

*Par ces quelques lignes, je souhaiterais remercier, tous les membres de toutes les équipes de l'institut pour leurs savoir et leur écoute durant les moments durs et les autres, un peu moins.*

*De par son éloignement certain, je souhaiterais remercier Sophie Deharvengt pour ses nombreux conseils et sa présence virtuelle. Ca y est, nous y sommes... enfin !!*

*Je remercie toutes les personnes qui ont participé à l'élaboration de ce manuscrit plus particulièrement, Amandine pour ses nombreuses relectures et corrections.*

*Je souhaiterais dédier cette thèse à mon grand-père qui n'a pas pu être là pour l'élaboration de celle-ci et surtout à ma soutenance. Juste avec ces mots, pour te dire que je suis arrivée à terminer ce travail et c'est grâce à toi.*

*Encore MERCI à tous ceux qui me sont chers et qui m'ont soutenue,*

*A mes parents, vous m'avez toujours accompagnée tout au long de mes études, je vous en remercie,  
A ma famille,*

*A mes amis.*

# RAPPEL DES ABBREVIATIONS

<b>ACE</b>	Antigène carcino-embryonnaire
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BET</b>	Bromure d'éthidium
<b>CAR</b>	Récepteur d'adénovirus de Coxsackie
<b>CAT</b>	Chloramphénicol acétyl transférase
<b>CMV</b>	Cytomégalovirus
<b>DMEM</b>	Milieu de culture de Eagle modifié par Dulbecco
<b>DMSO</b>	Diméthyl sulfoxyde
<b>dNTP</b>	Désoxynucléotides
<b>DO</b>	Densité optique
<b>DTT</b>	Dithioerythritol
<b>eCD</b>	Cytosine déaminase d' <i>E. Coli</i>
<b>EDTA</b>	Ethylène diamine tétracétate
<b>5-FC</b>	5-Fluorocytosine
<b>5-FU</b>	5-Fluorouracile
<b>GAPDH</b>	Glyceraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase
<b>GCV</b>	Gancyclovir
<b>GDEPT</b>	Gene directed enzyme/prodrug therapy
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein
<b>hTERT</b>	Promoteur spécifique de la sous-unité catalytique de la télomérase
<b>hsv-TK</b>	Thymidine kinase du virus de l'herpès simplex de type 1
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentration d'une drogue entraînant 50% d'inhibition de croissance
<b>IRM</b>	Imagerie par résonance magnétique
<b>MTT</b>	Sel de Metrotétrazolium
<b>PBS</b>	Phosphate buffer saline
<b>PCR</b>	Réaction de polymérisation en chaîne
<b>PEI</b>	Polyéthylénimine
<b>PET</b>	Tomographie d'émetteurs de positons
<b>RT</b>	Reverse Transcription
<b>SDS</b>	Sodium dodécyl sulfate
<b>S.e.m</b>	Erreur standard de la moyenne
<b>SVF</b>	Sérum de veau fœtal
<b>TAE</b>	Tris acétate EDTA
<b>Taq polymérase</b>	ADN polymérase de la bactérie <i>Thermophilus aquaticus</i>
<b>TCA</b>	Acide trichloroacétique
<b>TEP</b>	Tomographie d'émission de positrons
<b>TMD</b>	Tomodensitométrie
<b>TRAIL</b>	TNF-related apoptosis inducing ligand

# SOMMAIRE

## INTRODUCTION GENERALE

### I. LE CANCER

A. Généralités	page 1
1. Définition	
2. Evénements cellulaires et Cancer	
a. La Division Cellulaire	
b. L'Apoptose	
3. Anomalies génétiques et Cancer	
a. Les proto-oncogènes	
b. Les anti-oncogènes ou gènes suppresseur de tumeur	

B. Situation actuelle : Epidémiologie des cancers	page 4
---------------------------------------------------	--------

### II. LE CANCER DU PANCREAS

A. Le Pancréas	page 5
1. Anatomie	
2. Physiologie	
3. Fonctions	

B. Epidémiologie	page 6
1. Incidence	
2. Diversité du cancer du pancréas	

C. Symptômes et Diagnostic	page 7
1. Symptômes	
2. Diagnostic	

D. Génétique	page 9
1. Les anomalies génétiques très fréquentes	
a. Ras	
b. p16	
c. p53	
d. DPC4	
2. Les anomalies génétiques peu fréquentes	
a. BRCA2	
b. AKT2	
c. HER-2/neu	

### III. Les Traitements actuels

A. Traitements loco-régionaux	page 13
1. La Chirurgie	
2. La Radiothérapie	

B. Traitements systémiques	page 15
1. La Chimiothérapie	
a. Généralités	

- b. Chimiothérapie appliquée au cancer du pancréas
    - Le 5-Fluorouracil, le 5-FU
    - Une nouvelle génération de molécules anticancéreuses
  - c. La Chimiorésistance
2. Les autres Thérapies
- a. Immunothérapie
  - b. Les inhibiteurs de l'angiogenèse et des métalloprotéases
  - c. Les thérapies cellulaires complémentaires

### III. LA THERAPIE GENIQUE

#### A. Généralités

page 22

- 1. Origine & Définition
- 2. Méthodologie

#### B. Thérapie génique et Cancer

page 24

- 1. les gènes « médicaments »
  - a. Gènes de correction
    - L'approche antisens
    - Le remplacement des gènes suppresseur de tumeur
  - b. Gènes du système immunitaire
  - c. Gènes de sensibilité aux drogues
    - Généralités
    - L'effet Bystander
    - Les différents systèmes
      - ☛ Thymidine kinase du virus simplex de l'herpès/Gancyclovir
      - ☛ Cytosine Déaminase/5-Fluorocytosine
      - ☛ Purine Nucléoside Phosphorylase/Méthylpurine désoxyribose
  - d. Gènes de l'apoptose

#### 2. Le vecteur

page 36

- a. Les méthodes virales
  - ☛ Les rétrovirus
  - ☛ Les lentivirus
  - ☛ Les adénovirus
  - ☛ Les adéno-associated virus
  - ☛ Les parvovirus
- b. Les méthodes non virales
  - ☛ Les polymères
  - ☛ Les liposomes
- c. Les méthodes physiques
  - ☛ L'ADN nu
  - ☛ L'électroporation

#### 3. Le Ciblage

page 47

- a. Lors de l'introduction du gène
- b. Au niveau de l'expression du gène

### IV. DETECTION

#### A. Les moyens actuels

page 49

- 1. Echographie abdominale

2. Scanner ou Tomodensitométrie
3. Cholangiopancréatographie rétrograde endoscopique
4. Echoendoscopie
5. Imagerie par Résonance Magnétique
6. Cytoponction pancréatique

**B. De nouvelles technologies d'imagerie pour le petit animal** page 51

1. Imagerie par Rayons X
2. Imagerie Nucléaire
3. Imagerie par Ultrasons
4. Imagerie par Résonance Magnétique
5. Imagerie optique ou dans le domaine du visible

**SITUATION & OBJECTIFS du travail** page 60

**RESULTATS SUR PRESENTATION DE QUATRES PUBLICATIONS**

**CHAPITRE I. Etude d'une approche multi-génique** : combinaison de deux systèmes d'activation de prodrogues hsv-TK/GCV & eCD/5-FC page 64

ARTICLE 1 Combined suicide gene therapy for pancreatic peritoneal carcinomatosis using BGTc liposomes

**CHAPITRE II. Etude d'une approche multi-thérapeutique et multi-génique** : combinaison d'une stratégie de thérapie génique avec la chimiothérapie page 70

ARTICLE 2 Suicide gene therapy of pancreatic adenocarcinoma in combination with chemotherapy using HSV-TK/GCV and *E.coli* CD/5-FC with the chemotherapeutic agents, Tomudex and Gemcitabine

**CHAPITRE III. Etude d'un système d'imagerie moléculaire de fluorescence** page 75

ARTICLE 3 Feasibility, Sensitivity, and Reliability of Laser-Induced Fluorescence Imaging of Green Fluorescent Protein-Expressing Tumors *in Vivo*

**CHAPITRE IV. Etude d'une approche multi-thérapeutique et multi-génique** : combinaison d'autres gènes thérapeutiques avec la chimiothérapie page 81

ARTICLE 4 Combination and real time imaging of Bax & TRAIL Gene Therapy and Chemotherapy for the Treatment of Pancreatic Cancer

**DISCUSSION GENERALE** page 88

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

**ANNEXES**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS**

*INTRODUCTION*

*GENERALE*

# I. LE CANCER

## A. Généralités

### 1. Définition

Le cancer est une maladie du fonctionnement même de nos cellules qui, progressivement, perdent le contrôle de leur prolifération, deviennent immortelles et se développent de manière anarchique dans l'organisme.

Avec peu d'exceptions, les cancers sont dérivés des cellules somatiques et de leur progéniture. Dans le clone néoplasique naissant, les cellules accumulent une série de changements génétiques ou épigénétiques qui mène aux changements de l'activité du gène incriminé, et ainsi à des phénotypes altérés sujets à une sélection [Nowell 1974]. Finalement, une population évoluée de cellules peut échapper aux contrôles normaux de la prolifération cellulaire et de l'organisme dans sa globalité pour devenir un cancer (Figure 1).

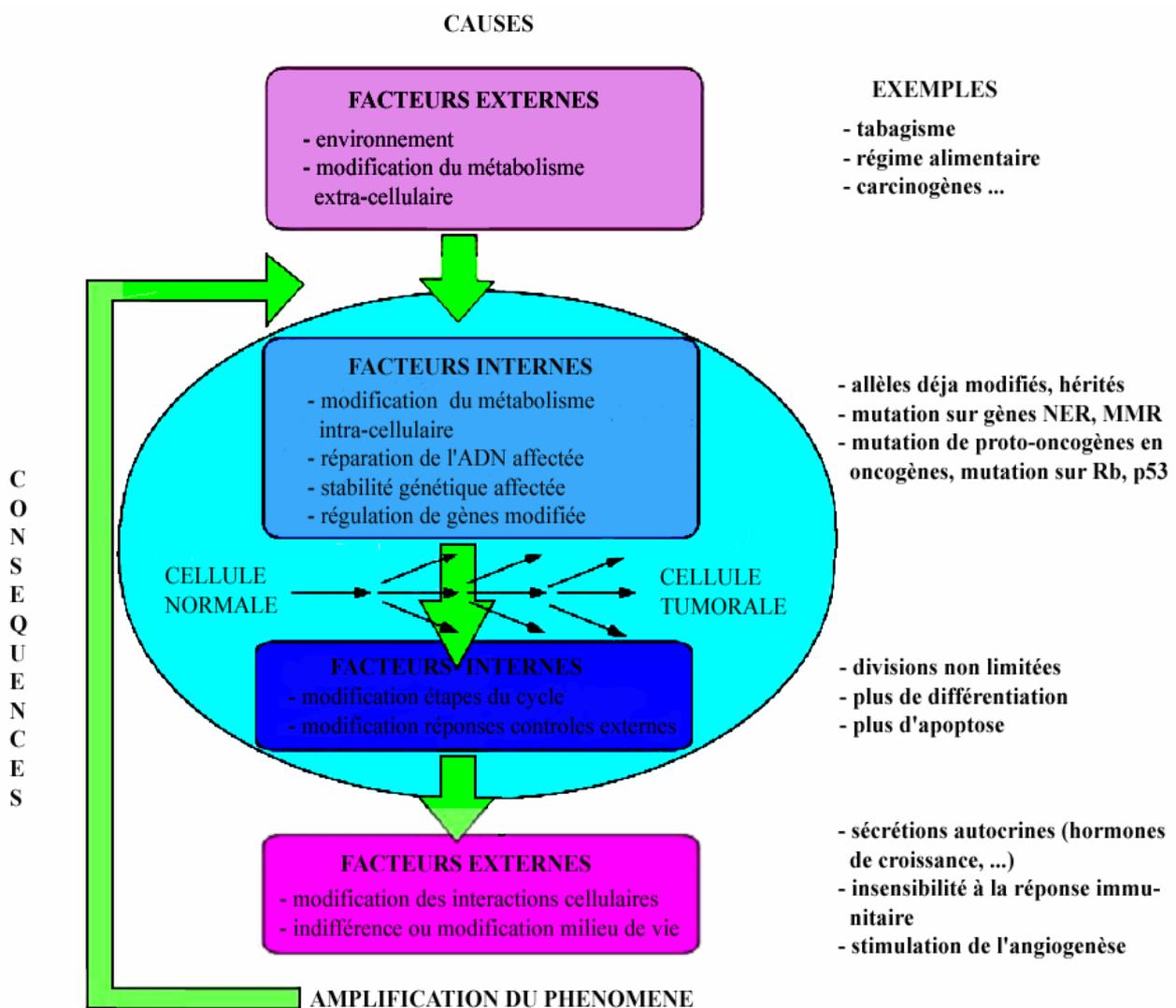


Figure 1. Interactions entre les facteurs internes et externes dans le développement de tumeur.

Hanahan et Weinberg [2000] ont identifié six « propriétés » distinctes propres au phénotype cancéreux : la négligence des signaux d'arrêt de la prolifération et de la différenciation cellulaire, la capacité à une prolifération soutenue, une échappée à la voie de l'apoptose, l'invasion vers d'autres tissus et l'angiogénèse.

## 2. Événements cellulaires et Cancer

La croissance cellulaire est, à l'état normal, régulée par les besoins de l'ensemble des organes. Les cellules tumorales mènent quant à elles une existence indépendante des nécessités de l'organisme. Elles évoluent pour leur propre compte, ne répondent plus aux stimuli physiologiques, prolifèrent, forment des tumeurs en envahissant leur tissu d'origine, et détruisent l'architecture des tissus sains adjacents pour finalement, essaimer à distance d'autres organes en formant des métastases.

L'oncogénèse est la succession d'étapes qui aboutit à la transformation d'une cellule normale en une cellule maligne. Elle résulte d'un excès de division cellulaire et d'un défaut de la mort cellulaire programmée ou apoptose par mutation de différents gènes comme les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Afin de mieux comprendre ce processus complexe, quelques précisions concernant les événements cellulaires essentiels au bon fonctionnement de la cellule mais dérégulés dans une cellule cancéreuse sont précisés ci-après (Figure 2).

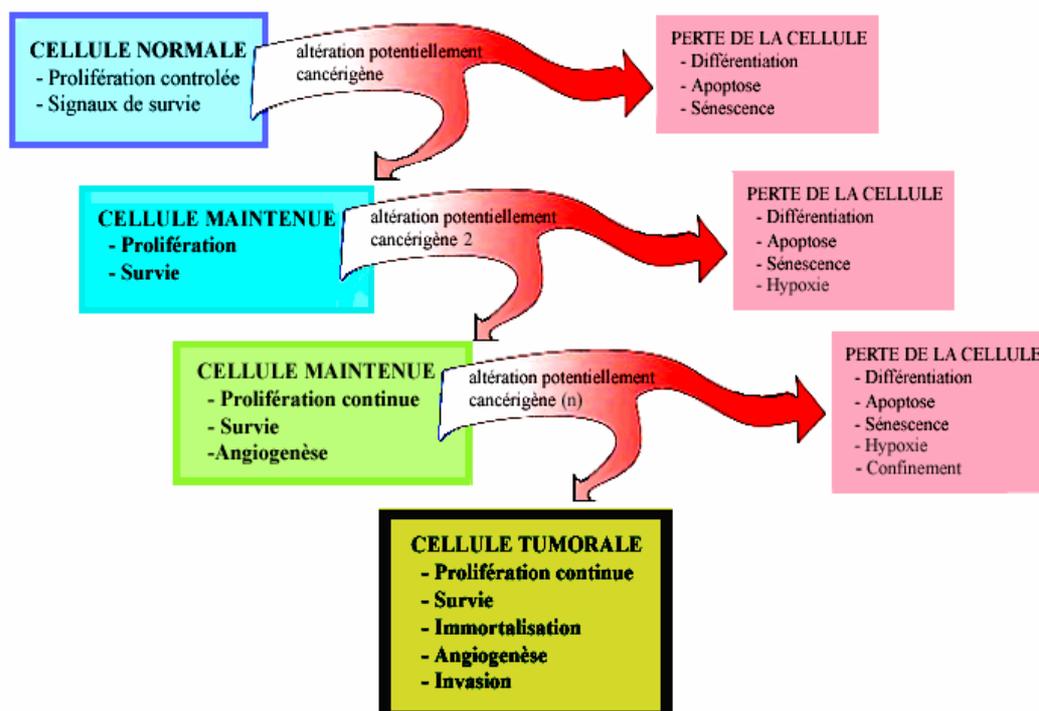


Figure 2. Cascade d'événements conduisant à la formation d'une tumeur.

## a. La Division Cellulaire

La vie d'une cellule est rythmée de manière cyclique par quatre événements principaux : la phase G1 où la cellule effectue sa croissance, intègre les signaux mitogènes ou anti-mitogènes et se prépare pour la phase S où se produit la réplication de l'ADN, la phase G2 durant laquelle la cellule se prépare à la phase M, c'est-à-dire la mitose.

Une telle organisation lui permet de synthétiser les éléments nécessaires à sa survie et de se préparer à une division cellulaire équitable. La coordination de ces étapes se fait par l'intermédiaire de facteurs régulateurs que sont les cyclines et les kinases dépendantes à ces cyclines ou CDK. Les CDK ne sont actives que liées aux cyclines et assurent ainsi la transition d'une étape à l'autre du cycle. Il existe en plusieurs endroits du cycle cellulaire des « points de contrôle » où plusieurs molécules vérifient que la réplication est bien terminée au moment d'entrer en mitose et/ou qu'aucune lésion du matériel génétique n'est apparue. Si une anomalie est décelée, ces protéines arrêtent le cycle cellulaire et orientent la cellule soit vers un système de réparation soit vers un processus d'apoptose.

## b. L'Apoptose

Dans un organisme pluricellulaire, l'apoptose, événement intracellulaire sous contrôle génétique, régule l'homéostasie tissulaire, élimine les cellules lésées tumorales ou infectées par un virus et intervient également lors de l'embryogenèse pour la formation des différents organes [Verhagen 1999]. Cette mort cellulaire joue donc un rôle fondamental dans le maintien de l'intégrité de l'organisme et son dérèglement a été identifié dans de nombreux processus pathologiques. Une activation en cascade de protéases à cystéine -les caspases- conduit au clivage de divers substrats protéiques essentiels à la survie cellulaire et permet l'amplification d'un signal de mort provenant principalement de deux voies :

- L'une engendrée au niveau de la membrane plasmique par des récepteurs, membres de la famille du Tumor Necrosis Factor Receptor ou TNFR ; voie extrinsèque de l'apoptose

- L'autre déclenchée par des protéines relarguées par les mitochondries ; voie intrinsèque de l'apoptose.

Pour chacune de ces voies, les mécanismes d'intégration des signaux s'établissent au niveau d'un complexe multiprotéique, respectivement le Death Inducing Signaling Complex, ou DISC pour la voie extrinsèque et l'apoptosome pour la voie intrinsèque. C'est en agissant sur la formation et/ou sur l'activité de ces complexes que la plupart des modulateurs de la mort

cellulaire exercent leur action. Ce mécanisme faisant partie intégrale de mon travail sera développé ultérieurement dans le paragraphe concernant la thérapie génique, page 34.

### 3. Anomalies génétiques et Cancer

Le point de départ du processus de cancérisation est l'altération du matériel génétique d'une cellule. Toutes les mutations ne sont toutefois pas susceptibles d'entraîner la formation d'un cancer. Un des gènes qui régule les mécanismes vitaux de la cellule comme la division, la différenciation, la réparation au niveau de l'ADN ou l'apoptose, doit être « touché ». De plus, une seule mutation n'est pas suffisante pour transformer une cellule saine en cellule cancéreuse. La carcinogenèse est un processus à multi-étapes dans lequel les cellules normales acquièrent une malignité complète. Ces incidents donnent lieu conjointement à **l'activation d'un oncogène**, provoquant une prolifération incontrôlée de la cellule et à **l'inactivation d'un gène** supresseur de tumeur qui déjoue l'élimination par apoptose, des cellules endommagées [Busch 1984, Weinberg 1984].

Les principaux gènes impliqués dans le phénomène de cancérisation sont les proto- et les anti-oncogènes.

#### a. Les Proto-oncogènes

Ces gènes codent pour des protéines de fonctions variées favorisant la croissance cellulaire. Un grand nombre d'entre elles sont des facteurs de transcription, des effecteurs intracellulaires de la transmission du signal telles que les protéines G (de la famille de Ras) et les tyrosines kinases. D'autres jouent un rôle dans la prolifération et la survie cellulaire comme la protéine anti-apoptotique bcl-2 mais aussi des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine. Par différents mécanismes, l'activation inappropriée des proto-oncogènes en oncogènes peut mener à un cancer. Ainsi, il y a **gain de fonction** du gène par rapport à sa forme inactivée dans les cellules normales.

#### b. Les Anti-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs

Ces gènes codent pour des protéines capables d'induire l'arrêt du cycle cellulaire, la différenciation post-mitotique et l'orientation irréversible vers la voie de l'apoptose. La mutation de ces gènes, liée cette fois à une **perte de fonction**, entraîne l'arrêt du contrôle du cycle cellulaire. Ainsi les cellules ayant un matériel génétique modifié ne seront ni réparées, ni dirigées vers l'apoptose et se diviseront de façon anarchique et indépendante de l'organisme.

Ce type de mutations « perte de fonction » est plus commune que celui « gain de fonction » dans les prédispositions non héritées car ces premières sont masquées par l'allèle normal restant durant le développement (à l'exception des déficiences récessives au niveau de la réparation de l'ADN) alors que la mutation « gain de fonction » peut être létale.

Ainsi en résumé, la transformation cancéreuse d'une cellule nécessite plusieurs modifications génétiques au niveau de plusieurs types de gènes:

- Activation des proto-oncogènes → Excès de la division cellulaire
- Inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs → Défaut de l'apoptose.

## B. Situation actuelle

Le cancer est une maladie en croissante évolution. Il représente un véritable problème de santé publique et reste, dans la plupart des cas, incurable. La France affiche la plus mauvaise mortalité en Europe liée au cancer, en raison des comportements à risque (tabac, alcool, maladies professionnelles) et de la faiblesse de la prévention [Launoy 1992].

D'un point de vue épidémiologique, la France connaît une augmentation considérable de l'incidence des cancers ; environ 3 millions de personnes meurent d'un cancer chaque année, 800000 personnes vivent avec un cancer et 2 millions de personnes ont eu un cancer. Sur les 3 millions de nouveaux cas diagnostiqués en 2000, environ 1 million touchaient les organes digestifs : avec une survie de 50% pour les cancers du colon, de l'estomac et l'œsophage et de 5-10% pour les cancers du pancréas et du foie [INSERM, Service Commun n°8, service d'information sur les causes médicales de décès]. Les trois premiers cas présentent la particularité d'être en diminution dans les pays occidentaux contrairement aux cancers du colon et du pancréas. Le cancer du colon est la deuxième cause de mortalité par cancer en France. L'adénocarcinome primitif représente à lui seul 60% des cancers colorectaux. Le cancer du pancréas est en progression constante dans la plupart des pays développés, il est responsable de 7000 décès chaque année en France.

La suite de ce travail se focalisera essentiellement sur le cancer du pancréas, une affection fréquente et surtout mortelle qui nécessite de la part des chercheurs un acharnement à découvrir de nouvelles thérapies et à optimiser les thérapeutiques actuelles.

## II. LE CANCER DU PANCREAS

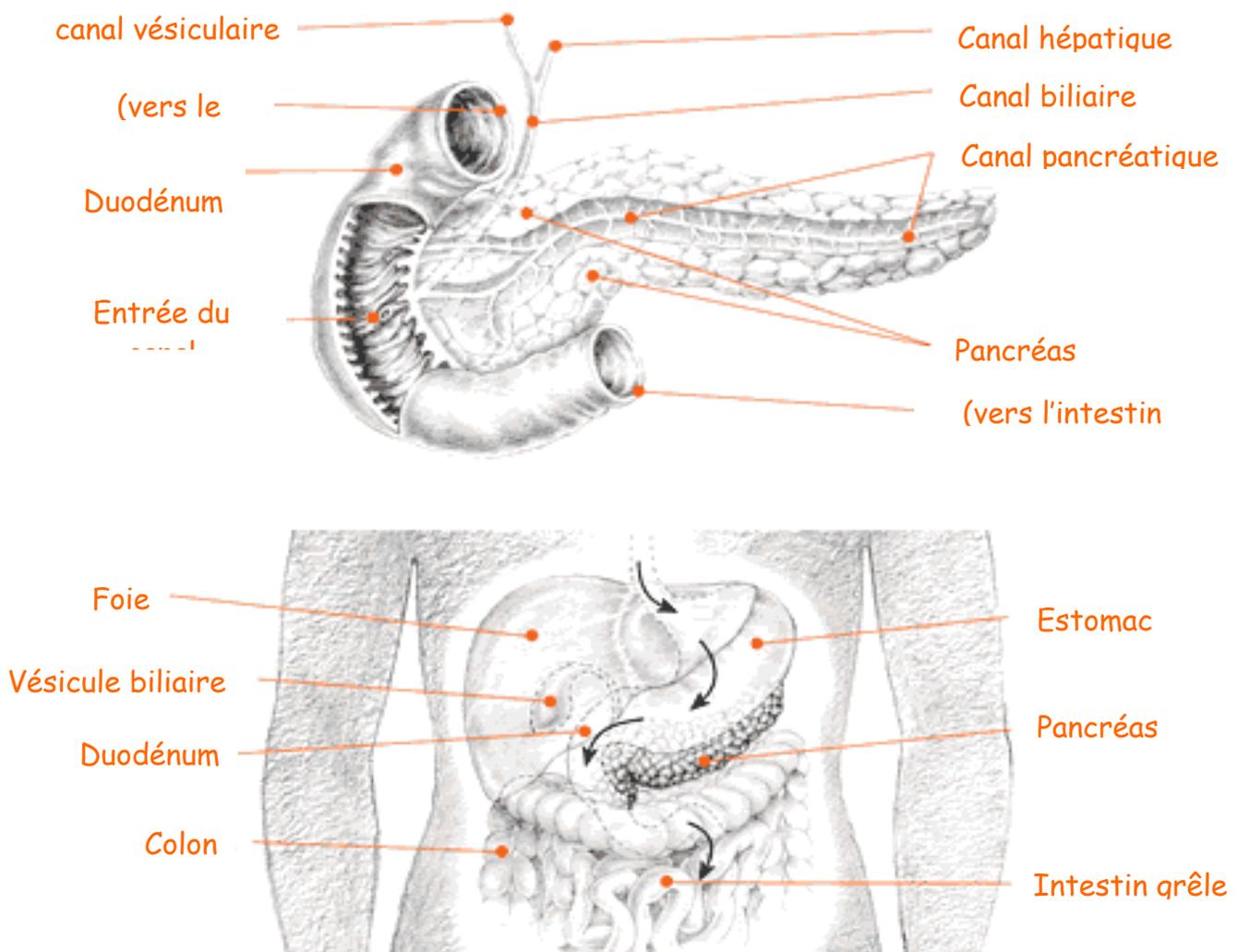
### A. Le Pancréas

Nous nous limiterons dans ce chapitre à un rappel non exhaustif des données anatomiques et physiologiques classiques concernant cet organe.

#### 1. Anatomie

Le pancréas est un organe situé au niveau de la cavité abdominale, en position dorsale profonde, à cheval sur les étages sus et sous mésocoliques. D'aspect compact et lobuleux, il est enveloppé d'une capsule bien individualisée. Il est allongé transversalement dans l'abdomen en avant des gros vaisseaux prévertébraux et du rein gauche.

Située entre les quatre segments du duodénum, la tête constitue la partie la plus volumineuse de cet organe (Figure 3).



**Figure 3.** Situation et rapports anatomiques du pancréas chez l'homme.

Elle est unie par un isthme au corps du pancréas qui est aplati dans le plan sagittal et légèrement oblique. Le corps est en continuité avec la queue, portion terminale, la plus petite de l'organe qui est en rapport intime avec la rate.

## 2. Physiologie

Le pancréas des mammifères est composé à 99% par le tissu exocrine et à 1% du tissu endocrine. C'est une glande à sécrétion externe et interne assurant une double fonction :

- ✓ Au niveau de la digestion des aliments par sa sécrétion exocrine,
- ✓ Au niveau du métabolisme des glucides par ses sécrétions endocrines.

Le pancréas exocrine est constitué essentiellement de deux types de cellules : les cellules acineuses qui représentent plus de 80% des cellules de la glande et les cellules canalaire et centro-acineuses. Les cellules acinaires sont groupées en acinis sécréteurs de type séreux disposés en grappes. La base des cellules repose sur une fine membrane réticulaire et leur sommet convergent vers une lumière centrale. C'est de cette lumière centro-acineuse que partent les voies excrétrices intra- puis interlobaires aboutissant aux canaux de Wirsung et de Santorini, qui acheminent la sécrétion externe du pancréas vers le duodénum.

Le pancréas endocrine est composé de quatre types cellulaires. Les cellules  $\alpha$  sécrétrices de glucagon représentant 15 à 20% de la population endocrine totale sont situées en périphérie de l'îlot de Langerhans. Les cellules  $\beta$  formant la masse de l'îlot représentent 60 à 80% de la population endocrine et sécrètent l'insuline. Les cellules  $\delta$  dites à somatostatine représentent 5% de cette même population. Le dernier type cellulaire, les cellules PP peu nombreuses sécrètent le polypeptide pancréatique. L'ensemble des cellules endocrines entretient des contacts directs avec les cellules environnantes. Il s'agit la plupart du temps de régulation paracrine très importante dans les différentes fonctions physiologiques.

## 3. Fonctions

La sécrétion exocrine correspond au suc pancréatique contenant trois catégories d'enzymes (amylase, lipase et enzymes protéolytiques). Cette sécrétion obéit à une double commande : nerveuse et peptidique. Ainsi l'arrivée du bol alimentaire dans le duodénum a pour effet de déclencher la sécrétion par ce dernier de deux hormones, la sécrétine et la cholécystokinine qui stimulent respectivement la sécrétion électrolytique et enzymatique du pancréas exocrine.

Le sécrétion endocrine est constituée majoritairement de deux hormones jouant un rôle primordial dans la régulation du métabolisme glucidique : l'insuline, hormone hypoglycémiante et le glucagon, hormone hyperglycémiante, synthétisées par les cellules  $\alpha$  et  $\beta$  des îlots de Langerhans.

Le pancréas, par ces deux fonctions, joue un rôle capital dans le système digestif. Ainsi, il est amené constamment à maintenir son intégrité afin d'assurer ses fonctions physiologiques dans les processus digestifs.

## B. Epidémiologie

### 1. Incidence

Le cancer du pancréas représente 3% de l'ensemble des cancers et 10% des cancers digestifs. Ces chiffres placent ce cancer au 4<sup>ème</sup> rang des cancers digestifs en terme d'incidence. Cette incidence a augmenté de façon régulière au cours des 25 dernières années et elle est maximale entre 50 et 80 ans. Chez l'homme, il se classe au 5<sup>ème</sup> rang des cancers en terme de mortalité, après les cancers du poumon (cancer du sein pour la femme), du côlon, du rectum et enfin de la prostate (cancer de l'utérus pour la femme). Cette maladie est responsable d'environ 7000 décès par an et depuis 20 ans, ce chiffre ne cesse d'augmenter [INSERM, Service Commun n°8]. Le taux de survie global à 5 ans est inférieur à 3% et la plupart des patients porteurs d'un tel cancer décèdent dans les 6 mois suivant le diagnostic. Même dans le cas des formes résécables (soit entre 10% et 20%), la survie à 5 ans n'est au maximum que de 10% et elle devient nulle en cas de cancer généralisé. Tous ces chiffres soulignent bien la gravité de la situation pour cette maladie.

### 2. Diversité du cancer du pancréas

L'adénocarcinome ductal (cancer exocrine) est de loin le plus commun des néoplasmes pancréatiques et constitue environs 90% des tumeurs pancréatiques. Le spectre histopathologique inclue aussi des tumeurs mucineuses papillaires intraductales, des néoplasies intraépithéliales, des cancers pancréatiques familiaux et des tumeurs endocrines. Mais ces dernières sont rares avec une incidence estimée entre 1 et 5 par million d'habitants par an, représentant moins de 1% de tous les néoplasmes pancréatiques [Cowgill 2003]. Dans 70% des cas, les tumeurs sont situées au niveau de la tête du pancréas, alors que 20% siègent dans le corps et 10% dans la queue.

Les métastases issues du cancer du pancréas se retrouvent majoritairement dans les ganglions lymphatiques de drainage à proximité. La migration cellulaire peut se faire vers d'autres ganglions et/ou d'autres tissus tels que le foie ou les poumons mais elle peut s'étendre aussi dans la cavité péritonéale.

## C. Symptômes et Diagnostic

### 1. Symptômes

Les symptômes du cancer du pancréas ressemblent beaucoup à ceux d'autres désordres digestifs tels que la pancréatite chronique, l'hépatite, la hernie hiatale, les calculs biliaires et le diabète. En l'absence d'une symptomatologie spécifique, son diagnostic reste très difficile. C'est pour ces raisons que le cancer du pancréas est parfois appelé « maladie silencieuse ».

Dans un premier temps, le patient peut se plaindre de malaises vagues. Mais il ignore souvent ces derniers signes prématurés, parfois pendant plusieurs mois. La douleur est le symptôme le plus commun de l'un ou l'autre type de cancers pancréatiques. La douleur augmente graduellement mais souvent elle ne siège pas au niveau du bas ventre, élément qui peut induire en erreur le clinicien et retarder le bon diagnostic. Une perte de poids se produit pour la majorité des patients, elle peut-être rapide même si la personne garde un bon appétit et mange normalement. Les habitudes digestives peuvent également être modifiées par des troubles du transit.

### 2. Diagnostic

Les symptômes deviennent plus prononcés au décours de la progression de la maladie. Le diagnostic repose sur l'association de deux éléments : l'altération de l'état général et l'imagerie médicale qui fera l'objet d'un chapitre spécifique.

Mais la nécessité de disposer d'outils diagnostiques plus sensibles et beaucoup plus précoces, a sous tendu une recherche d'identification au niveau moléculaire de marqueurs tumoraux. Il s'agit de substances, présentes chez le sujet sain mais à des taux très faibles, qui sont libérées dans le sang par les cellules tumorales et témoignent donc de leur présence dans l'organisme. Ces molécules sont détectables et dosables par les méthodes analytiques plus ou moins sophistiquées selon leur concentration. Il convient de préciser que cette définition des marqueurs tumoraux diffère de celle des anatomo-pathologistes pour lesquels

ce type de marqueurs est détecté au niveau du tissu tumoral proprement dit par l'examen histologique ou cytologique.

L'intérêt d'un dosage des marqueurs tumoraux est double, à la fois sur le plan diagnostique dans le cadre d'un bilan initial de patients sans symptôme précis de cancer que sur le plan pronostic, la modification du taux sérique du marqueur permettant souvent de suivre l'évolution du cancer sous traitement. La disparition du marqueur conforte l'hypothèse d'une rémission complète, cependant qu'une remontée ultérieure fait craindre une récurrence. Les marqueurs permettent ainsi de piloter le traitement et incitent à rechercher une lésion résiduelle si, à la fin de la thérapeutique, leurs taux restent anormalement élevés, et/ou à rechercher une récurrence s'ils s'élèvent à nouveau.

En ce qui concerne le cancer du pancréas seront recherchés des marqueurs tels que :

◆ Carbohydre Antigen ou CA 19-9 : Il est élevé dans 80% des cas. C'est le marqueur le plus utilisé, surtout lors de la surveillance évolutive. Son élévation a une valeur pronostic.

◆ Antigène carcino-embryonnaire ou ACE : Cette protéine est présente chez le fœtus et son expression augmente en cas de dédifférenciation cellulaire (en particulier lors de certains cancers). L'ACE est élevé dans 60-70% des cas. Il n'a pas de valeur diagnostique car son dosage est en effet peu sensible et non spécifique, mais il présente un intérêt dans la surveillance.

◆ DUPAN 2 : élevé dans 94% des cas. Son intérêt est en cours d'évaluation.

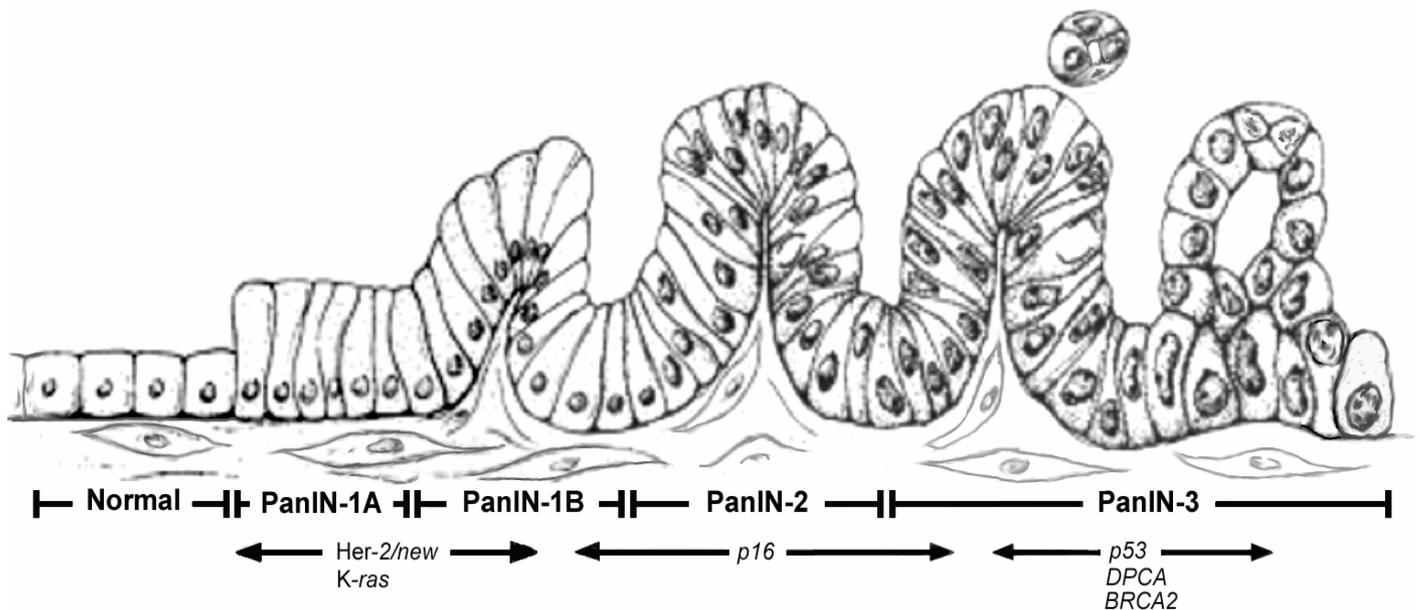
◆ K-ras : oncogène muté dans 80-90% des cancers. Il présente un réel intérêt diagnostique. Cette mutation est recherchée dans le suc pancréatique ou dans le produit de brassage du canal pancréatique.

## D. Génétique

L'application des techniques biologiques modernes à l'étude du cancer au cours de cette dernière décennie a amené à le définir comme une maladie génétique [Kern 1998]. Le cancer du pancréas se situe parmi le mieux caractérisé au niveau génétique. Le développement des carcinomes pancréatiques exocrines a été mis en relation avec l'activation de l'oncogène K-ras et l'inactivation de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs incluant p16, p53 et smad4/DPC4 [Schneider 2003].

## 1. Les Anomalies Génétiques très fréquentes

Le cancer du pancréas présente l'incidence la plus élevée pour les mutations de ras identifiées jusqu'ici dans les tumeurs humaines [Almoguera 1988]. Ces mutations sont généralement situées au niveau du codon 12. En fonction de la technique utilisée, la fréquence de cette mutation varie de 20 à 100% [Caldas 1995, Longnecker 1998] et se produit rapidement dans le modèle de progression de la tumeur pancréatique établi par Hruban en 2000 et présenté en *Figure 4*.



**Figure 4.** Modèle de progression pour le cancer du pancréas.

L'épithélium normal évolue en cancer infiltrant (gauche à droite) suivant une série de précurseurs définis histologiquement. La surexpression de HER-2/*neu* et les mutations ponctuelles au niveau du gène K-ras se produisent très tôt dans ce modèle, l'inactivation du gène p16 se fait à une étape intermédiaire et celle des gènes p53, DPC4 et BRCA2 plus tard. (PanINs pour Pancreatic intraepithelial neoplasia).

### a. Le gène ras

Les gènes de la famille de ras codent pour des petites protéines cytoplasmiques GTP-liantes de 21 kDa (Ki-Ras, Ha-Ras et N-Ras) et elles sont impliquées dans de nombreux mécanismes tels que la prolifération, la survie et la migration cellulaire [Shields 2000]. Elles oscillent entre deux états : une forme active, liée au GTP, et une forme inactive, liée au GDP. Ainsi, ces protéines jouent un rôle essentiel entre le stimulus externe provoqué par les facteurs de croissance et la transcription. Des mutations de cet oncogène ont été trouvées à tous les niveaux d'anaplasie ductale et son altération est présente au cours des premiers événements de la cancérisation [Kalthoff 1993].

Des études sur des mutations de K-ras dans un modèle d'adénocarcinome ductal chimiquement induit chez le hamster ainsi que sur des lésions pré-néoplasiques confirment cette assertion [Cerny 1992]. Toute altération de ce gène, provoquant une stimulation non contrôlée de cette protéine, peut en effet jouer un rôle essentiel dans la cancérogenèse.

### b. Le gène p16

Le gène p16 produit une protéine de 16 KDa qui inhibe la formation du complexe cycline D/CDK4 qui a pour fonction de phosphoryler la protéine du rétinoblastome ou Rb [Sherr 1996]. La perte de fonction du gène p16 a pour conséquence la libération des facteurs de transcription activés et la progression du cycle cellulaire par le point de contrôle G1/S. La protéine P16 présente donc un rôle important en empêchant le déclenchement de la prolifération cellulaire et serait donc un gène suppresseur de tumeur.

L'abrogation de la voie Rb/p16 pourrait être un mécanisme important dans le développement de beaucoup de cancers humains [Kamb 1994, Nobori 1994]. Cette voie est une composante bien décrite de la régulation du cycle cellulaire et son inactivation peut se produire par des modifications au niveau des gènes Rb, CDK4, cycline D ou p16. Ces changements se produisent exclusivement sur l'un ou l'autre de ces gènes. Ceci indique qu'un seul événement est nécessaire pour générer la suppression de cette voie.

Des modifications fréquentes du gène p16 ont été décrites dans de nombreux cancers humains et les mécanismes de son inactivation entraînent une suppression homozygote, une mutation et la méthylation anormale des îlots CpG. Beaucoup d'études suggèrent un rôle significatif de l'inactivation de p16 dans le développement du cancer du pancréas [Caldas 1994, Huang 1996]. Liu et coll. [Liu 1995] ont identifié des mutations de p16 dans 50% et des délétions homozygotes dans 30% des dix lignées cellulaires du cancer du pancréas humain. L'identification des délétions fréquentes (41%) et des mutations (38%) dans les tumeurs pancréatiques primaires indique que ces modifications sont beaucoup plus associées à la carcinogenèse qu'au phénomène d'immortalisation dans les cultures cellulaires. Les études suivantes ont confirmé la présence de l'inactivation du gène p16 par délétion homozygote ou par mutation dans 27 à 82% des tumeurs primaires. Quand la méthylation des îlots CpG est prise en considération, 98% des cancers pancréatiques montrent une abrogation de la voie Rb/p16 par une inactivation potentielle du gène p16 [Schutte 1997]. La confirmation immunohistochimique de la perte de l'expression du gène p16 dans les tumeurs affectées indique que ces événements génétiques ont une signification fonctionnelle. De récentes études ont

démonstrées que la transfection des cellules tumorale par la forme sauvage du gène p16 entraîne une diminution de la prolifération tumorale à la fois *in vitro* et *in vivo* [Kobayashi 1999, Ghaneh 2001].

### c. Le gène p53

Le gène p53 code pour une phosphoprotéine nucléaire de 393 acides aminés qui est encore appelé « le gardien du génome ». Elle protège la cellule des réarrangements génomiques ou de l'accumulation de mutations et supprime la transformation cellulaire due à l'activation d'oncogènes ou à la perte de la voie suppressive de tumeur. Le vaste spectre des effets biologiques de la protéine P53 sous sa forme active, tétramérique, s'explique en partie par sa capacité d'activer l'expression de nombreux gènes régulateurs du cycle cellulaire parmi lesquels p21 (WAF-1) qui est un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines nécessaires à la transition du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S, GADD45, les membres de la famille 14-3-3 sigma et bien d'autres [Oren 2003]. La protéine P53 peut provoquer un arrêt prolongé du cycle cellulaire en phase G1 afin de permettre la réparation de l'ADN en évitant ainsi le passage de mutations néfastes aux cellules filles [Flatt 2000]. Si ces altérations ne sont pas réparables, la protéine P53 peut alors induire l'apoptose en agissant sur les gènes faisant partie de cette voie tels que bcl-2, gène anti-apoptotique ou le gène pro-apoptotique bax ou un récepteur de mort du ligand TRAIL ; (DR5), Cd95 et Rpr. Il semble exister dans les cellules aussi bien des caractéristiques propres d'expression de la protéine P53 que des sensibilités différentes à des effets variés pro-apoptotiques.

Le gène suppresseur de tumeur p53 est muté, particulièrement par des mutations de missense dans les séquences codant pour le domaine de liaison à l'ADN de la protéine P53, dans plus de 50% des adénocarcinomes pancréatiques. Les mutations sont souvent accompagnées de la perte de l'allèle sauvage et se produisent plus tardivement dans le modèle de carcinogenèse [Boschman 1994, Rozenblum 1997, Apple 1999]. Les cellules tumorales ayant une protéine P53 mutée ne sont plus capables d'assurer le maintien de l'intégrité génétique, car la cellule ne reçoit plus de signal d'arrêt de division. On se trouve donc en présence d'une cellule ayant une importante instabilité génétique permettant l'émergence de clones cellulaires de malignité accrue. Il a été montré que certains mutants peuvent abroger les fonctions de P53 sauvage d'une façon négative dominante.

Cet effet peut aussi varier en fonction du type de mutation de p53 et de la lignée tumorale. Une surexpression de P53 mutée peut aussi résulter de l'induction d'un certain nombre de

gènes tels que MDR-1, PCNA, VEGF, EGFR, IL-6, HSP-70 et b-FGF. Plus récemment, il a été démontré que certaines formes mutées dérivées de tumeurs contrôlent l'activation de cibles cellulaires endogènes aptes à promouvoir la tumorigénicité tel que c-myc ou K-ras et sont responsables d'une instabilité génétique en perturbant le système de contrôle de la mitose [Scarpa 1993, Pellegata 1994].

#### d. Le gène DPC 4

Le gène DPC 4 pour Deleted in Pancreatic Cancer locus 4, est muté dans environ 50% des cancers du pancréas [Wilentz 2000]. Il est localisé sur le bras long du chromosome 18 non loin du gène « Deleted in Colon Cancer » ou DCC, impliqué dans les cancers coliques.

Ce gène, nommé aussi smad4, est identifié comme un candidat gène suppresseur de tumeur. Ce facteur de transcription est un régulateur important de la voie de signalisation du « Transforming growth Factor beta » ou TGF- $\beta$  [Feng 1998]. L'activité biologique majeure du TGF- $\beta$  est l'inhibition du cycle cellulaire, par l'arrêt en phase G1, pour un grand nombre de cellules. Ce fait permet de comprendre tout l'intérêt suscité par la découverte de cette nouvelle protéine qui agit habituellement en déclenchant la différenciation et en ralentissant la croissance cellulaire [Peterson 1995, Zhou 1998].

## 2. Les Anomalies Génétiques peu fréquentes

#### a. Le gène BRCA2

Le gène BRCA2, localisé sur le chromosome 13q, code pour une protéine nécessaire pour assurer la maintenance de la stabilité génomique en régulant les procédés de réparation de l'ADN. Les cellules normales déficientes de ce gène, accumulent des aberrations chromosomiques létales [Venkitaraman 2002]. Les mutations BRCA2 non héritées augmentent le risque du cancer du pancréas à un âge identique [Goggins 1996, Ozcelik 1997]. Dans les cancers pancréatiques sporadiques, BRCA2 est inactivé dans environ 7% à 10% des cas. Son inactivation a été démontrée récemment dans une lésion ductale. La mutation de BRCA2 se produirait donc tardivement au cours de la progression néoplasique du pancréas [Hruban 2000].

#### b. Le gène AKT2

La sérine-thréonine kinase AKT2 est un oncogène candidat pour le cancer pancréatique humain et il a été trouvé amplifié et surexprimé dans plus de 20% des adénocarcinomes pancréatiques et des lignées cellulaires [Cheng 1996, Ruggeri 1998]. AKT2 est un effecteur en aval des Phosphatidylinositol 3-kinase et peut-être activé par l'Epidermal Growth Factor

(EGF), le Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), et le Fibroblast Growth Factor (FGF) ; tous ces facteurs sont connus pour être surexprimés dans le carcinome pancréatique [Franke 1995, Lohr 1996]. Récemment, cette voie de signalisation a été mise en relation avec l'expression du récepteur Insulin-like Growth Factor I (IGFR I), donnant lieu au phénomène d'invasion des cellules cancéreuses.

#### c. Le gène HER-2/neu

Les cancers du pancréas présentent fréquemment une augmentation de l'expression HER-2/neu ou Erb2 qui est un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase [Day 1996] aussi bien que ses ligands de la famille de l'EGF incluant le Tumor Growth Factor alpha ou TGF  $\alpha$  [Yamanaka 1993]. La dimérisation d'Erb2 avec un autre membre de la famille des récepteurs de l'EGF suite à la liaison du ligand, favorise la prolifération et la survie des cellules [Olayioye 2000]. De plus, l'implication d'autres facteurs de croissance mettant en jeu le FGF, l'insuline et le TGF- $\beta$  a été décrite dans le cancer du pancréas [Korc 1998]. L'effet combiné de ces molécules contribuerait à l'agressivité de ce cancer.

### III. Les Traitements actuels

Malgré les fortes similitudes existantes dans les approches thérapeutiques utilisées dans tous les types de cancers, le traitement des tumeurs pancréatiques doit prendre en compte les fonctions exocrines ou endocrines du pancréas affectées par le cancer ainsi que le grade et l'avancée de la maladie. En outre, les médecins prennent en considération l'âge et l'état général du patient. Actuellement, le traitement standard applicable à tous les cancers n'est pas curatif. Dès leur première consultation, 75% à 80% des patients présentent une tumeur dont la résection chirurgicale est impossible. Cependant, d'autres traitements peuvent contrôler partiellement cette maladie en améliorant la qualité et la durée de vie.

#### A. Traitements loco-régionaux

##### 1. La Chirurgie

L'acte chirurgical, le plus anciennement effectuée pour le cancer du pancréas est l'opération de Whipple : la tête et le corps du pancréas, le duodénum et les structures adjacentes sont alors enlevées. Cette intervention, la plus pratiquée pour le cancer exocrine du pancréas, préserve assez de tissus pour que la queue de l'organe puisse produire les différentes hormones et enzymes digestives nécessaires. L'opération de Whipple ne concerne

les ganglions lymphatiques régionaux ni les gros troncs vasculaire. Certains chirurgiens préfèrent l'exérèse complète de l'organe. La pancréatectomie totale a été développée dans l'espoir d'améliorer le taux de survie par rapport à celui obtenu avec l'opération de Whipple. Au cours de cette opération, le duodénum, le canal biliaire principal et la vésicule biliaire, la rate et les ganglions lymphatiques adjacents au pancréas sont retirés. Cette exérèse aussi étendue a pour objectif de ne laisser aucune cellule cancéreuse, condition *sine qua non* de la guérison. Pour les tumeurs localisées, la pancréatectomie ou la résection pancréatico-duodénale est le seul traitement apte à offrir une chance de guérison. Elle semble particulièrement efficace pour des tumeurs situées au niveau de la tête du pancréas. Malgré une telle intervention, la maladie accuse un mauvais pronostic avec un taux de survie de 10% à 5 ans [Gudjonsson 1996, Sahmoun 2003]. Pour les tumeurs non résécables, l'intervention palliative peut soulager le patient et atténuer les répercussions des obstructions biliaires ou duodénales.

La chirurgie est un procédé lourd et des complications potentiellement sérieuses, comme l'hémorragie ou l'infection, peuvent mettre en jeu le pronostic vital du patient. L'intervention chirurgicale est souvent associée à une morbidité et une mortalité élevées ; c'est pourquoi un geste non chirurgical à visée décompressive peut s'avérer préférable. A chaque situation correspond un geste chirurgical adapté. Mais c'est souvent le seul traitement donnant de plus grandes chances de survie. L'extension de la chirurgie dépend de la localisation et de la taille de la tumeur, du stade de la maladie et surtout de l'état général du patient.

Depuis quelques années, l'association d'autres traitements tels que la radiothérapie et la chimiothérapie à la chirurgie peut conduire à des résultats meilleurs.

## 2. La Radiothérapie

Cette thérapie utilise soit des rayons à haute énergie (rayons X ou électrons émis par des accélérateurs linéaires à particules), soit des rayonnements gamma délivrés par des sources radioactives. L'action de ces rayons s'exerce à la fois sur les cellules tumorales et sur les cellules saines voisines, en altérant l'ADN et l'ARN. Les doses utilisées, exprimées en gray (Gy), doivent être suffisantes pour détruire la tumeur sans altérer les tissus sains environnants. Pour chaque type de tumeur, il a été identifié une dose tumoricide et tolérable car la sensibilité aux radiations varie selon les tissus et les différents types cellulaires.

La radiothérapie est souvent associée à la chirurgie de façon pré-, post- ou per-opératoire, il s'agit alors d'une radiothérapie adjuvante destinée à prévenir la réapparition locale de la

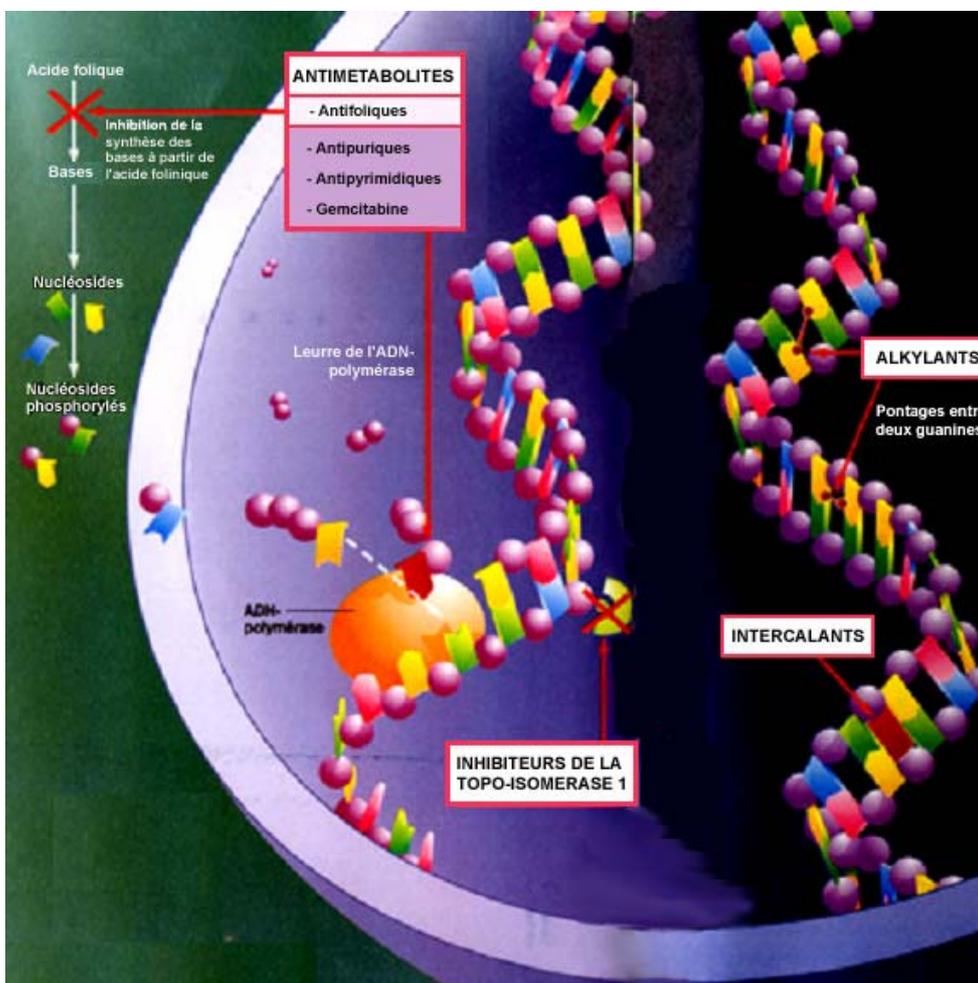
maladie. Cette thérapie seule n'a fait l'objet d'aucun protocole prospectif randomisé que ce soit en situation adjuvante, néo-adjuvante ou palliative. Pour ces premières situations, avec des doses délivrées de l'ordre de 40 Gy, les médianes de survie sont similaires à celles des séries chirurgicales [Whittington 1991]. La radiothérapie per-opératoire semble diminuer le taux de récurrence locale mais reste une pratique de diffusion limitée en raison de sa lourdeur d'organisation [Zerbi 1994]. Au stade palliatif, la radiothérapie seule n'a pas été évaluée et n'est plus employée. De plus, les modalités modernes d'irradiations et les études dosimétriques par ordinateur, couplées aux images de scanner, n'éliminent pas complètement tout effet secondaire de l'irradiation au niveau des tissus sains.

## B. Traitements systémiques

### 1. La Chimiothérapie

#### a. Généralités

Les traitements par chimiothérapie consistent à injecter, le plus souvent par voie systémique, des substances chimiques toxiques pour les cellules. Leur but est d'enrayer ou de ralentir l'évolution de la prolifération des cellules tumorales. Ils sont le plus souvent utilisés pour traiter les métastases ou des cancers non localisés.



**Figure 5.** Résumé des mécanismes d'action des agents anticancéreux.

Les différents sites d'action des molécules cytotoxiques (ici, antimétabolites, alkylants, intercalants, et inhibiteurs de la topoisomérase 1) ne préjugent pas de leur utilisation clinique.

Il existe de nombreux agents anticancéreux qui sont classés selon leur mécanisme d'action sur le cycle cellulaire (*Figure 5*).

La cible principale est le plus souvent l'ADN :

✓ Certaines molécules agissent sur l'ADN en se couplant aux bases et en s'intercalant entre elles, ouvrant ainsi la double hélice. Elles peuvent aussi provoquer la formation d'oxygène, qui casse le filament d'ADN ou bloquer l'action des enzymes chargées de réparer les cassures de l'ADN, entraînant de ce fait la mort cellulaire ; c'est le cas des alkylants dont les principaux agents sont le Cyclophosphamide, le Melphalan, le Chloraminophène, les Nitroso-urées, le Busulfan ou les anti-topoisomérases dont le Vépéside et le Téniposide. Les principaux agents intercalants sont la Doxorubicine, et d'autres l'antracyclines, le Mitoxantrone et l'Actinomycine D. Ils s'intercalent dans la molécule d'ADN en perturbant sa structure, sa réplication et sa traduction en ARN. Ils inhibent à la fois, l'ADN-polymérase et la topo-isomérase.

✓ D'autres peuvent agir au moment de la mitose en empêchant la formation du fuseau chromosomique grâce aux poisons de fuseaux comme la vincristine, la vinblastine et la vindésine. Ils inhibent la polymérisation de la tubuline, principale protéine du fuseau mitotique ce qui a pour conséquence de bloquer la séparation des deux brins d'ADN.

✓ Enfin, certains médicaments peuvent perturber le métabolisme cellulaire ; c'est le cas des anti-métabolites ou de l'asparaginase.

Ces différentes substances sont souvent utilisées en association pour éviter que la tumeur devienne résistante au mono-traitement afin d'obtenir par une poly-chimiothérapie une meilleure efficacité anti-tumorale. La chimiothérapie est plus active sur les cellules cancéreuses que sur les cellules normales car :

- soit la cellule cancéreuse se multiplie plus vite que la cellule normale et est donc plus sensible aux médicaments anticancéreux,

- soit la cellule cancéreuse a acquis des fonctions anormales qui modifient ses capacités métaboliques habituelles. En effet, ce traitement n'est pas spécifique des seules cellules cancéreuses, entraînant ainsi de nombreux effets secondaires. Ils sont variables suivant l'agent utilisé, dont la dose devra être adaptée aux spécificités du patient. Il existe deux sortes d'effets secondaires :

- ceux qui sont dus à l'effet anti-mitotique : perte des cheveux (alopécie), destruction des cellules digestives (diarrhées) et des cellules de la muqueuse buccale (mucite) et surtout

diminution transitoire des globules blancs (neutropénie), des plaquettes (thrombopénie) et des globules rouges (anémie).

- ceux qui sont dus à un effet toxique distinct : sur le système nerveux central (vomissements) et éventuellement sur le cœur, les poumons,...

Des traitements complémentaires dits « de confort » jouent un grand rôle dans le maintien de la qualité de vie du patient. Ils font appel aux antalgiques, aux anti-infectieux, aux psychotropes, ou d'autres médicaments correcteurs.

### b. Chimiothérapie appliquée au cancer du pancréas

Tous les agents chimiothérapeutiques sont loin d'être actifs sur ce type de cancer. Ils sont de ce fait, très peu nombreux à être utilisés dans un tel contexte.

➤ **Le 5-Fluorouracil, ou 5-FU** : Cet agent anticancéreux fait partie de la classe des anti-métabolites ; il est le précurseur du FUTP qui s'incorpore dans l'ARN et inhibe ses fonctions, lui-même précurseur du 5-FdUMP qui inhibe la thymidylate synthétase. Cet agent est à ce jour celui qui a été le plus utilisé en monothérapie ou en association pour les cancers pancréatiques avancés. Au cours de l'évaluation de la chimiothérapie, les taux de réponse à la tumeur rapportés pour le simple-agent 5-FU s'étendent de 0% à 19% [Spitz 1997]. D'autres agents anticancéreux avaient été appliqués au cancer pancréatique à un stade avancé, mais le 5-FU était pendant longtemps, la seule drogue avec un taux de réponse aussi important et avec une limite de fiabilité supérieure à 95%, n'excédant pas 20% [Warsham 1992]. La survie médiane pour des patients traités avec ce composé est comprise entre 4.2 à 5.5 mois. Une étude antérieure à celle de Warsham, a montré que le 5-FU utilisé en général en association pourrait améliorer le taux de réponse et la survie médiane [Andre 1996], mais ces résultats ne sont pas reproductibles, les études ultérieures suggérant une faible amélioration par le 5-FU [Burris 1997]. Les agents modulant l'action du 5-FU tels que l'acide folinique, l'interféron  $\gamma$ , le phosphonacétyl-L-aspartate (PALA) n'ont été testés que sur de petits effectifs dans des essais de phase II sans bénéfice clinique majeur [Braud 1999].

Les associations les plus fréquemment utilisées sont le « FAM » correspondant au 5-FU, plus la Doxorubicine et la Mitomycine C et le « SMD » pour Streptozotocine, plus 5-FU et Mitomycine C. Malgré des résultats encourageants dans les premières études de phase II, les deux essais randomisés du GITSG (Gastro Intestinal Study Group) et du CALGB (Cancer and Leukemia Group B) rapportent des résultats proches de ceux obtenus dans des conditions similaires avec une monothérapie : 14% de réponse et 12 à 18 mois de survie

[Braud 1999]. Comparé à l'abstention thérapeutique, le « FAM » prolonge significativement la survie globale (33 semaines versus 15 semaines). La comparaison du même protocole au 5-FU ne montre aucun bénéfice [Braud 1999]. En 1999, l'essai présenté par P. Rougier à la Société Américaine d'Oncologie Clinique (ASCO), comparant l'association cisplatine/5-FU au 5-FU seul, montre que le cisplatine améliore le taux de réponse (0% versus 12%) et de survie. Les taux de survie à 1 an et les médianes de survie restent cependant très faibles. L'ensemble de ces essais et la divergence entre les résultats ne permet pas de dégager un standard, d'autant plus que ces associations ont une toxicité hématologique, muqueuse ou digestive importante.

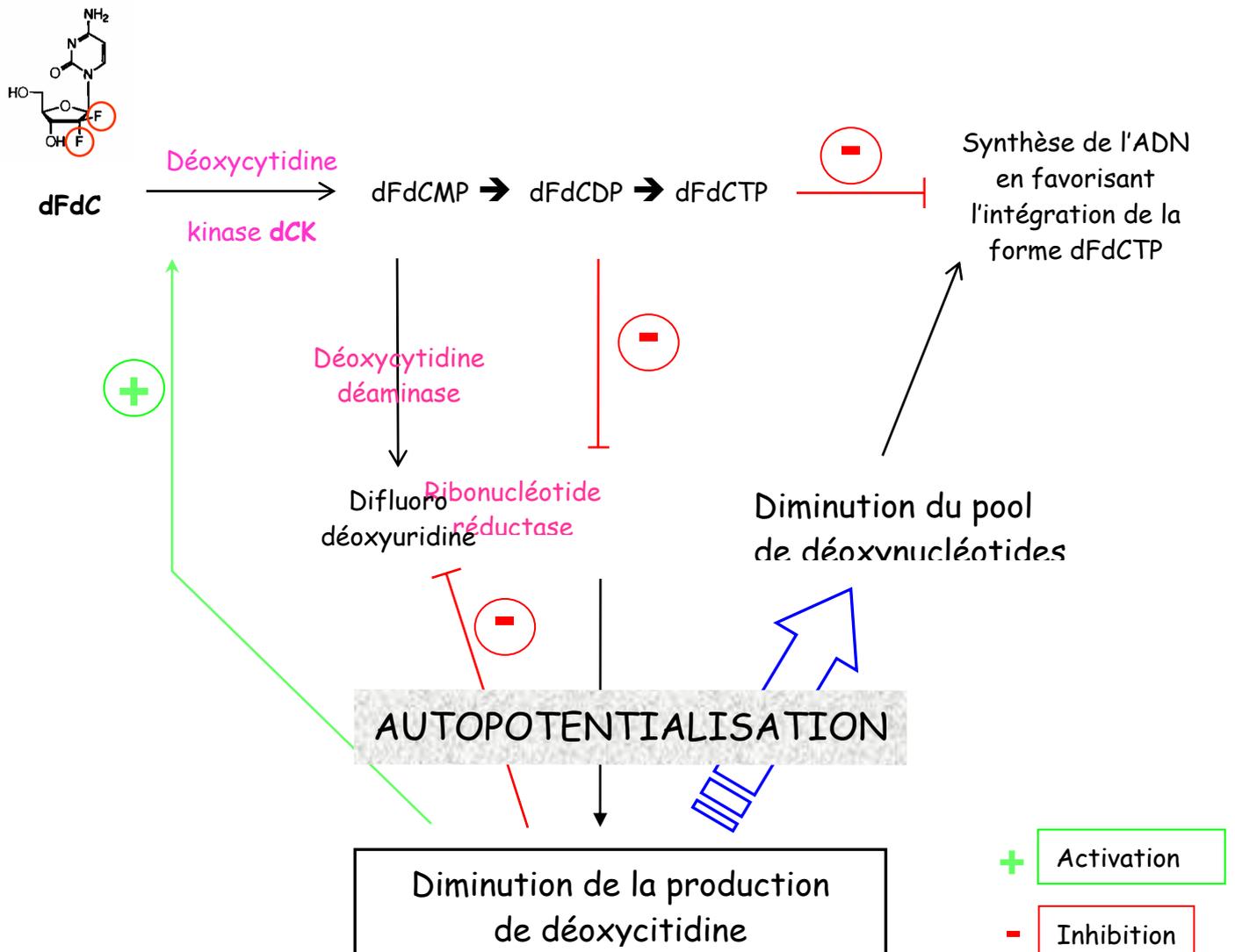
➤ **Une nouvelle génération de molécules anticancéreuses** ; Depuis les années 90, la gemcitabine (2', 2'-difluorodeoxycytidine) a modifié l'approche thérapeutique du cancer du pancréas inextirpable. Cette molécule est un analogue synthétique de la déoxycytidine dont la structure diffère de la cytidine par l'addition de deux atomes de fluor. Comme tous les anti-métabolites, la gemcitabine doit être activée par la cellule. Cette réaction d'activation est produite par la déoxycytidine kinase (dCK), enzyme impliquée dans la voie de récupération des déoxynucléotides qui constitue la deuxième voie de synthèse des nucléotides dans les cellules mammifères. Sous la forme monophosphatée, la gemcitabine est métabolisée en dérivés actifs ; diphosphatés et triphosphatés. En comparaison avec la cytosine arabinoside ou Ara-C, la gemcitabine présente plusieurs avantages dont un meilleur transport, une phosphorylation plus efficace et une élimination de l'organisme beaucoup plus lente [Huang 1991].

L'effet cytotoxique de la gemcitabine s'exerce à deux niveaux (*Figure 6*) :

1) De façon directe, la forme triphosphatée va s'incorporer dans les brins d'ADN en cours d'élongation par compétition avec les substrats naturels, les nucléosides déoxycytidine triphosphates (dCTP) [Ghandi 1991]. Ainsi son intégration par les polymérases arrête et inhibe la synthèse de l'ADN. Cette action est renforcée par la non-détection de la gemcitabine triphosphatée par les enzymes de réparations qui ne reconnaissent pas la région à réparer.

2) Indirectement, la forme diphosphatée inhibe la ribonucléotide réductase, enzyme clé de la synthèse des nucléotides, ce qui entraîne un déficit de déoxycytidine triphosphate. Ce manque de substrats endogènes augmente l'incorporation de la gemcitabine triphosphatée dans l'ADN par défaut de compétition. De plus, la réaction d'activation par la dCK est augmentée car cette enzyme ne subit plus la rétro-inhibition causée par la concentration des

dCTP. Enfin, la réduction du taux de dCTP entraîne aussi une inhibition de la voie catabolique par inactivation de la déoxycytidine déaminase. Ces mécanismes secondaires permettent d'auto-potentialiser l'effet de la gemcitabine. Il résulte de l'addition de ces effets une inhibition de la croissance cellulaire et une induction du phénomène d'apoptose pour les cellules cancéreuses.



**Figure 6.** Mécanisme d'action de la gemcitabine suivant le principe des analogues de nucléosides.

- Nom de commercialisation **Gemzar®**
- Dénomination Commune Internationale **Chlorhydrate de gemcitabine**
- Nom chimique **Chlorhydrate de 2'-déoxy-2',2' difluorocytidine (dFdC)**
- Formule chimique **C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>·HCL**

Ce nouvel anti-métabolite semble donner des résultats intéressants en terme de « bénéfique clinique » malgré un faible taux de réponse objective. Les divers essais de phase II ont montré l'efficacité de la gemcitabine à la dose de 800 à 1000 mg/m<sup>2</sup> par semaine, trois

semaines par mois, dans le traitement du cancer du pancréas [Braud 1999]. Pour les 3023 patients traités dans 882 centres en vue de l'obtention de l'autorisation de la Food and Drug Administration (FDA), le taux de réponse objective est de 12%, la médiane de survie est de 4.8 mois, la survie à 12 mois de 15% avec 4% d'effets indésirables graves.

La comparaison entre la gemcitabine et le 5-FU a été faite par un seul essai randomisé, celui de Burris [1997]. Les 126 patients (dont 75% avaient des métastases hépatiques) recevaient soit une perfusion hebdomadaire de gemcitabine (1000 mg/m<sup>2</sup> pendant 7 semaines puis 3 semaines sur 4) soit des bolus de 5-FU (400 mg/m<sup>2</sup> hebdomadaires). Les patients traités par la gemcitabine ont un bénéfice clinique significatif (23.8% versus 4.8%, p=.002) et une médiane de survie de 5.6 mois versus 4.4 mois (p=.002). Le principal effet secondaire du traitement par cet agent est hématologique (neutropénie grade 3 dans 23% des cas versus 5%) tandis que la toxicité digestive est comparable dans les deux groupes de traitement. L'efficacité de la gemcitabine persiste après l'échec du 5-FU. Parmi les 74 patients traités par la gemcitabine, 27% ont un bénéfice clinique, la durée moyenne de réponse est de 14 semaines et la durée médiane de survie de 3.8 semaines.

Les protocoles actuels en cours d'évaluation associent la gemcitabine au 5-FU ou au cisplatine. Dans les essais de phase II associant gemcitabine et cisplatine, la médiane de survie est de 8.3 mois et de 7.4 mois. La survie à un an est de 28% [Abratt 1998]. Une étude récente du GOIM montre la supériorité de l'association gemcitabine/cisplatine par rapport à la gemcitabine seule en terme de réponse objective (31% versus 10%) sans amélioration du bénéfice clinique. Ces résultats prometteurs, obtenus dans des études de phase II, doivent être confirmés dans des essais randomisés sur des effectifs plus importants. Cette molécule est aussi associée à d'autres thérapies comme la radiothérapie car elle possède des propriétés intéressantes de radiosensibilisateur.

➤ Le docétaxel en favorisant la polymérisation de la tubuline et en inhibant la dépolymérisation des microtubules interrompt la mitose et la réplication. C'est un agent sélectif de la phase S. Il a permis d'obtenir dans une étude de phase II, un taux de réponse objective de 20% [Rougier 2000].

### c. La Chimiorésistance

Les thérapies anticancéreuses ont démontré leur efficacité dans un certain nombre de tumeurs humaines. Les raisons pour lesquelles les autres tumeurs résistent à ces traitements sont multiples : métabolisme ou pharmacocinétique altérés, défaut de pénétration

intratumorale et l'existence de résistances *de novo* ou acquise des cellules tumorales. Ce dernier mécanisme peut-être décomposé en défauts de pénétration ou d'accumulation intracellulaire du médicament, anomalies de son métabolisme intracellulaire, altérations de sa cible et excès de réparation des dommages induits [Tsuruo 1988, Longley 2005]. Dans de nombreuses cellules, les altérations induites par les agents anticancéreux déclenchent la mort de la cellule par apoptose. L'incapacité d'une cellule à mourir par ce mécanisme est une voie ultime de résistance à ces agents [Chresta 1996].

De plus, les cellules cancéreuses expriment plusieurs gènes de résistance dont la p-glycoprotéine, la glutathion-S-transférase ou les gènes de la famille Multi Drug Resistance ou MDR. Le phénomène de résistance constitue la principale cause d'échec de la chimiothérapie et de la radiothérapie qu'elle soit primaire, ou plus souvent secondairement acquise. La réduction de l'acquisition et/ou du degré de résistance peut-être obtenue par :

- l'administration discontinue des agents anti-cancéreux,
- l'association d'agents anti-cancéreux ne partageant pas de mécanismes communs d'acquisition de résistance, conduisant à une pression de sélection moins forte.

## 2. Les autres Thérapies

### a. Immunothérapie

L'immunothérapie est une méthode de traitement destinée à modifier les moyens de défense naturels de l'organisme, soit par injection de sérum ou d'immunoglobulines qui apportent les anticorps spécifiques (immunothérapie passive), soit par la vaccinothérapie qui suscite la production de ces anticorps (immunothérapie active). Dans le traitement contre le cancer, elle a pour but de venir en aide à l'organisme ou plus exactement au système immunitaire pour non seulement combattre la maladie mais aussi pour protéger le corps contre certains effets secondaires provoqués par les traitements.

En immunothérapie passive, des anticorps sont injectés afin de rechercher les cellules cancéreuses qui contiennent la protéine anormale K-ras, des marqueurs tumoraux comme l'ACE ou d'autres protéines caractéristiques du néoplasme pancréatique [Rabitti 2000]. Le même anticorps monoclonal avec des atomes radio-marqués en combinaison avec la gemcitabine, utilisé comme radiosensibilisateur, se dirigent spécifiquement vers les cellules cancéreuses [Van Riel 1999].

Les vaccins actifs d'immunothérapie, produits par les antigènes tumoraux des patients, permettent l'amplification de la réponse immunitaire et attaquent le néoplasme pancréatique

sans endommager le tissu normal [Yeo 1998]. Les études avec des vaccins, effectués en utilisant le peptide tumeur-spécifique K-ras, sont en cours.

### b. Les Inhibiteurs de l'angiogenèse et des métalloprotéases

Les tumeurs solides ne peuvent pas se développer au delà d'un mm sans induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins assurant ses besoins nutritifs [Folkman 1990]. Le développement de nouveaux vaisseaux dépend de l'activation des protéines favorisant la croissance des cellules endothéliales et du mouvement cellulaire : l'angiogénine, l'EGF, le TNF- $\alpha$ , le Vascular Endothelial Growth Factor ou VEGF et le FGF, etc.... Durant l'invasion tumorale et la formation des vaisseaux sanguins ou l'angiogenèse des enzymes qui décomposent la matrice extracellulaire, les métalloprotéases, sont alors nécessaires. Bloquer l'angiogenèse avec des agents dirigés contre les cellules endothéliales de la tumeur, qui présentent un faible taux de mutation contrairement aux cellules tumorales permettrait de limiter la croissance tumorale, le processus de métastases et la chimiorésistance [Boehm 1997]. Il existe des inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse tels que l'angiostatine, l'endostatine, les interférons (inhibiteurs du facteur FGF), les interleukines 1a-b, les inhibiteurs des métalloprotéases, etc... Une alternative est l'utilisation d'anticorps monoclonaux, dirigés contre le VEGF et son récepteur. En effet, dans les tumeurs, le facteur VEGF est surrégulé par les mutations de l'oncogène K-ras présentes dans 75-90% des adénocarcinomes pancréatiques, favorisant ainsi l'angiogénèse. Cette approche est en cours d'études cliniques [Nelson 1998].

Les métalloprotéases de la matrice cellulaire sont une famille classée selon la spécificité du substrat des enzymes d'hydrolyse telles que les collagénases, les gélatinases, les stromelysines pour les protéoglycanes et les glycoprotéines et les métallo-élastases pour l'élastine [Bramhall 1997]. Ces agents n'affectent pas les cellules cancéreuses mais retardent la croissance tumorale et diminuent les métastases. Pour l'instant, une étude en phase II du marimastat (BB-2516) montre une diminution significative du marqueur tumoral CA 19.9 et un effet bénéfique sur la survie en comparaison rétroactive avec des contrôles antécédents [Rosemurgy 1999].

### c. Les Thérapies Cellulaires Complémentaires

Cette thérapie consiste en des traitements utilisant des cellules ou des tissus. En cancérologie, les cellules hématopoïétiques sont les plus utilisées en effectuant soit une greffe de la moelle soit une autogreffe de cellules souches périphériques. Ce traitement

permet dès lors l'usage de doses plus élevées d'agents chimiothérapeutiques en corrigeant une aplasie sanguine.

Dans ce contexte, somme toute relativement décevant de l'arsenal thérapeutique disponible, de nouvelles approches thérapeutiques sont en cours d'évaluation et parmi elles, la thérapie génique.

## IV. LA THERAPIE GENIQUE

Depuis les dix dernières années, cette thérapie connaît une progression fulgurante. Bien qu'elle se présente comme une méthode révolutionnaire et très prometteuse, il n'en reste pas moins que les recherches à son sujet sont loin d'être achevées. A l'évidence, si le champ d'applications de la thérapie génique apparaît immense, la tâche qui reste à accomplir l'est également. En revanche, il est possible de postuler que d'ici une vingtaine d'années, cette technique permettra de guérir des maladies actuellement incurables.

### A. Généralités

#### 1. Origine & Définition

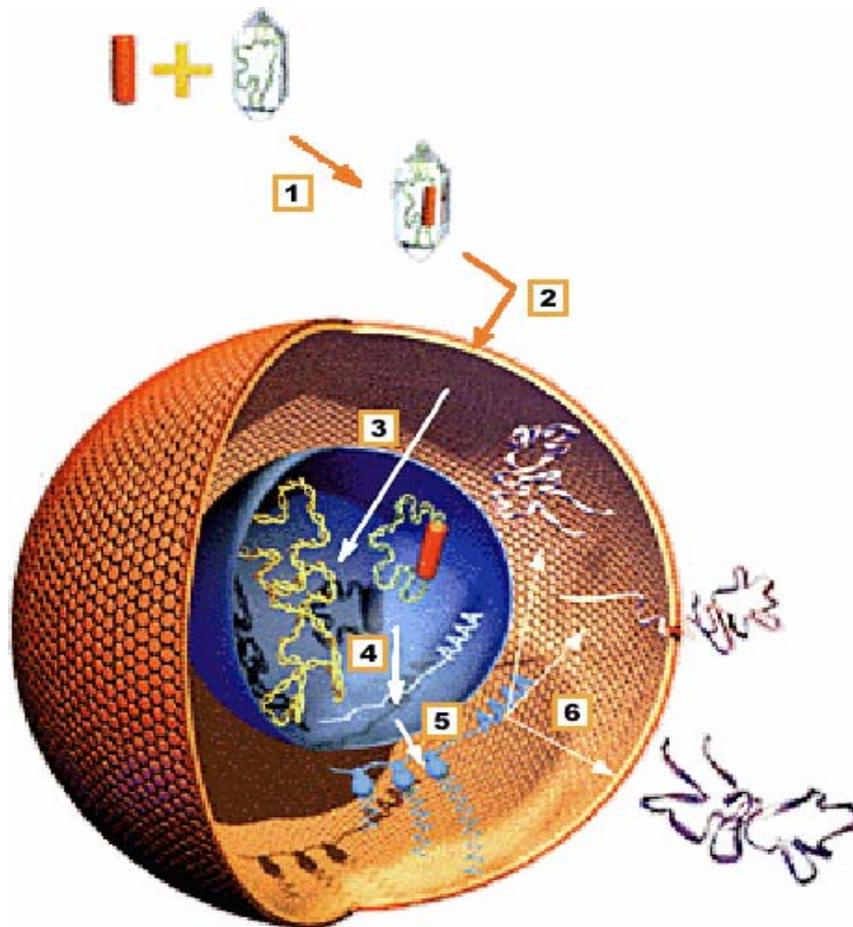
Dès 1978, date de l'isolement des premiers gènes humains, l'identification de plusieurs d'entre eux a été faite dans le but de mieux les connaître et de comprendre leur fonction. De surcroît, le mauvais fonctionnement de certains gènes a été associé à une maladie en particulier. Ces dernières résultent généralement du fait que le gène en question déclenche une production insuffisante de protéines. C'est à ce niveau là que la thérapie génique intervient en corrigeant le défaut du gène incriminé (*Figure 7*).

« La Thérapie Génique est l'insertion délibérée de matériel génétique dans l'organisme d'un patient pour corriger un défaut précis à l'origine d'une pathologie, que ce soit à titre curatif ou préventif. » [*Rapport de l'Office of Technology Assesment OTA, 1984*].

Cette définition inclut à la fois la thérapie du gène c'est-à-dire la réparation de gènes dont l'altération est responsable de maladies, objectif qui prévalait en 1983 pour les maladies génétiques après la mise au point des premiers vecteurs, et l'utilisation de gènes comme nouveaux types de médicament.

A l'origine, la cible la plus logique de la thérapie génique a paru être le domaine des maladies monogéniques héréditaires : cette approche repose sur la certitude que pour ces affections, les personnes porteuses d'un gène sain, ne développeraient pas la maladie. Par ailleurs, les

gènes responsables de nombreuses maladies génétiques étaient connus avec précision, grâce à l'action menée notamment par l'association française contre les myopathies. Mais les champs d'application de la thérapie génique se sont ensuite diversifiés.



**Figure 7.** Mécanisme simplifié de la thérapie génique.

1. Insertion d'un gène dans un vecteur viral ou non viral
2. Transfert du gène "thérapeutique" par le vecteur dans la cellule cible
3. Entrée et transport du gène dans le noyau cellulaire
4. Transcription de l'ARNm à partir du gène
5. Traduction de l'ARNm en protéine
6. Sécrétion, fixation membranaire ou expression cytoplasmique de la protéine

## 2. Méthodologie

Il existe trois méthodes :

✓ La thérapie génique *ex vivo* qui consiste à prélever sur le patient les cellules cibles, à les modifier génétiquement avec le vecteur porteur du gène thérapeutique puis à les réintroduire chez le patient. Cette méthode est utilisée en particulier pour les cellules sanguines qui sont faciles à prélever et à réintroduire dans l'organisme.

✓ La thérapie génique *in situ* qui consiste à placer directement au sein du tissu cible le vecteur de transfert. Cette technique est expérimentée, notamment, dans les cas de

mucoviscidose (transfert de vecteurs dans la trachée et les bronches), de cancer (injection dans la tumeur d'un vecteur portant le gène d'une toxine, par exemple), ou de dystrophie musculaire (injection dans le muscle d'un vecteur porteur du gène de la dystrophine).

✓ La thérapie génique *in vivo* qui consiste à injecter le vecteur portant le gène thérapeutique directement dans la circulation sanguine ; le vecteur est alors censé atteindre spécifiquement les cellules cibles.

## B. Thérapie génique et Cancer

Le cancer représente la maladie la plus concernée par les essais cliniques en thérapie génique. Cette dominance de la cancérologie s'explique par le fait que, dans ce domaine, les besoins sont immenses et les patients pouvant participer aux essais cliniques sont nombreux. Une grande variété d'approches est actuellement en cours de développement du fait de la grande diversité des gène-médicaments utilisés. La Thérapie Génique suppose nécessairement plusieurs éléments :

- Un gène « médicament », qui peut avoir diverses fonctions :

1) une fonction de stimulation du système immunitaire directement contre la tumeur ; ceci est l'immunothérapie,

2) une fonction de restauration de l'expression du produit des gènes perdus au cours de la cancérogenèse tels que des anti-oncogènes ou la forme sauvage des gènes suppresseurs de tumeurs,

3) une fonction « suicide », par des gènes qui codent pour des enzymes permettant la transformation d'une prodrogue en une drogue cytotoxique.

- Un vecteur, pour transporter ce gène, qui peut être un virus modifié ou de nature chimique ; polymère ou lipide.

- Une cellule cible où le gène va s'exprimer.

En thérapie génique, les trois impératifs distincts à prendre en considération, sont : une délivrance du gène dans la tumeur, une régulation de l'expression de ce gène et une efficacité thérapeutique.

### 1. Gènes « médicaments »

La diversité des stratégies de la thérapie génique est due à l'utilisation de nombreux gènes de fonctions différentes mais aussi d'origine variée.

### a. Gènes de correction

Les altérations génétiques majeures du cancer du pancréas sont des mutations au niveau du proto-oncogène K-ras et des gènes suppresseurs de tumeur tels que p53, p16 et smad4/DPC4. L'accumulation de ces changements génétiques mène à d'importantes perturbations au niveau de la régulation du cycle cellulaire et de la croissance. Ces modifications génétiques donnent une première fonction à la thérapie génique qui sera de neutraliser ou de restaurer l'expression de ces gènes défectueux.

➤ **L'approche antisens** : Pour déjouer l'activité accrue des oncogènes mutés, il existe une stratégie qui cherche à empêcher leur transcription et leur translation.

Les oligonucléotides antisens sont des séquences courtes de déoxynucléotides qui se lient de façon complémentaire aux séquences spécifiques d'ADN ou d'ARN. Après sa liaison à la cible, l'expression du gène est entravée par divers mécanismes :

- l'arrêt de la translation ou,
- l'inhibition après liaison au niveau de l'ARN messenger ou de l'ARN ribosomique ou,
- l'arrêt de la transcription après liaison au niveau de l'ADN simple brin ou,
- l'interférence du transport de l'ARN dans les différents compartiments cellulaires et au niveau de l'épissage de l'ARN [Clary 1998].

Cette approche, bien qu'ingénieuse, est confrontée à des problèmes variés. L'administration d'oligonucléotides est très limitée en volume et est surtout non spécifique à la cellule cancéreuse. En outre, ces molécules ne sont pas stables après injection *in vivo*. Une étude réalisée sur des lignées cancéreuses du cancer du pancréas, a utilisée un oligonucléotide antisens de l'amphiregulline [Funatomi 1997]. Cette protéine est un ligand du récepteur de l'EGF qui est surexprimé dans le cancer pancréatique. Il en a résulté une diminution de la concentration de l'amphiregulline relarguée dans le milieu et une inhibition dose-dépendante de la croissance cellulaire. Il en est de même pour l'utilisation de nucléotides antisens de l'ARNm de la gastrine qui a montré une inhibition de la croissance des lignées du cancer du pancréas [Smith 1999].

Les ARN antisens constituent une extension de l'approche précédente. Pour être efficaces, ces ARN doivent être administrés à une concentration en excès *via* un vecteur viral. Une fois exprimé, l'antisens se lie à son ARNm cible de façon complémentaire comme décrit précédemment. Ce système a été utilisé pour inhiber l'activité des oncogènes c-myc et K-ras

[Sklar 1991]. Une des limitations de cette approche est la dégradation des ARN antisens par les nucléases.

Un autre phénomène des plus intéressants est celui des ARN interférences (ARNi) qui a été pour la première fois découvert chez les plantes en 1990 par Richard Jorgensen, bien que le processus exact ne fut compris que quelques années plus tard. Les ARNi est un mécanisme fortement conservé de « gène de silence » qui utilise l'ARN double brin (ARN db) comme signal déclencheur de la dégradation de son ARNm homologue. Les médiateurs de la dégradation de cette séquence spécifique d'ARNm sont des petits ARN interférants (small interfering RNAs, siRNAs) générés par la ribonucléase III. Ils sont obtenus par le clivage des ARN db grâce à une RNase spécifique de ces ARN db appelée, Dicer. Ces siRNA servent ensuite de signaux pour activer le complexe protéique, RNA-induced Silencing Complex (RISC) qui contient les protéines nécessaires au clivage de l'ARNm cible. Les duplex siRNA de 21 nucléotides déclenche donc le silence spécifique de l'expression de gènes dans les cellules cancéreuses sans l'activation de réponse d'interféron non-spécifique [Elbashir 2002].

Une dernière approche dans cette catégorie est l'utilisation de ribozymes. Ce sont de petites molécules d'ARN catalytiques présentant une activité endonucléase et qui pourraient être manipulés pour des ARN cibles. Mais il est très difficile d'en réaliser une administration exogène spécifique, bien que ces molécules puissent être incorporées dans un vecteur viral.

➤ **Le remplacement des gènes suppresseur de tumeur** : L'analyse des bases moléculaires du cancer du pancréas conduit à une stratégie évidente qui consiste à remplacer des gènes suppresseurs de tumeur défectueux. Comme précisé ci-dessus, les premiers candidats pour cette approche sont les gènes p53, p16 et Smad4/DPC4. En effet, ces trois gènes font le sujet d'expériences avec des résultats très variés.

Le gène humain sauvage p53 a été transduit avec succès grâce à des vecteurs recombinants d'adénovirus et de rétrovirus dans des lignées cancéreuses pancréatiques [Bouvet 1998, Lang 1998, Ghaneh 2001]. Il en a résulté une inhibition de la croissance cellulaire et une induction de l'apoptose. Des résultats similaires ont été obtenus après transduction de la forme sauvage du gène p16 dans différentes lignées cancéreuses pancréatiques qui possèdent un gène du rétinoblastome Rb fonctionnel [Kobayashi 1999].

De plus, des résultats intéressants ont été obtenus concernant la transduction de Smad4 sur différents modèles de cancer du pancréas. Bien qu'aucunes des études *in vitro* n'ait démontrée une inhibition significative au niveau de la croissance cellulaire, la transduction de

ce même gène au niveau d'un modèle sous-cutané a montré une diminution du volume tumoral [Schwartz-Waldhoff 1999].

### b. Gènes du système immunitaire

Cette approche tente de contourner le problème du faible pouvoir immunogène des cellules tumorales pancréatiques qui échappent de la sorte au système immunitaire du patient.

Le but de cette approche est d'augmenter par le biais des technologies de l'ADN recombinant, le niveau de l'immunogénécité des cellules tumorales afin d'impliquer le propre système immunitaire de l'hôte. Une telle stratégie permet de modifier génétiquement les cellules tumorales pour qu'elles expriment des cytokines ou des chemokines telles que des interleukines ou IL-2, IL-4, IL-12 ou le granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor (GM-CSF) afin d'attirer les cellules-présentatrices d'antigène (CPAgs) dans la tumeur.

Une étude de l'équipe de Tepper a montré que l'activité cytotoxique des cellules immunocompétentes est renforcée par transduction de nombreux gènes de cytokines dans des cellules tumorales chez la souris [Tepper 1994]. Les souris qui ont été inoculées avec les tumeurs et les cytokines, acquièrent une immunité protectrice et spécifique, même dans le cas de modèle de dissémination dans le péritoine [Gunji 1998]. Il convient de remarquer qu'il a été signalé l'action mobilisatrice de l'IL-12 sur le mécanisme d'immunité cellulaire de type Th1 et qu'il a été également démontré un effet antitumoral très important de cette cytokine à la fois *in vitro* et *in vivo* [Brunda 1993, Trinchieri 1995].

Les lymphocytes cytotoxiques T (LCTs) ciblent la tumeur par l'identification d'un ligand composé de son propre complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et d'antigènes peptidiques. Cependant, il est nécessaire pour leur induction et leur croissance qu'un ligand antigénique leur soit présenté dans un contexte bien approprié de co-stimulation habituellement fourni par les CPAgs. Les cellules dendritiques humaines constituent les CPAgs les plus efficaces dans le système immunitaire. De récentes avancées ont permis d'obtenir des quantités significatives de cellules dendritiques à partir des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse, des cellules précurseurs du sang périphérique et des monocytes sanguins en les cultivant avec du GM-CSF, de l'IL-4 [Bradley 1993] et du Tumor Necrosis Factor (TNF  $\alpha$ ) [Cheng 1998]. En outre, le mécanisme détaillé des interactions entre les CPAgs et les cellules T a été élucidé récemment [Yamaguchi 2003].

Les vaccins constituent une autre forme d'immunothérapie. Les quelques tentatives de vaccination utilisant des cellules tumorales pancréatiques non modifiées n'ont conduit qu'à une

faible réponse immunitaire de par leur faible pouvoir immunogène. Une approche propre à contourner ce problème est d'utiliser des cellules allogéniques du pancréas génétiquement modifiées par le gène du GM-CSF, dans le but de recruter les CPAgs et les cellules tueuses T [Jaffe 1998]. Les vaccins à ADN codant pour des antigènes tumoraux délivrés par des vecteurs viraux ou des liposomes ou encore l'ADN nu seul, peuvent induire une immunité antitumorale importante. En conséquence, les cellules dendritiques manipulées *in vitro* par transfection avec des gènes codant pour des antigènes tumeur-spécifiques [Kalady 2004] ou des cytokines telles que IL-12 pourraient constituer une modalité pratique pour générer des lymphocytes cytotoxiques T.

### c. Gènes de sensibilité aux drogues

➤ **Généralités** : Cette stratégie est basée sur le constat que la chimiothérapie standard serait limitée par une incapacité à livrer suffisamment de drogue au niveau de la tumeur. Si les cellules tumorales étaient aptes à produire elles-mêmes cette drogue, l'exposition des cellules tumorales serait alors plus intense et plus longue tout en limitant de plus, la toxicité périphérique associée à la chimiothérapie. Egalement connue sous le terme de « gènes suicides » ou gene directed enzyme/prodrug therapy (GDEPT), cette tactique repose sur la transduction sélective des cellules tumorales avec un gène d'origine non mammifère qui, une fois exprimé, convertit une prodrogue non toxique, administrée par voie systémique, en un métabolite toxique pour la cellule. Des concentrations élevées du métabolite toxique sont alors atteintes dans la tumeur tout en épargnant le tissu normal.

La prodrogue sélectionnée doit diffuser librement dans la tumeur, être stable chimiquement sous les conditions physiologiques et présenter des propriétés pharmacologique et pharmaco-cinétique. Pour un gain thérapeutique significatif, la drogue libérée doit être au moins 100 fois plus toxique que la prodrogue. L'agent toxique doit aussi avoir une demi-vie lui permettant de se disperser vers les cellules voisines non transfectées sous sa forme active mais tout en s'assurant qu'il n'atteindra pas la circulation sanguine. De plus, la cytotoxicité induite doit être en phase avec le cycle cellulaire et indépendante de la prolifération afin d'éradiquer un éventail plus large de cellules tumorales [Connors 1995]. Idéalement, l'activation spécifique d'une prodrogue est le résultat du métabolisme d'une enzyme qui est absente du tissu sain mais en concentration élevée dans le site de la tumeur. Cette réaction doit être en conséquence différente de celles présentes dans l'organisme pour éviter l'activation cytotoxique de la prodrogue dans les tissus sains.

Plusieurs systèmes sont utilisés pour réaliser une GDEPT. La plupart d'entre eux ne remplissent pas toutes les conditions précisées ci-dessus, y compris ceux actuellement adoptés dans les essais cliniques. Dans certains cas, tel le système thymidine kinase du virus de l'herpès/gancyclovir (hsv-TK/GCV), la réplication active de l'ADN (phase S de la mitose) est une condition essentielle pour la toxicité du système. Pour d'autres systèmes, la transformation de la prodrogue nécessite d'autres voies métaboliques impliquant des enzymes endogènes. Certaines drogues sont caractérisées par une demi vie importante après activation (système eCD/5-FC), d'autres (système hsv-TK/GCV) ne peuvent pas traverser la membrane des cellules où elles sont produites et dépendent d'un contact entre cellules pour diffuser vers les cellules voisines afin de produire l'effet à distance encore appelé « Effet Bystander » [Greco 2001].

➤ « **L'Effet Bystander** » ou effet de voisinage, initialement décrit par Moolten en 1986, peut-être défini comme une extension de l'effet cytotoxique de la drogue active au niveau des cellules voisines non transfectées. Ceci implique le fait que, même si seulement 5 à 10% de cellules cibles sont génétiquement modifiées et expriment le gène thérapeutique, l'éradication de la tumeur peut-être malgré tout possible. L'absence de cytotoxicité de l'enzyme elle-même, surtout si elle est produite à une forte concentration et « l'effet bystander » sont des aspects cruciaux pour la réussite de la stratégie « gène suicide ».

Deux concepts principaux « d'effet bystander » ont été identifiés : local ou immunitaire. Dans le premier cas, la mort des cellules voisines est due au transfert des produits métaboliques toxiques à travers les gap junctions [Mesnil 1996, Dilber 1997], *via* les vésicules apoptotiques [Freeman 1993] ou à la diffusion des métabolites toxiques solubles [Wei 1995, Lawrence 1998, Stribbling 2000]. Le second type d'effet bystander a été mis en évidence sur des animaux immunocompétents, démontrant l'implication d'une réponse immunitaire systémique dans la mort de cellules tumorales situées à distance de celles transduites [Freeman 1997]. La présence d'une infiltration inflammatoire intense a été décrite dans la régression tumorale obtenue chez des animaux immunocompétents traités avec les systèmes hsv-TK/GCV [Vile 1997, Yamamoto 1997] et eCD/5-FC [Consalvo 1995]. Ainsi, la stimulation immunitaire participe non seulement à la réduction tumorale locale mais elle permet aussi d'induire la diminution d'une tumeur à distance, soulignant l'intérêt de son usage pour améliorer le pronostic des patients présentant des métastases microscopiques [Dilber 1997].

➤ **Les différents systèmes** : Il existe de nombreux systèmes de GDEPT dont les plus connus sont ceux de la Thymidine kinase du virus simplex de l'herpès/Gancyclovir, de la Cytosine Déaminase/5-Fluorocytosine, de la Purine Nucléoside Phosphorylase/Méthylpurine désoxyribose. D'autres sont d'usage moins courants : il s'agit du système de la Nitroréductase/CB1954, du Cytochrome P450/Cyclophosphamide, de la Carboxypeptidase G2/Acide 4-[(2-chloroéthyl) (2-mésyloxyéthyl) amino] benzoïque (CMDA) et de la Péroxydase/acide indole-3-acétique ([Tableau 1](#)). Dans cette partie, ne seront développés que ceux utilisés au laboratoire et qui font actuellement l'objet d'essais cliniques.

Enzyme	Origine	Prodrogue	(Pro)drogue libérée
Carboxyl estérase (CE)	Humain, lapin	Irinotecan, 7-éthyl-10-[4-(1-piperidino)-1-pipridino carbonyloxy-(20S)-camptothécine.	SN 38, 7-éthyl-10-hydroxy-(20S)-camptothécine.
Carboxypeptidase A	Humain	MTX- $\alpha$ -peptides.	MTX.
Carboxypeptidase G2 (CPG2)	Bactérie	CMDA. ZD 2767, Prodrogues auto-immolatives	CMBA. Phénol-bis-iodo-nitrogen de moutarde. Agents alkylants, anthracyclines.
Cytochrome P450 (avec ou sans la réductase cytochrome P450)	Humain, rat, lapin	Oxazaphosphorines Ipomeanol, aminoanthracène, acétaminophène.	Agents alkylant. Métabolites toxiques. N acétyl benzoquinone imine.
Cytosine déaminase (CD)	Bactérie, levure	5-Fluorocytosine	5-Fluorouracile
D-amino acide oxydase	levure	D-alanine	Hydrogène peroxide
Déoxycytidine kinase (DCK)	Humain	Cytosine arabinoside	Cytosine arabinoside monophosphate
Déoxyribo nucléotide kinase	Insecte	Analogues de pyrimidine et purine-2'-déoxynucléosides.	Analogues de pyrimidine et purine-2'-déoxynucléotides monophosphates.
DT-diaphorase	Humain, rat	Agents bioréducteurs (indoloquinone E09).	Formes réduites.
$\beta$ -Galactosidase	Bactérie	Prodrogues auto-immolatives d'anthracyclines	Anthracyclines.
$\beta$ -Glucuronidase	Humain	HM-1826 auto-immolatives.	Doxrubicine.
$\beta$ -Lactamase	Bactérie	Prodrogues céphème.	Agents alkylants, vinca alcaloïdes, anthracyclines.
Méthionine liase	Bactérie	Séléno méthionine.	Méthyl sélénol.
Nitroréductase	Bactérie	CB 1954 et analogues. Prodrogues auto-immolatives.	Agents alkylants, pyrrazolidines, énediynes.

Purine nucléotide phosphorylase(PNP)	Bactérie	Purines nucléosides.	6-méthyl purine, 2-fluoro adénine
Thymidine kinase (TK)	Viral	Nucléosides de pyrimidine modifiés (GCV, ACV, valacyclovir), FIAU, nucléosides de purine.	Analogues nucléotidiques monophosphates.
Thymidine phosphorylase	Humain	Analogues de pyrimidine. 5-DFUR.	5-FdCMP.
Xanthine-guanine phosphoribosyl transférase	Bactérie	6-Thiopurines.	6-Thiopurine nucléosides.

---

\*Système gène suicide/prodrogue testés dans notre laboratoire.

• **Thymidine kinase du virus simplex de l'herpès/Gancyclovir ou hsv-TK/GCV** est la stratégie la plus étudiée et présente de nombreuses applications sur tous les types de cancer. Le gancyclovir et les composés homologues, très utilisés pour le traitement des infections de l'herpès chez l'homme, sont de faibles substrats pour la kinase nucléoside monophosphate des mammifères mais peut-être converti efficacement (plus de 100 fois plus) sous la forme monophosphatée par la thymidine kinase du virus de l'herpès de type 1. Des réactions catalysées par les enzymes cellulaires mènent à la production de nombreux métabolites toxiques dont le plus nuisible est la forme triphosphatée. Le GCV-triphosphate entre en compétition avec les déoxyguanosines triphosphates lors de l'incorporation de l'ADN au cours de la division cellulaire, causant l'inhibition de l'ADN polymérase et des cassures simple brin [Elion 1983]. Ces caractéristiques font du système hsv-TK/GCV, une combinaison très appropriée pour l'éradication des cellules tumorales en division active envahissant les tissus non prolifératifs.

D'autre part, sous la forme triphosphatée, le GCV est une cytotoxine spécifique de la phase S. Il est donc nécessaire que les cellules cibles soient en division active pendant le temps d'exposition ou que la prodrogue soit administrée continuellement pour permettre une meilleure insertion de la drogue, au niveau de l'ADN, lors de sa réplication.

Durant les quinze dernières années, plus de 400 publications ont discuté la potentialité du système hsv-TK/GCV pour le traitement du cancer. Des études précliniques utilisant pour vecteurs des adénovirus ou des rétrovirus ont été conduites sur de nombreux modèles *in vivo* et des résultats positifs ont été rapportés en ce qui concerne l'établissement de métastases

hépatiques chez les rongeurs [Caruso 1993], des carcinomes hépatocellulaires murins [Kuriyama 1999] et pour beaucoup d'autres types de tumeurs, notamment l'adénocarcinome pancréatique [Rosenfeld 1997]. Néanmoins, les mécanismes de mort cellulaire, induits par hsv-TK/GCV, ne sont pas encore complètement élucidés. Il a été reporté à la fois des voies apoptotiques [Wei 1999, Beltinger 2000] et non apoptotiques [Kanedo 1995, Melcher 1998].

Un des inconvénients principaux du système hsv-TK/GCV est l'insolubilité des triphosphates produits, fortement chargés dans la membrane lipidique. Ceux-ci altèrent la diffusion de la drogue rendant nécessaire des contacts directs entre les cellules pour le « phénomène de bystander ». Néanmoins, des études précliniques montrent une régression tumorale dès lors que seulement 10% des cellules tumorales expriment l'enzyme hsv-TK. Ce phénomène est le résultat du transfert du GCV activé à travers les gap junctions [Elshami 1996, Dilber 1997, Mesnil 2000] ou l'échange des corps apoptotiques [Freeman 1993]. Il est toutefois probable qu'une majeure partie de la mort cellulaire causée par « l'effet bystander » soit dû au système immunitaire. Le traitement d'une tumeur avec le système HSV-TK/GCV a pour résultat l'infiltration par des cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> et de macrophages mais aussi une augmentation de l'expression d'IL-2, d'IL-12, de TNF $\alpha$  et de GM-CSF, suggérant que cette mort cellulaire induite crée un environnement riche en cytokines [Gandeep 1996, Vile 1997]. La génération de ces signaux immuno-stimulateurs *in vivo* apparaît être prédominante dans une tumeur non-apoptotique et elle est associée à la mise en jeu des gènes inductibles de la famille des heat shock protéines [Melcher 1998].

Makinen et al [2000] ont tenté de mimer une situation clinique plus proche de la réalité et d'étudier la stratégie gène suicide hsv-TK/GCV sur des cancers pancréatiques expérimental chez des animaux immunocompétents. Les études *in vitro* ont montré que les cellules de carcinome pancréatique de rat DSL-6A/C1 transduites à la fois par un rétrovirus et un adénovirus étaient sensibles à de faibles concentrations de GCV en comparaison avec les cellules contrôles non transduites. De plus, un « effet bystander » important a été observé. Les études *in vivo* ont permis de montrer que les tumeurs sous-cutanées établies avec des cellules DSL-6A/C1 exprimant le gène hsv-tk sont éradiquées après un traitement au GCV alors que celles non transfectées continuent leur croissance.

• **Cytosine Déaminase/5-Fluorocytosine ou eCD/-FC** ; Ce système est basé sur la production d'anti-métabolites toxiques, analogues de nucléotides.

L'enzyme CD, trouvée dans certaines bactéries, champignons ou levures mais absente chez les mammifères, catalyse la déamination hydrolytique de la cytosine en uracile. Elle peut donc aussi convertir la prodrogue non toxique, le 5-Fluorocytosine, (5-FC) en 5-Fluorouracile (5-FU) qui sera transformé par les enzymes cellulaires en anti-métabolites pyrimidiques puissants (5-FdUMP, 5-FdUTP, 5-FUTP). Trois mécanismes sont impliqués dans la mort cellulaire induite par ce système : la formation de complexes (5-FU)-ARN et (5-FU)-ADN ainsi que l'inhibition de la thymidylate synthétase [Niculescu-Duvaz 1998]. Le gène CD utilisé pour la GDEPT a été cloné de la bactérie *Escherichia Coli* (*E.Coli*) [Austin 1993]. Plus récemment, l'activité antitumorale de eCD/5-FC a été améliorée en utilisant le gène CD de *Saccharomyces cerevisiae*, catalytiquement supérieure à celle d'*E.Coli* [Kievit 1999], ou par co-transfection des cellules avec le gène de l'uracile phosphoribosyltransférase (UPRT), codant pour une enzyme capable de convertir directement le 5-FU en 5-FUMP à la première étape de la voie d'activation [Erbs 2000, Koyama 2000].

Le système eCD/5-FC a été utilisé pour réaliser un certain nombre d'études *in vitro* afin d'augmenter la sensibilité des cellules de mammifères au 5-FU par un facteur de 2000 [Ge 1997]. L'activité anti-tumorale de ce système a été également étudiée sur de nombreux modèles animaux [Bentires-Alj 2000] et notamment son efficacité à contrecarrer la formation de métastases d'origine diverse [Consalvo 1995]. Topf et Col. [1998] ont montré que l'administration directe d'un vecteur adénoviral exprimant le gène de la cytosine déaminase (Ad CMV.eCD) dans une tumeur développée à partir de cellules de carcinome colique suivi d'une administration systémique de 5-FC, résultait en une production locale de 5-FU et en une suppression de la croissance tumorale. Basé sur la démonstration que le transfert de gène *in vivo* par les adénovirus dans les tumeurs intra-hépatiques est moins efficace en comparaison à celui des hépatocytes, cette équipe a développé localement une stratégie prodrogue/gène suicide utilisant un transfert du gène CD par adénovirus sur du foie normal, permettant aux hépatocytes de convertir le 5-FC en 5-FU pour traiter efficacement les métastases locales de façon « trans » [Topf 1998].

Un des principaux avantages du système eCD/ 5-FC est son puissant « effet bystander » qui, au contraire de hsv-TK/GCV, ne nécessite pas de contacts directs, puisque le 5-FU diffuse à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule [Domin 1993]. Des expériences conduites *in vitro* sur un mélange de cellules transfectées et non transfectées exposées au 5-FC,

montrent que de 1 à 30% de cellules exprimant l'enzyme eCD peuvent générer assez de 5-FU pour inhiber la croissance des cellules voisines qui n'expriment pas l'enzyme [Huber 1994, Ichikawa 2000]. Du 5-FU a été trouvé dans le milieu de culture de cellules eCD positives traitées au 5-FC [Huber 1993] en quantité suffisante pour que le transfert de ce surnageant sur des cellules non transfectées conduise à leur mort [Lawrence 1998]. Cependant, des études avec du 5-FC tritié ont montré la présence d'une quantité modérée et insaturable de drogue accumulée dans la cellule [Haberhorn 1996], indiquant ainsi que la captation cellulaire du 5-FC pourrait être une limitation à l'usage de cette stratégie. « L'effet bystander » n'a pas été détecté dans les premières études *in vitro* du système eCD/5-FC [Mullen 1992] et il apparaît même que ce phénomène soit réduit dans certaines lignées cellulaires [Bentires-Alj 2000]. Comme pour le système hsv-TK/GCV, la combinaison eCD/5-FC induit aussi un « effet bystander » à distance dû au système immunitaire, associé à une infiltration de « cellules tueuses naturelles » dans la tumeur [Pierrefite-Carle 1999]. Des souris immunocompétentes pré-traitées avec le système CD/5-FC possèdent une résistance significative lorsqu'elles ont été inoculées avec des cellules tumorales de type sauvage [Mullen 1994, Consalvo 1995] et cet effet de vaccination apparaît être dépendant du type de cellules réinjectées (e.g, l'éradication des carcinomes exprimant le gène eCD ne confère pas de protection contre les fibrosarcomes) [Mullen 1994]. Il convient de ne pas oublier, est que la protéine eCD, elle-même d'origine non mammifère, est immunogène [Mullen 1994].

En dépit des résultats précliniques encourageants, il résulte clairement des études cliniques qu'une stratégie reposant sur la seule GDEPT ne mène qu'à une réponse thérapeutique partielle. En conséquent, la combinaison de plusieurs gènes suicides ou différentes modalités de traitement sont mises en œuvre dans le but d'augmenter l'efficacité de chaque stratégie utilisée. Sur la base sur de nombreux essais cliniques avec le 5-FU comme agent chimiothérapeutique et radiosensibilisateur [McGinn 1993], l'association de radiations ionisantes au système eCD/5-FC a été testée. Les cellules exprimant le gène eCD exposées au 5-FC sont sélectivement sensibles aux radiations en fonction de la concentration de la drogue avec une mort cellulaire accrue après trois heures de l'irradiation [Khil 1996]. La stratégie de combiner la GDEPT avec la radiothérapie produit un effet antitumoral appréciable lorsque les doses cliniques élevées de radiations (2 ou 5 Gy par fraction sur une semaine) sont utilisées [Stackhouse 2000].

De plus, la spécificité de l'expression du gène et l'activation de la prodrogue offrent la possibilité de combiner les systèmes « gènes suicides » en vue d'augmenter leur activité antitumorale sans amplifier la toxicité systémique. Les mécanismes qui sont à la base de la synergie de cytotoxicité entre les systèmes eCD/5-FU et hsv-TK/GCV ne sont pas connus mais il y aurait une relation entre les deux car il y a une augmentation de la phosphorylation du GCV par l'enzyme hsv-TK après traitement au 5-FU [Aghi 1998]. L'analyse *in vivo* montre une efficacité importante des systèmes combinés, beaucoup plus élevée que celle obtenue avec la radiothérapie [Uckert 1998].

• **Purine Nucléoside Phosphorylase/Méthylpurine désoxyribose ou ePNP/MePdR** : Le gène *DeoD* d'*Escherichia Coli* code pour une enzyme, la Purine Nucléoside Phosphorylase appartenant à la voie de récupération des purines ou « salvage pathway » par les auteurs anglais. Cette enzyme ePNP, contrairement à celle des mammifères, accepte l'adénosine et certains de ces analogues comme substrat. Comme pour tous les systèmes gène suicide/prodrogue, le composé devra être sélectionné pour être peu toxique, tout en restant un substrat convenable pour l'enzyme bactérienne et non pour la forme humaine.

Les prodrogues les plus utilisées actuellement, sont le 6-méthylpurine désoxyribose (MePdR) et la fludarabine (2-fluoro-ara-AMP). La première est convertie par l'enzyme ePNP, en MePdR en 6-méthylpurine (MeP) et 6-méthylpurine riboside. La deuxième, F-ara-AMP est clivée en 2-fluoroadénine (F-Ade), substance dont la toxicité a été déjà établie [Secrist 1999]. Ces deux composés sont métabolisés en analogues de l'ATP, inhibant par ce biais des réactions impliquées dans la synthèse d'ARN et de protéines, entraînant la mort cellulaire [Parker 1997]. Ces molécules sont particulièrement attractifs car elles sont toxiques à la fois pour les cellules prolifératives et non prolifératives. En comparant l'effet *in vivo* de ces deux molécules, le 6-MePdR présente une meilleure efficacité de traitement que la F-Ade [Parker 2003]. « L'effet bystander » de ce système ne nécessite pas de contact direct entre les cellules. Si suffisamment de MeP est généré dans les cellules contenant le gène ePNP, la molécule est relarguée et captée par les cellules voisines entraînant leur mort. [Hughes 1998]. Le système ePNP/MePdR a été exploité récemment dans notre laboratoire sur des modèles d'adénocarcinomes pancréatiques à la fois *in vitro* et *in vivo* [Deharvengt 2004].

#### d. Gènes de l'apoptose

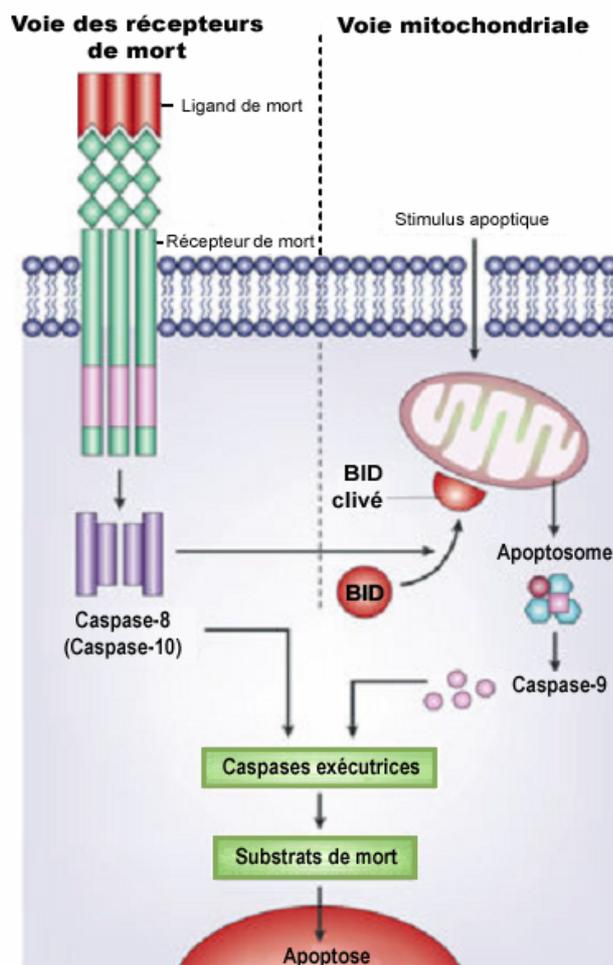
L'apoptose est la mort cellulaire génétiquement programmée, un phénomène qui est nécessaire pour la morphogenèse au cours du développement embryonnaire et pour

l'homéostasie du tissu chez l'adulte. Une défaillance dans la machinerie apoptotique joue un rôle dans le développement de la tumeur et dans le phénomène de résistance aux différentes thérapies anticancéreuses. Le phénomène de résistance à l'apoptose peut aussi augmenter l'échappement des cellules tumorales à la surveillance du système immunitaire. De plus, parce que la chimiothérapie et la radiothérapie agissent préférentiellement par induction de l'apoptose. Une dérégulation de cette voie peut engendrer une résistance et une insensibilité des cellules tumorales à ces thérapies. Donc la résistance à l'apoptose constitue un important problème d'ordre clinique. La question est : comment les cellules tumorales deviennent elles insensibles à l'apoptose ? La compréhension de ce mécanisme au niveau moléculaire permet d'appréhender plus largement le processus de la carcinogenèse, influence les stratégies thérapeutiques et ultimement, mène à de nouvelles approches thérapeutiques basées sur la modulation de la sensibilité de la tumeur à cette voie [Igney 2002]. L'excitant challenge d'aujourd'hui, est de traduire ces connaissances pour des applications cliniques [Nicholson 2000].

**Figure 8.** Les deux voies principales de l'apoptose.

L'apoptose peut être initiée par deux alternatives: l'une à partir des récepteurs de mort à la surface de la cellule (la voie extrinsèque, à gauche du schéma) ou à partir de la mitochondrie (la voie intrinsèque, à droite). Pour ces deux voies, l'induction de l'apoptose mène à l'activation des caspases initiatrices tels que la caspase-8 et la caspase-10 pour la voie extrinsèque; et la caspase-9 qui est activée par l'apoptosome pour la voie intrinsèque. Les caspases initiatrices activent alors les caspases exécutrices. Une fois activées, ces enzymes clivent les substrats de mort qui résultent aussi de l'apoptose.

Il existe des connections entre les deux voies. Par exemple, le clivage de BID, membre de la famille de BCL-2 par la caspase-8, active la voie mitochondriale après induction de l'apoptose suivant les récepteurs de mort, et peut être utilisé pour amplifier le signal apoptotique.



De nombreuses stratégies ayant pour objectif l'induction de l'apoptose par les voies extrinsèque et intrinsèque (*Figure 8*) ont déjà fait leur entrée dans le cadre clinique, incluant

l'utilisation du ligand TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) au récepteur de mort comme le TRAIL-R1/DR4 et le TRAIL-R2/DR5 aussi connu sous le nom de Apo2L [Smyth 2003], de gènes pro-apoptotiques de la voie mitochondriale tels le gène bax ou des antisens du gène bcl-2. L'exploitation des fonctions pro-apoptotiques de la protéine P53 dans la tumeur sont aussi en cours d'évaluation. D'autres approches thérapeutiques basées sur l'apoptose ont produit des résultats *in vivo* très prometteurs, particulièrement ceux obtenus lors de l'utilisation du peptide Smac/DIABLO en vue d'éliminer la contrainte sur l'activation des caspases [Salvesen 2002].

L'étude du ligand de mort TRAIL demande une attention particulière car beaucoup de lignées cellulaires sont sensibles à TRAIL alors que les cellules normales lui sont résistantes [Walczak 1999]. Afin d'exploiter le potentiel thérapeutique de TRAIL, Ozawa et Col. [2001] ont analysé l'expression de ce gène et de ses récepteurs (DR4 et DR5) dans le pancréas humain normal et cancéreux, et ils ont déterminé la sensibilité des cellules cancéreuses pancréatiques à la cytotoxicité de TRAIL. Le niveau d'ARNm de TRAIL, DR4 et DR5 est augmenté simultanément dans les cancers pancréatiques en comparaison avec le pancréas normal ( $P < 0.01$ ) et il existe une corrélation positive entre tous ces gènes. Indépendamment de la présence des récepteurs DR4 et DR5, les tests de cytotoxicité de TRAIL révèlent que les cellules cancéreuses pancréatiques présentent une faible sensibilité ( $DL_{50} > 85$  ng/ml) par rapport aux cellules de lymphomes Jurkat T ( $DL_{50} = 7.2$  ng/ml). Ces résultats montrent que les cancers du pancréas sont insensibles à l'apoptose dû à TRAIL en dépit de l'expression de TRAIL et de son récepteur, suggérant que la présence de médiateurs dans les cellules cancéreuses pancréatiques inhibe la mort cellulaire induite par TRAIL.

Une stratégie à exploiter dans le futur concerne la sous-régulation des molécules anti-apoptotiques qui constitue un des mécanismes de résistance des cellules tumorales. L'injection dans la tumeur d'oligonucléotides antisens du gène bcl-2 réduit expérimentalement la croissance tumorale [Jansen 2000] et les résultats préliminaires des études cliniques sont très prometteurs [Waters 2000]. Une autre protéine de la famille de Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, peut être aussi sous-exprimée par une approche antisens dans des lignées cellulaires humaines [Taylor 1999]. D'ailleurs, l'intérêt porté sur les protéines inhibitrices de l'apoptose ou les IAPs telle que la survivine a bien pour effet de restaurer la sensibilité à l'apoptose chez la souris [Mesri 2001].

Un autre gène très bien caractérisé dans l'apoptose, faisant partie de la famille de Bcl-2, est le gène bax. Une surexpression de ce gène pro-apoptotique permet d'induire la mort cellulaire dans un certain nombre de cancers tels que celui du pancréas [Xu 2002], de l'ovaire [Tai 1999] et du sein [Sakakura 1997]. L'expression augmentée de bax peut alors réduire le seuil d'apparition de l'apoptose dans différents types de lignées tumorales et les sensibiliser aux traitements standards [Arafat 2000]. En corrélation avec ceci, il a été observé qu'une expression réduite du gène bax est associée à une faible réponse à la chimiothérapie ainsi qu'à une faible survie des patients atteints de carcinomes du colon [Ogura 1999].

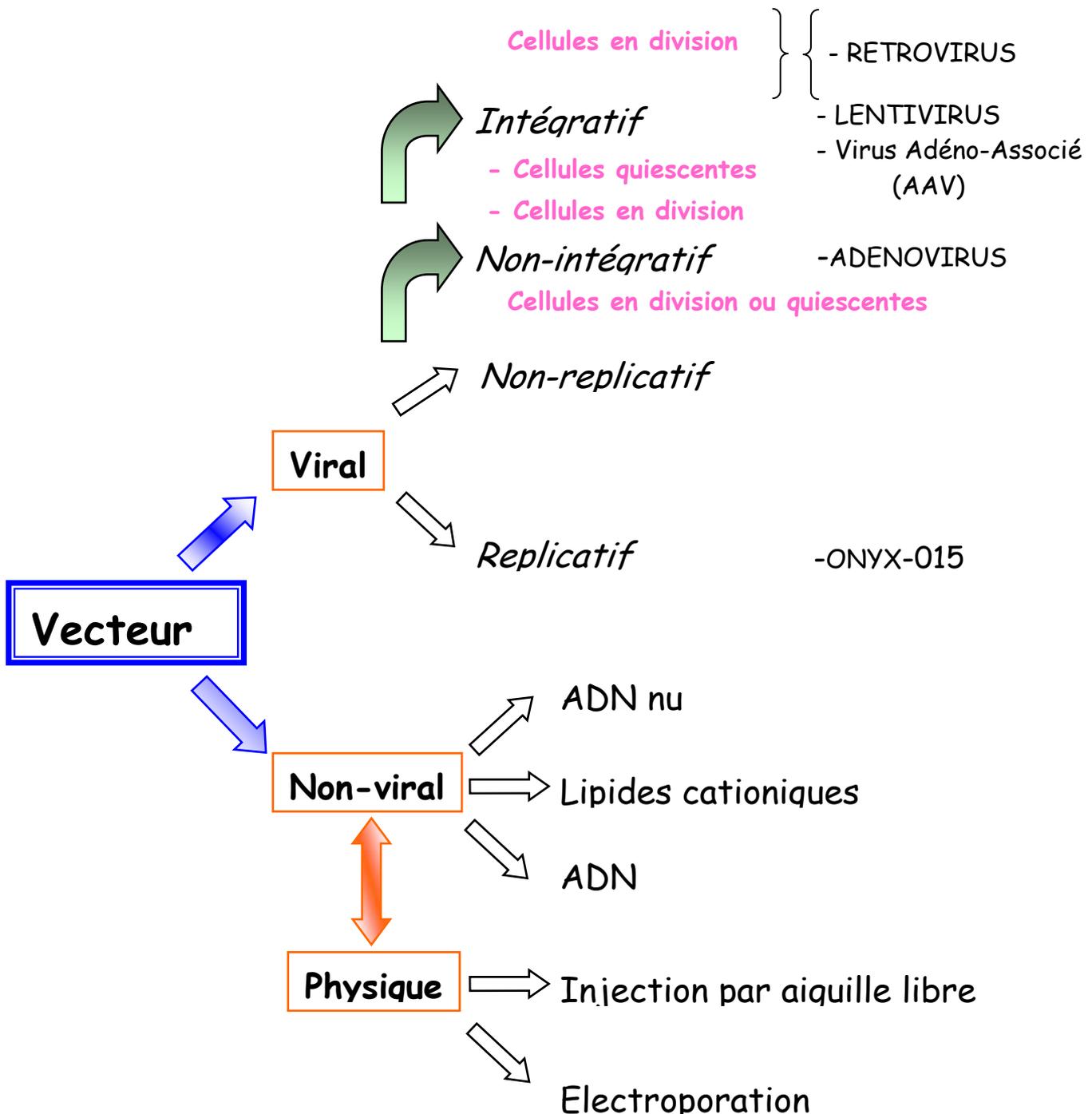


Figure 9. Les différents types de vecteurs de transfert: viraux, non-viraux et physiques.

## 2. Le Vecteur

A ce jour, l'évolution de la thérapie génique repose essentiellement sur le développement de systèmes de transfert de gène, domaine encore appelé la vectorologie.

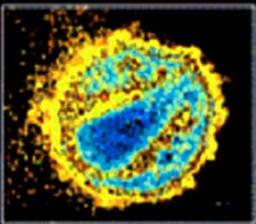
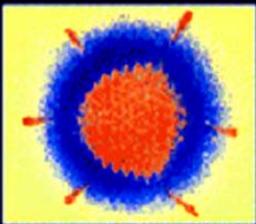
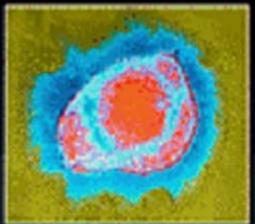
Un bon vecteur doit être sûr, efficace, capable de fonctionner dans des cellules qui ne se divisent pas et d'assurer la stabilité de l'expression du gène thérapeutique. Il existe plusieurs méthodes de transfert suivant l'origine du vecteur (*Figure 9*).

### a. Les Méthodes Virales

Les virus ont la capacité de franchir, dans certaines conditions, les barrières de protection que dresse le corps humain en cas d'introduction d'ADN étranger dans le génome. Ils sont capables d'introduire leur matériel génétique dans les cellules qu'ils infectent. C'est pourquoi les chercheurs ont eu l'idée de les utiliser pour transférer les gènes thérapeutiques dans les cellules des patients. Bien entendu, les virus ne doivent présenter aucun danger : ils seront donc transformés génétiquement en enlevant, de leur génome, les séquences nécessaires à leur réplication et à leur virulence.

Différents types de virus sont utilisés comme vecteurs (*Tableau 2*) comme:

**Tableau 2.** Atouts et limites des vecteurs viraux. \* Virus AAV pour virus adénovirus associé

				
	VECTEURS RETROVIRAUX	VECTEURS ADENOVIRAUX	VIRUS AAV	VECTEUR du VIRUS de l'HERPES
<b>TAILLE MAXIMALE DU GENE THERAPEUTIQUE</b>	8 kb	35 kb	4,8 kb	30 kb
<b>CELLULES CIBLES</b>	seulement en division active	en division active ou ne se divisant pas	en division active ou (probablement) ne se divisant pas	en division active ou ne se divisant pas
<b>ADMINISTRATION</b>	<i>ex vivo</i> ou <i>in situ</i>	<i>ex vivo</i> ou <i>in situ</i>	inconnue, seulement <i>ex vivo</i> ?	<i>ex vivo</i> ou <i>in situ</i>
<b>EXPRESSION DU GENE THERAPEUTIQUE</b>	stable	transitoire	inconnue, probablement stable	stable
<b>TAUX D'EXPRESSION DU GENE THERAPEUTIQUE</b>	modéré	élevé	modéré	modéré
<b>RISQUES</b>	intégration probablement mutagène	réactions inflammatoires et immunitaires	intégration probablement mutagène	neurotoxicité (mal caractérisée) intégration probablement mutagène
<b>IMMUNITE PRE-EXISTANTE</b>	non	oui	oui	oui
<b>RECOMBINAISON</b> (a) avec l'hôte (b) avec le virus parent	(a) improbable (b) impossible	(a) possible (b) possible	(a) improbable (b) possible	(a) possible (b) possible

☛ **Les Rétrovirus** ont été les premiers virus testés ; leur qualité principale est de pouvoir intégrer leur matériel génétique de façon permanente dans le génome des cellules qu'ils infectent. Les rétrovirus sont des virus enveloppés dont le génome est sous la forme d'ARN simple brin de taille moyenne, de 7 à 12 kb, et bordé de longues séquences répétitives nommées « long terminal repeats » (LTRs). Ces dernières jouent un rôle dans l'intégration du génome viral dans l'ADN cellulaire et dans sa transcription. Entre ces séquences existent de nombreux gènes disposés dans le même ordre quelque soit le rétrovirus :

- ✦ Le gène *gag* code pour les protéines de la capsid et de la matrice,
- ✦ Le gène *pol* code pour trois enzymes ; une intégrase, une protéase et une reverse transcriptase,
- ✦ Le gène *env* code pour la protéine de l'enveloppe et détermine la spécificité des cellules qui pourront être infectées par le virus,
- ✦ Le gène *psi* code pour un signal d'empaquetage.

Après infection des cellules cibles et libération du contenu viral dans le cytoplasme, la reverse transcriptase transcrit l'ARN génomique en ADN qui sera intégré au hasard dans le génome de la cellule hôte. Il est courant d'utiliser des vecteurs rétroviraux non répliatifs pour éviter des recombinants indésirables. Brièvement, les gènes *gag*, *pol*, et *env* sont délétés et remplacés par le gène d'intérêt. La capacité de clonage est importante, allant jusqu'à 8 kb. L'immunogénicité du virus est en conséquence diminuée. Les protéines dont les gènes ont été délétés, sont complétées en trans par une lignée cellulaire d'empaquetage [Kim 2000].

A l'heure actuelle, 60% des protocoles cliniques appliqués sur le cancer du pancréas sont basés sur l'utilisation de vecteurs rétroviraux, dérivés du virus de la leucémie murine (MLV ou virus de Moloney) [Humphreys 1999]. Ils sont utilisés selon la technique *ex vivo* précédemment décrite. La pénétration des rétrovirus dans les cellules cibles s'effectue grâce à la reconnaissance, par un récepteur cellulaire, d'une protéine présente sur l'enveloppe virale. Mais pour être efficace, c'est-à-dire pour s'intégrer dans le génome, le vecteur ne peut se contenter d'entrer dans le cytoplasme : il doit pénétrer jusqu'au noyau de la cellule. Cet événement n'est possible qu'au moment où la cellule se trouve en mitose, car la membrane du noyau est alors momentanément rompue. Mais l'utilisation des rétrovirus reste encore limitée. Peut-être l'une des plus importantes limitations de son usage est la nécessité d'une répliation active des cellules cibles pour que se produise l'intégration virale. En effet, à un instant donné, la fraction active des cellules tumorales en division est faible ; l'efficacité du

transfert de gène se trouve alors fortement diminuée [Yang 1996]. En outre, les titres les plus élevés de rétrovirus recombinants qui ont été obtenus, sont de l'ordre de  $10^8$  particules /ml. Ceci est sensiblement inférieur à ce qui est obtenu pour les autres vecteurs viraux. Il convient enfin, pour réaliser un meilleur ciblage dans les divers types de tissus cibles, de mieux caractériser le récepteur cellulaire du rétrovirus. Il a été reporté que la spécificité du vecteur rétroviral est améliorée en modifiant le gène env. En outre, la lignée cellulaire d'emballage, utilisée pour la production du virus, a été modifiée afin de mieux cibler le vecteur [Markowitz 1988, Burns 1993].

☛ **Les Lentivirus** tels que le Virus de l'Immunodéficiência Humaine ou VIH, constituent un vecteur intéressant car, à l'opposé du rétrovirus, ils peuvent se répliquer dans les cellules en quiescence telles que les neurones, les hépatocytes et les îlots pancréatiques. Ce type de virus n'induit pas de réponse immunitaire humorale ou cellulaire aux protéines virales même après plusieurs administrations. Cependant, depuis que le VIH s'est avéré être un lentivirus, le problème de la sûreté de l'usage de ce type de vecteur constitue une préoccupation majeure [Verma 1997].

Comme pour le cas du rétrovirus, le gène d'intérêt s'intègre au hasard dans le génome de la cellule hôte. Le risque principal est donc celui d'une éventuelle recombinaison entre le génome viral et le génome des cellules infectées, susceptible de produire un virus pathogène.

☛ **Les Adénovirus** possèdent une capsidie icosaédrique renfermant un ADN génomique double brin linéaire de 36 kb. Il existe au moins 46 sérotypes connus, mais le plus communément utilisé pour la thérapie génique est celui de type 5. Le virus se lie à la cellule cible *via* le récepteur d'adénovirus de Cocksackie ou CAR. Ceci a pour conséquence la prise en charge du récepteur avec le virus dans les endosomes par le biais desquels il se retrouve dans le cytoplasme. L'ADN viral sera alors délivré dans le noyau où il restera sous la forme d'épisome et ne s'intégrera pas dans le génome de l'hôte. Dans ce cas, l'ADN viral sera transcrit et traduit aussi bien que répliqué. Disposant de l'ensemble du matériel nucléaire et des protéines structurales nécessaires, l'assemblage de nouveaux virus peut se faire, suivi d'un cycle de lyse cellulaire avec libération des virions.

Les premiers vecteurs adénoviraux utilisés en thérapie génique ont été obtenus en délétant la région E1A et en les rendant incompétents à la répllication. Le transgène peut-être inséré à ce niveau-là avec une taille maximum de 7.5kb. Le virus recombinants pourra être produit en utilisant des cellules « nourricières » complétant la déficiencie de E1. Plusieurs avantages

justifient l'utilisation des adénovirus recombinants comme vecteur de transfert. Ils présentent des caractéristiques intéressantes comme :

- ★ Leurs grandes tailles permettent le transfert de très grandes séquences d'ADN,
- ★ Ils sont capables d'infecter une large gamme de cellules cibles à la fois, en division ou même quiescentes avec une efficacité de transduction élevée,
- ★ Il n'y a aucune intégration aléatoire disruptive du génome viral dans celui de la cellule hôte,
- ★ Ils peuvent être produits de façon stable à des titres élevés (plus de  $10^{13}$  particules/ml) ce qui permet une utilisation plus aisée *in vivo*. Ils présentent aussi des désavantages, notamment celui de provoquer de fortes réactions inflammatoires et immunitaires, ce qui empêche une deuxième injection. En outre, l'expression du gène d'intérêt n'est que transitoire. Il est toutefois possible que de tels inconvénients puissent être employés de façon avantageuse en accroissant l'immunogénicité de la tumeur par l'utilisation des adénovirus.

De récents développements ont permis de mettre au point des adénovirus conditionnellement réplicatifs (CRAD) pour la thérapie génique du cancer. Dans ce vecteur adéno-viral de deuxième génération, la majeure partie de leur région E1A est maintenue, ce qui permettra leur réplication. La délétion partielle est complétée seulement par les cellules tumorales. Il faut toutefois noter que laisser des séquences dans le génome viral présente des inconvénients comme la maintenance de la stabilité du génome et la propagation de la forme sauvage virale dans la cellule. Un promoteur tumeur-spécifique peut-être utilisé comme alternative pour diriger sélectivement la région E1A et permettre la réplication de l'adénovirus uniquement dans les cellules tumorales. Théoriquement, le vecteur reste incompetent pour la réplication dans les cellules normales qui ne peuvent le compléter. En outre, il tient compte de la diffusion du virus dans le tissu cancéreux, lui conférant une spécificité. Cette stratégie a été testée avec succès *in vitro* sur des modèles de cancers pancréatiques et dans le contexte de modèle murin [Wesseling 2001]. Une autre étude récente inclut la modification des fibres de l'enveloppe de l'adénovirus pour augmenter son tropisme et sa liaison à la cellule telle que celle du canal du pancréas qui sont normalement déficientes pour les récepteurs CARs [Dmitriev 1998, Mena 2000].

☛ Les « Adéno-Associated » Virus ou AAV sont de petits parvovirus à ADN simple brin, non enveloppés, non pathogènes et très répandus chez l'homme. Pour leur réplication, ces

virus ont besoin d'être co-infectés avec des adénovirus ou des virus de l'herpès. La forme sauvage s'intègre généralement dans le génome de l'hôte au niveau du chromosome 19. Cette spécificité est perdue pour les versions modifiées. Le génome de l'AAV code pour deux répétitions terminales inversées palindromiques entre lesquelles se situent les gènes *cap* et *rep*. Ces derniers codent respectivement pour des protéines de structures et des protéines nécessaires pour la réplication virale. Pour la construction de virus recombinant, le gène d'intérêt est inséré à la place de ces deux gènes. La taille de ce gène est ainsi limitée à seulement 4.5 kb. Lors de la production du virus, il se propage avec un virus helper et une lignée cellulaire d'emballage, capable de leur fournir les produits des gènes *cap* et *rep* délétés. A noter, que les fortes concentrations de la protéine Rep sont toxiques pour les virus helper mais aussi pour les cellules d'emballage, ce qui ne permet pas d'avoir des titres très élevés.

En dépit de ces limitations, les AAV possèdent de nombreux avantages tels que la capacité d'infecter à la fois les cellules en phase de mitose et les cellules quiescentes. De plus, ils peuvent transduire efficacement les cellules du cerveau, du foie et certaines cellules sanguines. En outre, ils sont sûrs d'usage car une réponse immunogène minimale est obtenue chez l'homme. Ils possèdent une gamme de tropisme raisonnable pour les différents types cellulaires et ils sont capables de cibler un certain nombre de tissus. Dans des tissus transduits par ce type de virus, l'expression du transgène est durable dans le temps [Carter 2000]. Dans le contexte des lignées cellulaires du cancer du pancréas, ces vecteurs ont été utilisés avec succès dans les travaux suivants de Peng [1997] et de Kasuya [2000].

☛ **Les Parvovirus murins (PV)** sont des virus à ADN simple brin linéaire d'environ 5 kb, flanqué de séquences terminales répétées inversées qui serviront lors de la réplication virale. Son génome possède deux phases ouvertes de lecture, l'une sous le contrôle du promoteur p4 codant pour les protéines non structurales NS1 et NS2 ; protéines de régulation et l'autre sous le contrôle du promoteur p38 codant pour les protéines structurales VP1 et VP2 ; protéines de la capsid. Bien que les hôtes naturels de ces virus soient les rongeurs, ils sont capables d'infecter les cellules humaines et présentent donc un potentiel intéressant pour des applications chez l'homme.

Le parvovirus présente deux propriétés non négligeables : oncolytisme et oncotropisme [Legrand 1993]. Cette première propriété est essentiellement due à la protéine NS1. L'activité oncotropique est due en partie à une infection préférentielle des cellules en cours

de division comme les cellules cancéreuses. Le virus trouve des conditions favorables à sa réplication, au moment de la phase S de la division cellulaire. Il utilise les facteurs de réplication présents dans la cellule hôte pour son propre cycle de division.

Des études ont démontré la possibilité de générer des parvovirus recombinants qui conservent le comportement oncotropique du virus sauvage. Ils peuvent donc servir d'outil pour cibler l'expression du transgène dans les tumeurs [Russell 1992]. Les gènes codant pour la capsid du virus sont alors remplacés par le gène d'intérêt. Mais la taille du transgène ne doit pas dépasser 1 kb, ce qui restreint considérablement son utilisation. ce type de virus a déjà été utilisé comme vecteur avec l'apoptine, une molécule induisant spécifiquement l'apoptose dans les cellules cancéreuses [Olijslagers 2001] ou des interleukines telles que IL-2 [El Bakkourri 2005].

Il convient de remarquer que le pouvoir oncolytique viral ne se limite pas aux parvovirus murins et qu'un certain nombre d'essais cliniques de phase I/II testant ce paramètre ont déjà été réalisés des HSV et certains adénovirus tels que ONYX-015 [Kasuva 2005].

#### b. Les Méthodes non virales

Le développement de méthodes de transfection de l'ADN est indispensable à l'essor de l'étude de la fonction des gènes et surtout de la réalisation de l'insertion de gènes thérapeutiques de façon transitoire ou stable dans la cellule. Beaucoup de techniques ont été développées et ont été appliquées sur une grande variété de cellules avec un succès variable. Les techniques non virales disponibles sont à ce jour, la méthode de co-précipitation au phosphate de calcium, le DEAE-dextran, les polymères et les lipides cationiques, l'électroporation et la microinjection. Les deux premières méthodes présentent une très forte toxicité au niveau de la cellule, c'est pour cette raison et par le fait de nombreuses études que seront développées les méthodes citées ci-dessous.

☛ **Les Polymères** sont des molécules organiques qui possèdent une très grande densité de charges cationiques permettant un emballage de l'ADN par liaisons ioniques. Ainsi, par exemple, le polyéthylénimine ou PEI qui est un polymère cationique linéaire ou ramifié, est un agent de transfection très efficace et largement utilisé pour des études de transfert d'ADN plasmidique dans les cellules mammifères [Godbey 1999]. Un atome sur trois de cette molécule est un résidu azote protonable, transformant le polymère en une « éponge à protons » à tous les pH physiologiques [Boussif 1995]. Cette propriété permet de tamponner le milieu endosomal et empêche la dégradation de l'ADN transfecté par le système lysosomal

[Kichler 2001]. L'expression réussie du gène transféré avec le PEI suppose que les complexes PEI-ADN ou polyplexes atteignent le noyau. Ces complexes pourraient être captés par la cellule *via* le phénomène d'endocytose [Kircheis 1997]. Cependant, le transport intracellulaire de l'endosome au noyau reste encore un mécanisme très ambigu. Bien que certains auteurs estiment que les complexes PEI-ADN atteignent les compartiments lysosomaux, sur le lieu où ils ont été libérés dans le cytoplasme [Lecocq 2000], d'autres argumentent pour une localisation lysosomale mais sans fournir vraiment une alternative concluante pour la compartimentation par laquelle les complexes atteignent l'espace cytoplasmique [Godbey 2000].

Une variété de molécules de PEI a déjà été testée pour leur efficacité de transfert de gènes. Certaines études se sont focalisées sur l'évaluation de l'influence de la transfection suivant deux paramètres : le poids moléculaire [Godbey 1999] et le degré de ramification [Wightman 2001]. Les résultats sont quelque peu contradictoires. Bien que pour Godbey et Col. [Godbey 1999], l'efficacité de transfection augmente avec le poids moléculaire sous des conditions *in vitro*, le groupe d'Abdallah note le contraire pour des expériences effectuées *in vivo* [Abdallah 1996]. Il en est de même concernant le deuxième paramètre ; le transfert de gène au niveau du rein de rat par injection dans l'artère rénale est plus important pour le PEI ramifié que pour la forme linéaire selon Boletta et Col. [Boletta 1997], alors que le groupe de Wightman trouve que la forme linéaire du PEI est plus efficace que la forme ramifiée sous les conditions *in vitro* et *in vivo* [Wightman 2001].

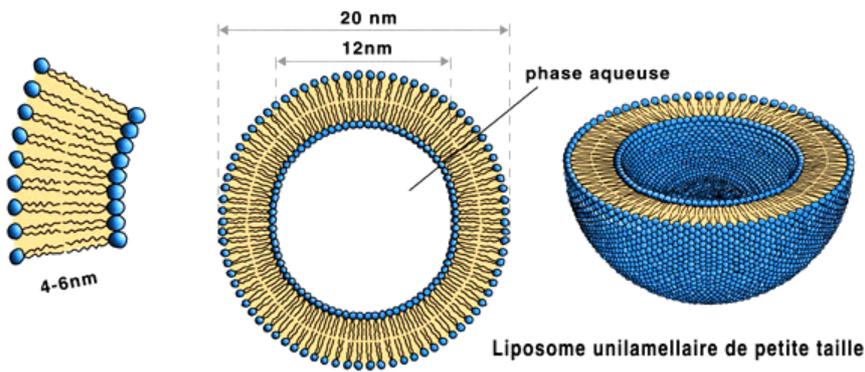
• **Les Liposomes** sont des microparticules de l'ordre de 30 nm à 10  $\mu$ m qui se présentent sous la forme de bicouches lipidiques sphériques et synthétiques (*Figure 10 et 11*).

Beaucoup de réactifs lipidiques utilisés actuellement pour la transfection sont développés et formulés suivant un mélange de deux types de lipides :

1- Un phospholipide cationique amphiphile comme :

- le 1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium propane ou DOTAP qui possède un groupe de tête, le triméthylammonium monocationique et deux chaînes hydrocarbonées insaturées dérivées de l'acide oléique. Il existe des formes analogues à cette molécule qui diffèrent uniquement au niveau de la partie non polaire par des chaînes hydrocarbonées saturées,

- le N-[1-(2,3-dioleoyloxy) propyl-N,N,N-triméthylammoniumchloride, ou DOTMA,

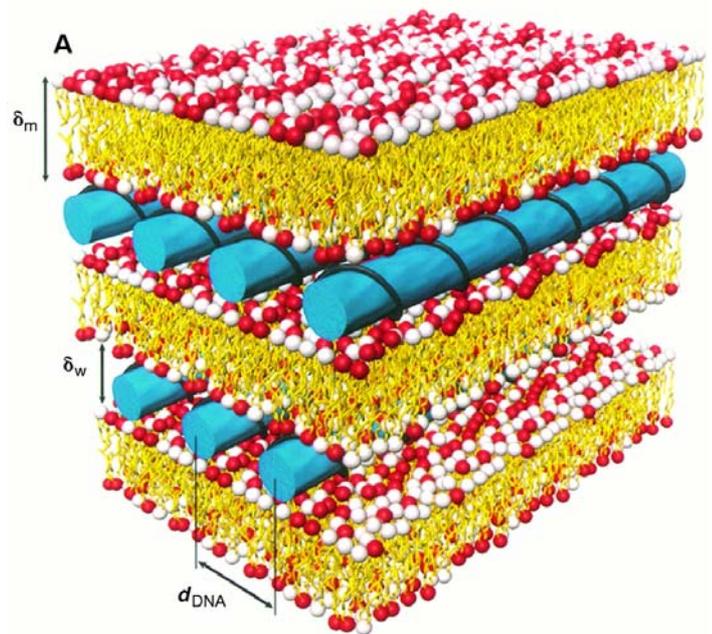


**Figure 10.** Coupe schématique d'un liposome.

Le liposome est une sphère creuse dont la paroi est formée d'une bicouche de phospholipides. Ils peuvent être obtenus par "sonication" d'un mélange d'un soluté aqueux et de phospholipides. Les phospholipides se réorganisent dans une configuration où l'énergie de l'ensemble est minimale, donc thermodynamiquement la plus stable. Les liposomes sont utilisés dans l'industrie cosmétique ou dans le génie génétique pour délivrer des composés à l'intérieur des cellules lorsque la vésicule fusionne avec la membrane plasmique.

**Figure 11.** Schéma de l'arrangement intérieur des complexes lipides-ADN.

Les molécules semi-flexible d'ADN sont représentées à l'échelle moléculaire par des tiges. Les liposomes sont composés de lipides neutres (en blanc) et cationiques (en rouge) ces derniers étant davantage concentrés au niveau de l'ADN.  $\delta_m$  correspond à l'épaisseur de la bicouche et  $d_{DNA}$  correspond à la distance interaxiale entre chaque



- le Phosphatidylcholine seul ou en combinaison avec le cholestérol pour obtenir une variété de molécules lipidiques amphipathiques comme par exemple le 3 beta [N-(N', N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyle] cholestérol (DC-chol).

2- Un phospholipide neutre et fusogénique comme le dioleoyl phosphatidyléthanolamine (DOPE) ou le dioléyl phosphatidylcholine (DOPC) [Bennett 1998, Smisterova 2001] ou le cholestérol. Ce « lipide helper » permet d'augmenter le pouvoir de transfection des lipides cationiques sauf dans le cas du DOTAP qui est utilisé seul. Le mécanisme par lequel le DOPE exerce son activité catalytique n'est pas encore bien défini, mais des premières évidences suggèrent que la proportion de la phase hexagonale formée joue probablement un rôle majeur [Smisterova 2001]. Ces molécules non-bicouche favorisent la fusion entre les complexes lipides-ADN ou lipoplexes et les membranes cellulaires telles que les membranes

endosomales. Cette interaction augmente le transfert des lipoplexes internalisés aux compartiments des voies endocytaires dans le cytoplasme [Farhood 1995].

L'ADN se lie donc aux lipides polycationiques par des interactions électrostatiques. Comme ces molécules ont la propriété de mimer les membranes biologiques, elles peuvent donc fusionner avec la membrane de la cellule cible, permettre l'endocytose des lipoplexes obtenus et la libération de l'ADN dans le cytoplasme. La délivrance de l'ADN dans le noyau est beaucoup plus difficile, ce qui explique l'expression transitoire du transgène.

En général, il existe une condition optimale de transfection suivant le rapport ADN plasmidique/liposomes cationiques pour chaque type cellulaire. Le rapport global des charges positives sur le lipide cationique suivant les charges négatives de l'ADN semble être une cause déterminante et critique pour l'optimisation de cette technique. Il est généralement accepté que l'efficacité de transfection restreinte à un rapport de charges élevées soit probablement due à la cytotoxicité induite par les lipides cationiques [Felgner 1987, Gao 1991]. A l'évidence, les caractéristiques physico-chimiques des complexes préparés avec des rapports variés sont si différentes que leur entrée dans la cellule puis leur trafic et enfin l'efficacité résultante de la transfection ne peuvent qu'en être significativement affectées. Cependant, la relation détaillée entre les facteurs physico-chimiques et les répercussions biologiques reste encore peu connue. Il n'est pas encore possible de prédire les résultats d'une lipofection à partir des caractéristiques biophysiques des liposomes et de leurs lipoplexes respectifs [Zuidam 1998], puisque de nombreux paramètres sont à considérer concernant la formulation des lipides mais aussi selon les plasmides d'expression, les lignées cellulaires, les conditions de culture cellulaire utilisés, etc...

Beaucoup de travaux récents ont pour but de définir une relation structure-fonction des lipides cationiques amphiphiles. Il apparaît nettement que les altérations dans la région hydrophobe de ces molécules influencent nettement l'efficacité de transfection. De plus, la réduction de la longueur de la chaîne acyle ou de son degré de saturation, lequel module généralement le niveau de fluidité membranaire, augmente souvent l'efficacité de transfert des lipoplexes [Felgner 1994, Bennett 1998].

Afin d'estimer l'efficacité de la transfection relative aux lipides utilisés, des gènes dit « reporter » sont utilisés comme celui de la luciférase, de la « green fluorescent protein » ou GFP, de la  $\beta$ -galactosidase et de la chloramphénicol acétyl transférase ou CAT. Le produit d'expression de ces gènes a la particularité d'être facilement mesurable aussi bien de façon

qualitative que quantitative, en réponse à un stimulus qui peut être un produit chimique spécifique ou un agent physique présent dans leur environnement. Cette approche, majoritairement basée sur l'imagerie optique sera développée ultérieurement au niveau du paragraphe 5.

Les avantages de l'administration des complexes Liposomes/ADN *in vivo* sont :

- ⤴ La facilité d'obtention de ces lipoplexes en quantité importante,
- ⤴ Un haut niveau de sûreté du fait du non-usage de virus,
- ⤴ Une absence d'immunogénéicité,
- ⤴ La capacité de délivrer des gènes de tailles non limitées [Felgner 1989]. Malgré toutes ces propriétés profitables bénéfiques profitables pour leur utilisation chez le vivant, il existe des inconvénients majeurs à ne pas sous-estimer comme la faible efficacité du transfert de gène (en comparaison à celle obtenue avec les virus), le manque de spécificité au niveau du ciblage et l'absence de mécanismes permettant de maintenir l'ADN dans les cellules.

Approximativement 20% de tous les essais cliniques impliquant un transfert de gène emploient les lipoplexes. Durant ces dix dernières années, beaucoup d'études physiques et biologiques sur la formulation ont été effectuées [Gershon 1993, Ferrari 1998] avec comme objectif d'améliorer notre compréhension du procédé de lipofection et de son mécanisme. En dépit de recherches intensives, nous ne disposons que de peu d'éléments sur les changements de structures de l'ADN lors de la formation des lipoplexes, sur les facteurs qui permettent de telles modifications ainsi que sur l'influence de l'efficacité de transfection. L'utilisation de systèmes de lipides cationiques pour la transfection *in vivo* est compromise par un certain nombre de problèmes substantiels largement dépendants de la voie d'administration des complexes lipides-ADN. Ainsi par exemple, pour l'administration systémique de ces lipoplexes qui a pour conséquence une clearance rapide due à une déstabilisation provoquée par les interactions avec les protéines du sérum [Li 1999]. Cet obstacle a incité à développer des particules lipidiques stabilisées dans lesquelles des chaînes de poly(éthylène glycol) ou PEG sont conjuguées à la surface des préparations de lipoplexes pour fournir une protection stérique [Saravolac 2000]. D'autres recherches concernent le développement de préparations beaucoup plus stables. Pour l'instant, la majorité des protocoles de transfection nécessite la préparation extemporanée des lipoplexes afin d'éviter les problèmes d'agrégation des complexes. Schmid et Col. [1998], après injection de lipoplexes lac Z dans

l'artère et le canal pancréatique de rat, relèvent la persistance d'une expression limitée du transgène 28 jours après son administration.

### c. Les Méthodes Physiques

Le transfert du matériel génétique peut être également effectué par des méthodes physiques. Il n'est en effet pas nécessaire de recourir à des méthodes sophistiquées pour transférer l'ADN *in vivo*.

• **La Microinjection d'ADN** : l'ADN est directement injecté par voie intra-musculaire ou par le biais d'un « fusil à gène » (gene gun) qui bombarde à vitesse élevée, l'épiderme de micro-particules d'or complexées à l'ADN voulu. L'utilisation de l'ADN nu pour la vaccination *in vivo* présente des résultats très prometteurs [Kouraklis 1999]. Bien que directes et sans danger, ces méthodes sont limitées par leur faible efficacité de transduction [Cheng 1993].

• **L'Electroporation (EP)** est le résultat de la réorientation des molécules lipidiques de la membrane cellulaire pour former des pores hydrophiles transitoires sous l'action d'un champ électrique appliqué sous forme de pulses de très brève durée [Neumann 1982]. La distribution de ces pores suivant leur taille et leur nombre, détermine les propriétés électriques de la membrane. De ce fait, ils permettent une plus grande perméabilité à une grande variété de composés qui sont normalement incapables de pénétrer dans la cellule. Une fois formés, ces pores restent ouverts pendant une période dont la durée, relative à celle du pulse, s'étend de quelques secondes à quelques minutes. L'EP est donc utilisée comme un outil de transfert d'agents chimio-thérapeutiques ou d'ADN dans les cellules tumorales [Tsong 1991]. Cette méthode, dénuée d'effets sur la molécule insérée, facilite son entrée et augmente son transport dans la cellule. L'électro-chimiothérapie permet une injection localisée de la drogue en perméabilisant grâce aux champs électriques utilisés, les cellules tumorales cibles. Cette méthode permet de réduire la quantité de l'agent anticancéreux administré. Ainsi ce type d'approche pourrait se substituer à la chimiothérapie systémique des tumeurs, évitant au patient des nombreux effets secondaires associés à ce mode de traitement. Dans le cadre de la thérapie génique des cancers, l'électroporation pourrait aussi s'avérer un outil intéressant pour transférer des gènes suicides ou des gènes immunostimulateurs directement dans des tumeurs accessibles [Rols 1998].

### 3. Le Ciblage

Le ciblage direct du transfert de gène dans les cellules tumorales est le but premier de la thérapie génique. Il améliorerait l'effet thérapeutique en évitant d'affecter les tissus sains et en diminuant le risque de transduction au niveau de la lignée germinale. Le ciblage peut être réalisé soit lors de l'introduction du gène soit au niveau de l'expression du dit gène.

#### a. Le ciblage lors de l'introduction du gène

Le simple fait d'injecter les différents vecteurs de transfert directement dans la tumeur est un ciblage. Ceci est facilité par les différentes méthodes physiques développées précédemment.

#### b. Le ciblage au niveau de l'expression du gène

Ce type de ciblage peut-être régulé au niveau de la transcription dans les cellules néoplasiques en utilisant des éléments régulateurs tels que les promoteurs ou des enhanceurs, spécifiques des cellules tumorales. L'incorporation de ces séquences dans les vecteurs d'expression contenant le gène à visée thérapeutique, entraîne l'expression sélective du gène dans les cellules tumorales et non dans les cellules saines.

Différents types de promoteurs peuvent être utilisés. En général, pour la thérapie génique des cancers, il s'agira de ceux des marqueurs tumoraux dont la surexpression serait liée à une modification transcriptionnelle. Ces promoteurs comprennent, entre autres exemples, le promoteur du gène de la tyrosine dans le mélanome [Vile 1993], le promoteur de l'ACE dans les cancers du pancréas et du colon [Richards 1995, Deharvengt 2005], le promoteur de Muc1 pour le cancer du sein [Cheng 1995] et potentiellement la région promotrice du gène hTERT.

- La protéine MUC1 est une mucine hautement glycosylée, trouvée normalement à la surface apicale des cellules épithéliales sécrétant la mucine dans de nombreux types de tissus. L'apparition d'un cancer au niveau du sein, de la prostate, du poumon, du pancréas, de l'ovaire, de l'utérus ou d'autres types de cancer peut s'accompagner de la surexpression de l'antigène MUC1 par les cellules tumorales [Kim 1996]. La protéine MUC1 surexprimée par les cellules tumorales est moins glycosylée que la forme normale de MUC1, révélant de nouveaux épitopes antigéniques de peptides et d'hydrates de carbone. De plus, la forme tumorale est exprimée sur l'ensemble de la surface cellulaire [Nakamura 2002].

- La télomérase est un complexe ribonucléoprotéique composé d'une amorce ARN et de plusieurs protéines associées, formant ainsi la sous-unité catalytique appelée hTERT. Cette enzyme est très active dans les lignées cellulaires immortalisées et dans plus de 85% des

cancers humains, mais elle reste inactive dans les cellules normales [Kim 1994, Shay 1997]. Le promoteur de la télomérase a déjà été utilisé avec succès pour cibler l'expression de gènes pro-apoptotiques tels que bax [Gu 2002] et de « gènes suicides » tels que le système eCD/5-Fc [Liu 2002].

Néanmoins bien que les résultats rapportés sur ces promoteurs plaident en faveur de la faisabilité, ils ont aussi révélés quelques limitations à leur application. Actuellement, la plus importante qui a été observée pour tous les promoteurs utilisés lors du ciblage est leur faible activité transcriptionnelle. En effet, cette activité est beaucoup moins importante que celle des promoteurs viraux usuels tels que celui du cytomégalovirus (CMV), du virus du sarcome de Rous (RSV-LTR) et du virus SV40. L'activité des promoteurs spécifiques peut être augmentée en présence de facteurs de transcription [Gu 2002] ou par le rajout de séquences promotrices telles que celles du système GAL4/TATA ou GT [Koch 2001] ou de gènes inductibles lors d'un stress comme l'hypoxie, la chaleur ou la privation de glucose. L'usage de tels promoteurs pour la thérapie génique des cancers est très attractif car ils dépendent de la biologie de la tumeur elle-même où ils sont déjà induits de manière endogène ou par de nombreuses modalités thérapeutiques. Parmi ces gènes du stress, surrégulés dans ces conditions, citons les gènes MDR-1 (multidrug resistance gene-1), HSP (human heat shock protein), VEGF (vascular endothelial growth factor), irradiation-inducible *Egr-1* (Early growth response gene) et du promoteur du tissu plasminogène activator (*tpa*) [Haviv 2001].

Un autre aspect du ciblage est l'utilisation de virus oncolytiques déjà mentionnés précédemment qui se répliquent spécifiquement et sélectivement dans la tumeur. Dans ce cas, les éléments E1 essentiels à la réplication du virus sont sous contrôle de promoteurs spécifiques [Kawashima 2004], d'interleukines comme IL-24 [Zhao 2005] ou de la mutation du gène p53 comme pour le cas de l'adénovirus ONYX [Reid 2005].

## V. DETECTION

### A. Les Moyens Actuels

La sensibilité et la spécificité de l'échographie réalisée dans de bonnes conditions techniques ainsi que la tomodensitométrie (TMD) pour le diagnostic du cancer du pancréas, sont voisines de 80%. Ces examens permettent d'explorer le pancréas et les organes de voisinage et de rechercher ainsi les métastases hépatiques, une ascite ou une carcinose

péritonéale. L'échographie, moins coûteuse que la TMD, plus facilement disponible et n'exposant pas à des radiations ionisantes, doit être réalisée en première intention. Néanmoins, l'exploration pancréatique par échographie est souvent gênée par la présence d'air dans les structures digestives qui se projettent en avant du pancréas (colon, estomac, intestin grêle). Si l'échographie n'est pas instructive, le scanner voir l'IRM doivent être effectués.

### 1. Echographie abdominale

Elle affirme une éventuelle dilatation des voies biliaires intra et extra- hépatiques avec une grosse vésicule. Le syndrome tumoral se traduit par des modifications de forme et de taille du pancréas qui s'apprécient surtout grâce à la mise en évidence des repères vasculaires rétro-pancréatiques. Ces signes ont d'autant plus de valeur qu'ils s'accompagnent d'anomalies de l'échogénéicité. Le cancer du pancréas apparaît en général sous forme d'une lésion hypoéchogène, très rarement sous forme d'un nodule hyperéchogène. Même en l'absence d'un syndrome de masse, ces anomalies de l'échogénéicité gardent une grande signification pathologique. Sauf cas particulier, seules les masses de 2 cm ou plus peuvent être détectées. La dilatation du canal de Wirsung, lorsqu'elle existe, est presque toujours reconnue et a une grande valeur. Une thrombose portale est également bien vue en échographie ou en échodoppler.

### 2. Scanner ou Tomodensitométrie

Cet examen est très utile chaque fois que l'échographie ne permet pas de diagnostic formel. Il est indispensable avant traitement chirurgical. Les lésions de 2 cm de diamètre ou plus sont généralement visualisées. La modification du canal de Wirsung est facilement repérée. Après injection, il est réalisé une étude vasculaire de la lésion et des axes vasculaires juxta-pancréatiques. Les coupes doivent suivre la dilatation cholédocienne sur toute sa hauteur permettant de définir le siège de l'obstacle. L'extension tumorale aux gros troncs juxta-pancréatiques (tronc porte, pédicule mésentérique, pédicule splénique) est appréciée.

### 3. Cholangiopancréatographie rétrograde endoscopique (CPRE) et cholangiopancréatographie IRM

La CPRE a une sensibilité et une spécificité de 90% pour le diagnostic du cancer du pancréas. Elle permet une double opacification canalaire : la Wirsungographie peut montrer une interruption brutale de la progression du produit de contraste ; la cholangiographie peut

révéler, lors de cancers céphaliques, une sténose du cholédoque intra-pancréatique surmontée d'une dilatation des voies biliaires. Dans cette situation, le risque élevé d'angiocholite secondaire à l'examen impose une décompression rapide des voies biliaires. Actuellement cet examen a tendance à être remplacé par une exploration non invasive, la cholangiopancréatographie IRM. Cette IRM avec injection de produit de contraste permet en effet de retrouver les images tumorales lorsqu'elles mesurent au moins 1,5 ou 2 cm de diamètre. Elle permet également de visualiser le Wirsung et la voie biliaire principale en montrant des images d'arrêt ou de rétrécissement en rapport avec le processus tumoral.

#### 4. Echoendoscopie

Cet examen peut être utile pour le diagnostic du cancer du pancréas mais aussi pour un bilan d'extension loco-régionale avec une sensibilité supérieure à 90%. C'est principalement pour la détection des petites tumeurs que cet examen est supérieur à l'échographie, au scanner et à l'IRM.

#### 5. Imagerie par Résonance Magnétique

Cet examen est plus long et plus coûteux et n'apporte pas de performance particulière par rapport au scanner en-dehors d'appareils de dernière génération qui avec le bilan dit « tout en un » permettent de visualiser à la fois le pancréas, le wirsung, les voies biliaires et les vaisseaux péri-pancréatiques à la recherche d'une invasion tumorale, par exemple de l'axe veineux mésentérico-portal.

#### 6. Cytoponction pancréatique

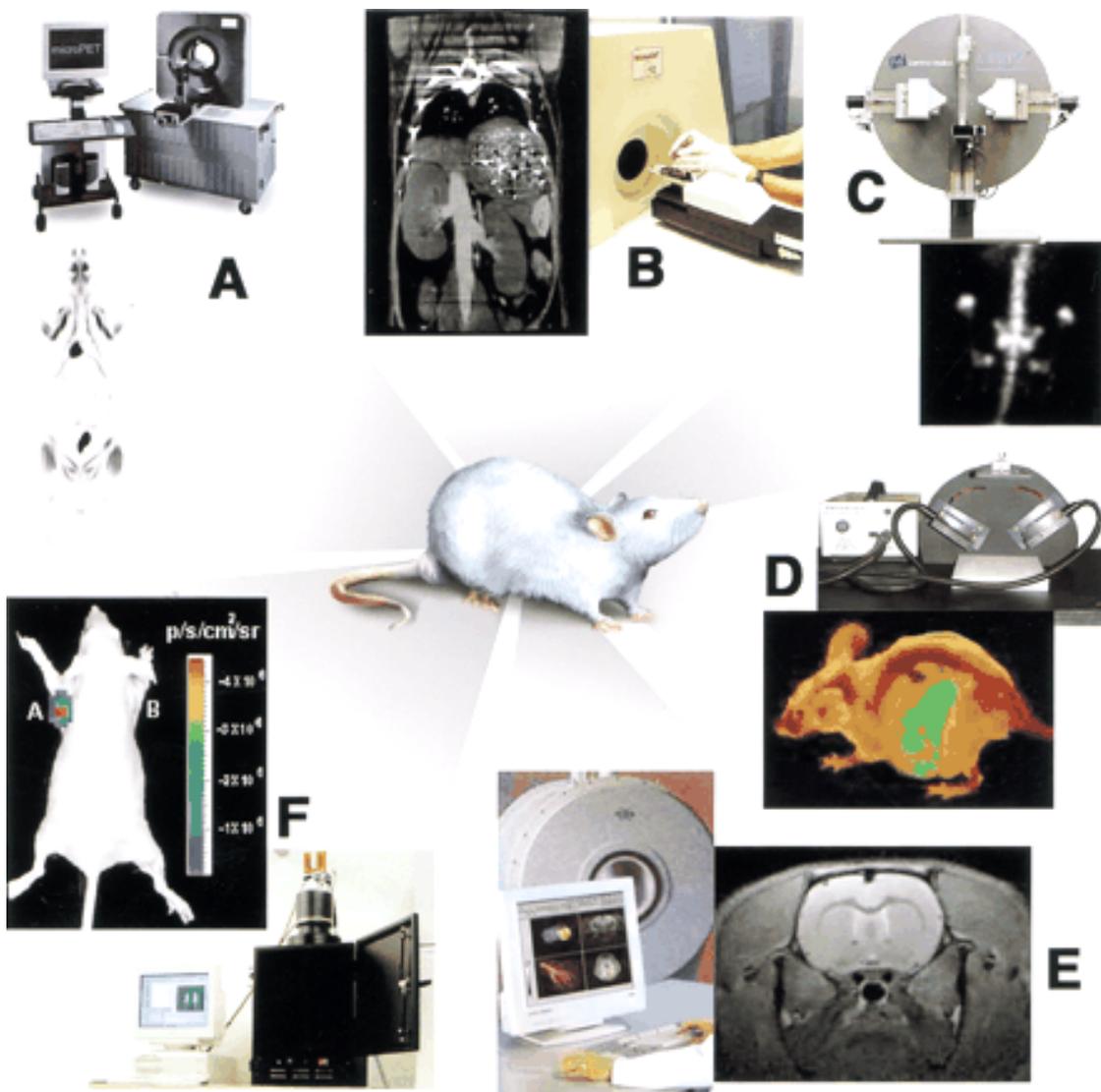
La cytoponction à l'aiguille fine par voie percutanée sous guidage échographique ou scannographique des lésions suspectes a une sensibilité de 70 à 80% et une spécificité de 100%. Les complications de cette technique sont rares et les disséminations sur le trajet de l'aiguille exceptionnelles mais ce risque ne peut être complètement exclu. Ce mode de prélèvement permet une étude cytologique et éventuellement histologique par l'intermédiaire d'une micro-biopsie.

Par ailleurs, la localisation de la tumeur dans le corps de la glande rend très difficile la détection précoce et exige l'utilisation de techniques d'investigations très sophistiquées. Pour ce faire, de nouvelles technologies sont à développer, et ceci notamment par l'intermédiaire de l'expérimentation animale, discipline dans laquelle l'imagerie fait l'objet d'un développement fulgurant.

## B. De nouvelles Technologies d'imagerie pour le petit animal

Le séquençage du génome de mammifères de laboratoire (souris, rat) ainsi que les connaissances avancées sur la physiologie du rat et le développement de modèles animaux de plusieurs maladies démontrent une maturité des connaissances dans le domaine de la biologie. L'exploitation pertinente de ces connaissances réclame des investigations *in vivo* et non invasives des systèmes biologiques. A ce titre, l'imagerie anatomique et fonctionnelle du petit animal de laboratoire permet de réaliser une exploitation en recherche plus efficace des connaissances acquises sur les modèles animaux [Hume 1998].

En effet, les relations entre les informations fonctionnelles et anatomiques ne sont obtenues classiquement que *post-mortem* après autopsie et analyse histo-pathologique de l'animal d'expérience. Cette démarche présente un certain nombre de limites significatives. L'une des plus marquantes est sans contexte le sacrifice de l'animal excluant ainsi la possibilité de suivre de façon répétée, et donc dynamique, l'évolution individuelle des processus biologiques. Dans ce cas, les corrélations entre les informations anatomiques et fonctionnelles ne sont obtenues qu'à un instant donné, celui du sacrifice de l'animal.



**Figure 12.** Les différents dispositifs d'imagerie du petit animal avec les images correspondantes.

**(A)** Image de coupe coronale par micro-PET d'un rat montrant la présence du traceur  $^{18}\text{F}$ FDG dans les tissus tels que les muscles, le cœur, le cerveau et son accumulation dans la vessie dû fait de sa clearance rénale.

**(B)** Image de coupe coronale par micro-CT de l'abdomen d'une souris après injection I.V. d'un produit de contraste iodé.

**(C)** Image par micro-SPECT de l'abdomen et de la région pelvienne d'une souris après injection  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  méthylène de diphosphonate montrant la colonne vertébrale, le bassin, les fémurs et les genoux du fait de l'accumulation osseuse du traceur.

**(D)** Image optique de fluorescence d'une souris montrant la présence de fluorescence de la GFP au niveau du foie. Cette souris a été injectée avec des cellules tumorales exprimant la GFP. *Images du Dr. Hoffman, Anticancer Inc.*

**(E)** Image de coupe coronale de cerveau de souris par micro-IRM.

**(F)** Image optique de bioluminescence d'une souris avec une tumeur en sous-cutanée du côté gauche exprimant la luciférase Renilla, après injection dans la veine de la queue du substrat coelenterazine. Les images sont recueillies par une caméra CCD refroidie. L'image couleur obtenue dans le visible est superposée à celle de la souris avec une échelle d'intensité de luminescence (en photons par seconde, par centimètre carré et par stéradian).

Dans ce contexte, plusieurs méthodes non invasives d'imageries (*Figure 12*) ont été décrites, permettant l'exploration anatomique et/ou fonctionnelle des petits animaux de laboratoire [Ploux 1998]. Ces appareils d'imagerie, à l'interface entre la physique et la biologie, permettent d'explorer de manière plus pertinente le vivant. L'imagerie du petit animal de 20 grammes est très différente de celle pour une personne de 70 kg avec la prise en compte de la taille de l'objet, du volume total, de la résolution spatiale (en voxels) nécessaire pour obtenir des données significatives *in vivo* et du temps total nécessaire pour l'acquisition d'une image. L'appareillage utilisé reflète donc cette différence et son exploitation donne un maximum d'informations concernant le stade évolutif de la maladie sur les animaux.

### 1. Imagerie par Rayons X

Cette méthode a été la première proposée et longtemps la seule, le paramètre indirectement mesuré étant le coefficient d'atténuation des rayons X des différents tissus. La radiographie conventionnelle consiste à projeter tout un volume sur un plan représenté par le film radiographique. L'image ainsi obtenue traduit la densité électronique qui n'est pas différente entre les tissus sauf pour l'os, raison pour laquelle reste la technique de référence pour l'imagerie osseuse. L'utilisation de produits de contraste iodés permet de visualiser les tissus mous en fonction de leur vascularisation et l'utilisation d'un micro-scanner permet d'acquérir des images morphologiques de référence pour le petit animal. Le scanner X ou tomodynamomètre TMD a été la première méthode d'imagerie permettant la

visualisation de tous les organes en coupes précises. Il consiste à acquérir des projections multiples d'une coupe qui sera reconstruite par calcul à partir de ces projections. Alors que les premières images étaient acquises en 1 minute par coupe, les appareils les plus récents fournissent 16 à 32 images de coupes par seconde. La rapidité et l'accessibilité des systèmes, font que le scanner est actuellement préféré à toute autre méthode tomographique anatomique.

La résolution est de l'ordre de 50  $\mu\text{m}$ , mais il faut garder en mémoire que l'image représente la distribution d'un produit de contraste dont la concentration est élevée ; un avantage du petit animal sur l'homme est que les doses de rayonnements utilisables peuvent être 100 fois plus élevées sauf si l'étude porte sur la cancérogenèse. Toutefois, l'inconvénient majeur reste une irradiation non négligeable due à l'utilisation de rayonnements ionisants.

## 2. Imagerie Nucléaire

Elle utilise des radio-éléments pour marquer des molécules d'intérêt introduites dans l'organisme à titre de traceurs, dont l'image en scintigraphie représentera la distribution spatiale. Le paramètre mesuré est alors la fixation de ce traceur dans les différents éléments de volume des organes et la signification des images ne peut-être donnée qu'en référence au traceur utilisé. Les méthodes et les molécules différeront selon que l'on utilise des émetteurs  $\gamma$  (tomographie simple photon) ou  $\beta^+$  (tomographie d'émission de positons). L'utilisation d'isotopes radioactifs permet à l'imagerie d'accéder à une dimension vraiment fonctionnelle dans la mesure où la molécule marquée possède toutes les caractéristiques d'un traceur. La tomographie d'émetteur simple photon (SPECT) utilise chez l'homme principalement le  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , mais le marquage de molécules spécifiques est particulièrement difficile du fait de la chimie complexe du technétium. Là encore, si les effets à long terme des radiations ionisantes ne sont pas préoccupants, il est possible de marquer un grand nombre de molécules avec l'iode 131 dont la période est de 8 jours ce qui ouvre un champ d'investigation extrêmement vaste. La résolution spatiale qui peut-être obtenue est de l'ordre du mm mais il faut tenir compte de l'efficacité de la détection qui est faible du fait de la nécessité d'utiliser un collimateur.

Une autre approche consiste à utiliser les isotopes radioactifs des atomes de carbone, d'oxygène, d'azote ou de fluor qui sont des émetteurs de positons (PET). La détection de la coïncidence des 2 rayons de 511 keV émis lors de l'annihilation du positon permet de se passer du collimateur et augmente considérablement l'efficacité de la détection. L'avantage

pour les biologistes d'utiliser ces isotopes est de disposer d'un véritable traceur dont la formule chimique est strictement identique à la molécule étudiée. L'inconvénient est que cette méthode nécessite une étape de radiochimie particulièrement difficile dans la mesure où la durée de vie de ces isotopes est très brève ( $^{11}\text{C}$   $T_{1/2}=20$  min). La résolution de ce type d'image est de l'ordre du mm à l'échelle de la picomole de traceur.

### 3. Imagerie par Ultrasons

Cette méthode consiste à mesurer les échos d'une onde ultrasonore, réfléchiée par les interfaces entre les différents tissus. Si le délai entre l'envoi de l'impulsion et le recueil de l'écho permet de localiser précisément l'interface, le paramètre mesuré est lui moins évident à définir puisque ce qui caractérisera un tissu donné, c'est l'échogénicité c'est-à-dire la quantité d'échos renvoyés par un tissu et donc en quelque sorte son degré d'hétérogénéité [Turnbull 1995]. Par ailleurs, en mesurant le décalage de fréquence entre l'onde émise et l'écho reçu, l'échographie donne des informations sur le déplacement des structures et surtout du sang au moyen de l'effet Doppler.

La petite taille de la souris peut être utilisée comme un avantage dans le design de ce type d'instrumentation. Utilisant des transducteurs de fréquence de gamme de 40-50 MHz, 20-40  $\mu\text{m}$  axiale et 50-100  $\mu\text{m}$ , des images d'embryons *in utero* sont alors possibles [Baldwin 1995]. L'imagerie à ultrasons comme celle en CT est un outil pour obtenir des images anatomique et physiologique ou pour des interventions en temps réel avec une résolution en dessous du mm. Son rôle dans l'imagerie moléculaire inclut l'évaluation de souris transgéniques sur la plan anatomique mais aussi comme un guide dans la délivrance du transgène où les deux méthodes peuvent être appliquées au cours des phase de développement précoce et *in utero* [Gaiano 1999].

### 4. Imagerie par Résonance Magnétique

Cette technique, dernière-née des méthodes en diagnostic clinique, consiste à mesurer, par le phénomène de Résonance Magnétique Nucléaire ou RMN, l'aimantation créée en chaque voxel par « l'alignement » des aimantations des noyaux d'hydrogène placés dans un champ magnétique intense. Cette méthode permet l'acquisition de coupes dans toutes les incidences, avec de multiples contrastes dépendant non seulement du module de l'aimantation en chaque élément de volume, mais aussi des temps de relaxation de cette aimantation. Ce signal est

modulé par le temps de relaxation (longitudinal et transversal) qui donne aux images RMN un contraste proche de celui des coupes anatomiques.

Une résolution de l'ordre de 100  $\mu\text{m}$  peut être atteinte avec des temps de pose inférieurs à 20 minutes, à condition d'utiliser des champs supérieurs à 4 Tesla (T). Le Tesla, tiré du nom du physicien Nikola Tesla, est l'unité dérivée d'induction magnétique du système international (SI). Des champs supérieurs à 10 T sont utilisés pour augmenter la résolution vers 50  $\mu\text{m}$ , mais les artéfacts de susceptibilité magnétique restreignent les zones exploitables. L'ensemble des méthodes d'imagerie développées chez l'homme est transposable au petit animal y compris la spectroscopie où la diminution de la taille peut être compensée par l'allongement de la durée d'examen. L'IRM fonctionnelle fondée sur la variation de la teneur en désoxyhémoglobine paramagnétique lors d'une activation, est en cours de développement pour le rat. Pour la souris, il faudra vraisemblablement utiliser des champs magnétiques de l'ordre de 20 T. Le niveau de résolution de l'IRM en imagerie du petit animal ouvre des perspectives d'examen intéressante. Le groupe de microscopie de Duke montre des images de cerveau de souris suivant une résolution de 50x50x50  $\mu\text{m}$  en 2 à 3 heures [Benveniste 1999]. Les images de cœur de souris ont été obtenues à une résolution de 120x120x1000  $\mu\text{m}$  en utilisant 7 T pour un temps total de quinze minutes [Ruff 1998, Slawson 1998]. Enfin, cette technique ne fait intervenir aucun rayonnement ionisant et en dehors des dangers d'objets métalliques attirés dans le champ magnétique, l'innocuité de la méthode est maintenant reconnue.

## 5. Imagerie optique ou dans le domaine du visible

L'image photographique et surtout cinématographique d'un animal fournit des informations fortement utiles à l'étude du comportement des animaux qui reste la modalité de référence de l'étude du système nerveux centrale de l'animal. L'endoscopie permet de visualiser les cavités de l'organisme soit directement (bronchoscopie, coloscopie, ...) soit après une petite incision (laparoscopie). Les techniques d'endoscopie sont peu développées chez l'animal du fait de la nécessité de la miniaturisation des endoscopes.

Cependant cette technique appliquée aux cancers reste un challenge intéressant car les cellules tumorales ne possèdent pas de qualité optique spécifique, les distinguant du tissu normal. Aussi l'imagerie optique conventionnelle est limitée par une forte absorbance et une importante dispersion de la source lumineuse par le tissu entourant l'objectif. Avec pour résultat, que ni la sensibilité ni la résolution spatiale des méthodes actuelles ne sont

suffisantes pour obtenir des images précoces de croissance tumorale ou de métastases [Taubes 1997]. Les tentatives antérieures visant à doter la tumeur de marqueurs spécifiques et détectables dans l'animal, ont rencontré pour la plupart, un faible succès. Ce type de marquage utilise des anticorps monoclonaux ou d'autres molécules à haute affinité dirigées contre les marqueurs associés aux tumeurs. Cependant, les résultats restent limités, ceci en raison du faible contraste entre la tumeur et le bruit de fond présent mais aussi à la toxicité des procédures utilisées.

Une avancée conceptuelle importante pour l'imagerie optique est d'utiliser la tumeur cible comme source lumineuse. Ceci rend caduque le problème de la dispersion incidente de la lumière. Pour ce faire, les gènes dits « reporters » peuvent constituer un outil formidable à condition que leur détection soit convenable. Ces gènes sont définis comme des gènes « marqueurs » dont les produits d'expression sont facilement mesurables aussi bien de façon qualitative que quantitative. Les deux principaux gènes utilisés pour ces applications sont le gène de la luciférase et celui de la green fluorescent protein (GFP). Ainsi se distinguent deux techniques d'imagerie optique, les plus couramment utilisées actuellement qui sont celles de bioluminescence qui reposent sur l'utilisation de molécules qui émettent naturellement des photons après injection d'un substrat donné et les techniques de fluorescence qui s'appuient sur la détection de fluorochromes après excitation trans-cutanée par un laser. Dans les deux cas, ces techniques sont particulièrement bien adaptées au suivi des cellules. Nous disposons en effet la possibilité de « construire » des cellules qui vont synthétiser une « enzyme bioluminescente » comme la luciférase ou une molécule fluorescente ; la plus connue étant la Green Fluorescent Protein ou GFP)

#### a. La Luciférase

La luciférase est un nom générique donné à une enzyme qui catalyse une réaction lumineuse. Ces gènes biolumineux sont présents de nombreux organismes tels que les bactéries, les algues, les méduses, les insectes, la crevette et le calmar. La lumière qu'elle produit dans ces organismes est bien connue, c'est le phénomène de bioluminescence qu'affectionnent beaucoup de créatures abyssales. Beaucoup de ces gènes dont celui de la luciole, ont été modifiés pour obtenir une expression optimale dans les cellules animales. Depuis de nombreuses années ces gènes sont utilisés dans les biotests pour la quantification de l'ATP et pour l'étude de l'expression des gènes au cours de la transfection [Wood 1995]. Dans certaines conditions, ces tests permettent d'augmenter d'un facteur 100 à 1000, la

sensibilité par rapport à un test colorimétrique. La luciférase catalyse la transformation d'un de ses substrats, la D-luciférine (acide D-(-)-2-(6'-hydroxy-2'-benzothiazolyl) thiazone-4-carboxylique) en oxylluciférine dans une réaction ATP-dépendante, donnant lieu à l'émission de photons qui peut être détectée par des appareils sensibles à une faible intensité lumineuse comme le luminomètre.

La détection *in vivo* des cellules marquées par le gène luc est extrêmement sensible. Le signal lumineux recueilli est supérieur au bruit de fond pour plus de 1000 types de cellules tumorales humaines greffées dans la cavité péritonéale de souris [Contag 1998] avec une relation linéaire entre le nombre de cellules et l'intensité du signal supérieure à cinq logs. Cette sensibilité constitue l'avantage majeur de cette technique. Les applications les plus prometteuses se trouvent probablement dans le domaine du diagnostic médical. L'insertion du gène luc dans une lignée cellulaire épithéliale (carcinome) permet par exemple de diagnostiquer des cellules tumorales chez une souris vivante en balayant simplement la zone avec une caméra CCD. Ce système permet un traitement chimiothérapeutique rapide et une surveillance en temps réel de ce traitement [Contag 2000]. Dans un autre exemple, le gène luc a été inséré dans des lignées de cellules cancéreuses du sein afin de développer un test biologique pouvant détecter et mesurer les substances ayant une activité estrogénique (liée à la grossesse) et anti-estrogénique potentielle [Chooniedass-Kothari 2005].

#### b. La green fluorescent protein (GFP)

La protéine fluorescente verte (GFP) est une photoprotéine extraite, à l'origine, de la méduse *Aequorea Victoria*. La protéine GFP est un polypeptide simple chaîne de 238 acides aminés et de 27 kDa [Prasher 1992]. La séquence clé de Ser-Tyr-Gly située au niveau du 65-67<sup>ème</sup> acide aminés, non loin de la position N-terminale, a une fonction de fluorophore [Cody 1993]. Ces trois acides aminés subissent spontanément une oxydation pour former un chromophore cyclique responsable de la fluorescence de la GFP [Inouye 1994, Heim 1994]. Cette protéine produit donc un signal fluorescent vert à 510 nm, mais sans l'apport de substrat exogène. Tout ce qui est exigé pour obtenir cette fluorescence, est une source de la lumière UV afin d'exciter la photoprotéine.

Il est possible de modifier la GFP pour qu'elle produise des émissions fluorescentes différentes et beaucoup plus intenses que celle dans le vert telles que cyan, rouge ou jaune permettant de l'utiliser comme détecteur polyvalent sur plusieurs cibles différentes. Une large variété de variantes de la GFP, distinctes au niveau de leur spectre a été créée par

mutation du chromophore ou des acides aminés voisins. Le plus grand déplacement vers le rouge observé au niveau de ces variants est de 17 nm, avec un pic à 527 nm. En 1999, Matz et Col. présentent six nouvelles protéines fluorescentes homologues à la GFP qui ont été clonées à partir des anthozoaires [Matz 1999]. Ces protéines montrent une diversité de couleurs inattendues telles que le jaune, le rouge et le cyan. La protéine rouge (RFP) isolée du corail *Discosoma sp.* est des plus intéressantes pour ce type d'application. Son émission est déplacée dans le rouge par 73 nm par rapport à la GFP, ceci étant dû à une structure covalente différente du fluorophore ou différentes interactions avec des protéines structurées de la matrice. Cette protéine fluorescente est utilisée préférentiellement pour plusieurs considérations importantes. Elle possède une fluorescence plus brillante que celle de la GFP [Bouvet 2000]. De plus, sa fluorescence émise dans le rouge est beaucoup plus tumeur-spécifique que celle dans le vert car la peau et les poils de la souris aussi bien que la bile et les urines présentent une auto-fluorescence importante dans les conditions d'excitation de la GFP. Cette amélioration de la qualité optique permet en conséquence une acquisition plus fiable des images de petites tumeurs sans nécessité d'ouvrir l'animal ou autres manipulations [Yang 2002].

L'utilisation de la GFP permet de rendre les tissus cibles fluorescents et visibles de l'extérieur. Pour ce faire, le gène de la GFP est exprimé de façon stable dans les cellules tumorales et il est utilisé comme un marqueur effectif de ces cellules dans les dissections conventionnelles. La sensibilité de cette fluorescence permet d'illuminer la progression de la tumeur et la détection des métastases dans les organes exposés ou isolés [Hasegawa 2000, Hoffman 2002] et dans les tissus au niveau cellulaire [Chishima 1997]. Traquer *in vivo* les cellules cancéreuses qui expriment de façon stable la GFP est beaucoup plus sensible et rapide que les procédés traditionnels et encombrants d'histologie ou d'immuno-histochimie. L'avantage majeur de l'utilisation de ces cellules est que le système d'imagerie ne nécessite pas des procédures de préparation et il est donc uniquement approprié à la visualisation des tissus vivants. L'utilisation de ce gène concrétise la possibilité de réaliser une imagerie optique de fluorescence en temps réel, non invasive car externalisée et portant sur le corps entier de tumeurs au niveau interne avec un suivi de leur croissance et de leurs métastases.

Grâce à l'imagerie optique en bioluminescence ou en fluorescence, il devient possible de caractériser au cours du temps non seulement le développement ou la régression du cancer, la présence de métastases, mais aussi l'effet d'agents pharmaceutiques [Rehemtulla 2000]. Ces

techniques permettent également le suivi de l'expression d'un gène thérapeutique chez l'animal vivant. Le gène d'intérêt, introduit par transgénèse, est placé sous le contrôle du même promoteur que le gène reporter et ils s'expriment ainsi de manière concomitante [Zhang 2002]. Cette technique est un premier pas vers l'imagerie de l'expression génique chez l'homme, et pourrait faciliter la mise au point des approches de la thérapie génique.

Outre leur simplicité de mise en œuvre (la détection se fait généralement par une simple caméra CCD refroidie) et leur coût modéré, ces techniques présentent également l'avantage d'une résolution temporelle bien adaptée à l'étude des phénomènes cinétiques rapides. Néanmoins ces méthodes d'imagerie sont réalisées en 2D et fournissent une information généralement qualitative. Elles présentent en outre le handicap aussi bien pour la bioluminescence que pour la fluorescence de la GFP, d'être limitées aux études des couches superficielles des tissus, du fait de la pénétration limitée de la lumière. Des résultats récents proposent la mise en œuvre d'une imagerie tomographique optique qui permettrait en partie de s'affranchir de ces contraintes [Ntziachristos 2002].

Après une dizaine d'années de développements instrumentaux, l'imagerie du petit animal entre dans une seconde phase. Une première génération d'imageurs performants ont été mis en œuvre et franchissent les uns après les autres, le stade de l'industrialisation (MicroTEP en 1997, Microtomographe X en 2000, système optique pour la fluorescence et la bioluminescence en 2001). Au niveau international, les grands laboratoires privés et publics sont entrain de s'équiper et en France, se met en place des plates-formes d'imagerie animale regroupant différentes modalités. L'imagerie du petit animal est un domaine dynamique à l'aspect interdisciplinaire très marqué regroupant chimistes, biologistes, médecins, physiciens et industriels. Cependant, si les techniques ont d'ores et déjà dépassé le stade de la validation, l'imagerie doit encore faire ses preuves en termes de résultats biologiques. L'un des résultats attendus est une diminution significative du délai entre la découverte d'un agent pharmaceutique et sa mise sur le marché. De nombreux défis technologiques demeurent et de nouvelles techniques notamment optiques vont très probablement émerger au cours des années à venir.



*SITUATION et OBJECTIFS*  
*du travail*

Neuvième cancer par ordre de fréquence, l'incidence du cancer du pancréas est aujourd'hui de 1/1000 habitants et croît progressivement dans le temps. Le pronostic sombre de ce cancer en fait la quatrième cause de mortalité par cancer. Il est développé aux dépens des cellules exocrines canalaire avec un phénotype d'adénocarcinome dans 90% des cas et mucineux dans 75%. Le cancer du pancréas exocrine est un cancer au pronostic très pessimiste. En effet en l'absence de traitement fiable, le taux de survie ne dépasse pas 20% à un an. Cette gravité tient à la précocité de l'extension tumorale au fait qu'aucun traitement n'est efficace et qu'aucun moyen diagnostique actuel n'a permis d'améliorer la précocité de la détection de ce type de cancer au stade initial.

Le seul espoir reste la chirurgie dont les contre-indications sont nombreuses dans la plupart des cas, car la tumeur diagnostiquée est le plus souvent volumineuse, rendant l'exérèse impossible. Toutes les études cliniques démontrent que seule l'exérèse chirurgicale demeure la « pierre angulaire » du traitement pour la plupart des tumeurs solides et notamment celles des cancers digestifs. La chimiothérapie est le plus souvent inefficace et la radiothérapie est généralement prescrite à titre essentiellement antalgique. Ainsi, il est évident que le développement de nouvelles voies thérapeutiques est plus que jamais nécessaire pour inhiber la croissance tumorale voir éradiquer la tumeur.

L'objectif général du laboratoire dans lequel j'ai fait mon travail de recherche, est d'utiliser différents outils de biologie moléculaire et cellulaire pour définir de nouvelles **approches thérapeutiques**. Différentes stratégies sont activement en cours de développement, notamment la thérapie génique qui a suscité beaucoup d'intérêt au cours de cette dernière décennie [Roth 1997].

La **thérapie génique** des cancers consiste en l'introduction de matériel génétique ayant une action antitumorale. Les principales stratégies explorées de cette thérapie sont la thérapie immunogène par le transfert de gènes de cytokines, la modulation de l'expression des gènes suppresseurs de tumeur et des oncogènes, l'activation sélective des prodrogues encore appelé « gènes suicides » qui constitue l'une des stratégies majeures en thérapie génique. Son principe est basé sur la conversion d'une prodrogue non toxique en métabolites hautement toxiques [Springer 2000]. Cette réaction est catalysée dans la grande majorité des cas par une enzyme naturellement absente dans les cellules mammifères, car d'origine procaryote (bactérienne, fongique ou virale). L'efficacité de cette tactique, basée sur les gènes suicides, a été démontrée à la fois *in vitro* et *in vivo* [Singhal 1998]. Contrairement aux autres formes

de la thérapie génique, une expression du gène suicide même que transitoire, est suffisante pour tuer la cellule. Cette propriété est très intéressante car en effet, il n'est pas nécessaire d'introduire le transgène dans toutes les cellules de la tumeur. De nombreuses études ont mis en évidence l'existence d'une régression significative du volume tumoral, dès lors qu'une partie exprime ce gène. Ce phénomène est appelé « effet de voisinage » ou « effet bystander ». Il est particulièrement intéressant puisqu'il permet de surmonter le faible taux de transfection allant de 5 à 40% pour des cellules de tumeur humaine dans des expériences *in vivo*. Au cours de ces dernières années, différents gènes suicides ont été identifiés, clonés et utilisés dans des divers protocoles expérimentaux de thérapie génique. Les principaux gènes suicides utilisés sont :

- le gène de la thymidine kinase du virus de l'Herpès de type I, hsv-TK. Ce gène code pour une enzyme capable de phosphoryler le gancyclovir (GCV), un analogue nucléosidique dont la forme triphosphatée est fortement toxique pour les cellules en division. Cette enzyme possède une activité enzymatique 1000 fois plus efficace sur cette prodrogue que celle présente chez les mammifères. Sous la forme monophosphatée, le GCV est phosphorylé deux fois par les kinases endogènes de la cellule. Il en résulte une drogue qui inhibe l'action de l'ADN polymérase, une fois incorporée dans l'ADN. Dans ce système, la toxicité est conditionnellement restreinte aux cellules en division mais il existe un important effet de voisinage assurant la destruction de cellules tumorales non transduites [Moolten 1986]. Cette approche a été largement validée par des études précliniques chez l'animal et fait maintenant l'objet de nombreux essais cliniques.

- le gène de la cytosine déaminase d'*Escherichia Coli*, eCD, code pour une enzyme qui désamine la cytosine en uracile. Elle peut donc convertir le 5-Fluorocytosine ou 5-FC, prodrogue non toxique en 5-Fluorouracile ou 5-FU, drogue cytotoxique pour plus de 90 à 100% des cellules tumorales. A l'inverse du GCV, le 5-FC peut traverser les membranes cellulaires et induire la mort des cellules voisines après conversion en 5-FU.

Les premiers résultats ont révélé une excellente tolérance à la thérapie génique par gène suicide. Toutefois, l'intérêt de ce type de traitement reste aujourd'hui limité par l'efficacité du système et le transfert de gène. D'où la nécessité de développer des applications thérapeutiques visant à une meilleure réponse thérapeutique tout en diminuant les doses couramment administrées. Prenant en compte ces problématiques, le travail de recherche que j'ai entrepris, s'est fixé **deux objectifs** : l'un concerne la thérapeutique, l'autre la détection.

Ce travail concerne la mise au point et l'étude expérimentale suivant **des approches multi-géniques et multi-thérapeutiques** appliquées sur le cancer du pancréas. Il est bien connu que les traitements anticancéreux actuels comme la chimiothérapie ne sont pas spécifiques ce qui explique les effets secondaires importants. De plus, à quelques rares exceptions près, l'emploi d'un seul agent anticancéreux ne permet pas d'obtenir de guérison ou de rémission durable de la tumeur sensible, malgré l'obtention au début du traitement d'une régression tumorale spectaculaire. Cet échec est dû notamment au développement spontané d'un phénomène de résistance à l'agent utilisé. C'est pourquoi, le traitement anticancéreux est souvent discontinu et très limité pour être palliatif. Le mode majeur de résistance aux thérapies antitumorales est l'insensibilité à l'induction aux voies de l'apoptose [Houghton 1999, Kaufman 2000]. Le concept de ce travail consiste à démontrer la faisabilité et l'efficacité de la combinaison de la thérapie génique avec la chimiothérapie. Pour se faire, nous avons utilisé plusieurs gènes thérapeutiques comme l'association des gènes suicides hsv-tk et eCD ou des gènes pro-apoptotiques tels que les gènes bax et TRAIL, déclenchant ainsi l'apoptose à différents niveaux. Il a été déjà démontré que l'association de deux systèmes d'activation de prodrogue, hsv-TK/GCV et eCD/5-FC, montre à faible dose, une meilleure efficacité que celle obtenue avec un seul système [Aghi 1998]. Cette stratégie d'associer plusieurs modalités thérapeutiques permet d'utiliser les avantages de chacune et d'optimiser l'utilisation de la thérapie génique sur le cancer du pancréas. Ceci permettra, dans un but ultime, de diminuer les effets indésirables des thérapies anticancéreuses conventionnelles.

Le but majeur de la thérapie génique est de délivrer un gène spécifique dans une cellule cible pré-déterminée et que le produit d'expression de ce gène fournisse un réel effet thérapeutique. De nombreux **vecteurs** sont proposés pour accomplir ce but [Clary 1998]. Il existe deux grandes catégories: les vecteurs viraux (rétrovirus, lentivirus, adénovirus, ...) et les vecteurs non viraux ou synthétiques (polymères, liposomes, lipides cationiques). Pour le déroulement de ce travail, nous en avons testé deux types sur différents modèles cellulaires du cancer du pancréas. Les adénovirus est un des moyens de transfert spécifique du matériel génétique dans les cellules cibles. Les avantages d'utilisation de ce type de vecteur sont la facilité de production à des titres élevés et l'efficacité importante de transduction pour un très grand nombre de cellules cancéreuses [Bauerschmitz 2002]. Le vecteur non viral employé dans une de nos études, sont des liposomes qui présente un avantage sur son administration directe *in vivo*. Les lipoplexes formés sont faciles à préparer et présentent un

haut niveau de sécurité et une faible immunogénéicité (contrairement aux virus). De plus, ils donnent la possibilité de transférer des gènes de grande taille [Felgner 1989].

Le **ciblage** de l'effet thérapeutique du transgène dans un tissu spécifique est encore pour l'instant, un but fortement désiré et une méthode attractive en thérapie génique des cancers. Une des approches communément exploitées est de contrôler l'expression du gène d'intérêt *via* des promoteurs tissu- ou cellule-spécifiques. Plusieurs promoteurs déjà identifiés, sont très actifs dans des tumeurs particulières par rapport aux tissus ou organes de même origine. Ils ont été largement exploités pour restreindre l'expression du transgène dans la tumeur après un transfert non spécifique. C'est le cas du promoteur de la télomérase reverse transcriptase (hTERT) dont le gène est actif dans plus de 85% des cancers humains mais reste quiescent dans les cellules somatiques [Kim 1994, Shay 1997]. Il a été utilisé pour cibler l'expression de deux gènes pro-apoptotiques dans nos modèles cellulaires de cancer du pancréas *in vitro* et *in vivo*. Afin d'augmenter l'activité transcriptionnelle de ce promoteur, nous l'avons combiné au système régulateur GAL4.

Toutes ces nouvelles approches de la thérapie génique en cours d'essais, soulèvent trois aspects critiques concernant: (1) la quantification du transfert du matériel génétique et le comportement pharmacocinétique des différents vecteurs utilisés, (2) l'estimation de l'efficacité et la durée de l'expression du gène *in vivo*, et (3) la visualisation du transfert de gène dans un site donné par de nouvelles techniques d'intervention. Le manque de méthodes d'imagerie non invasives nous a amené à nous investir dans le développement d'un **dispositif d'imagerie de fluorescence** induite par laser, nous permettant de visualiser en temps réel la croissance tumorale et des métastases chez l'animal anesthésié. Ainsi grâce à cette technique, nous avons pu faire un suivi spatio-temporel d'une de nos approches thérapeutiques développées dans ce travail par l'expression *in vivo* de la protéine green fluorescent protein ou GFP.

# *RESULTS*

*4 Publications*

# **CHAPITRE I**

## **Etude d'une approche multi-génique**

Combinaison de deux systèmes d'activation de prodrogue  
hsv-TK/GCV & eCD/5-FC

# **ARTICLE 1**

**Combined suicide gene therapy  
for pancreatic peritoneal carcinomatosis using  
BGTC liposomes**

# Introduction

## Article I

Des résultats prometteurs de plusieurs études expérimentales de thérapie génique obtenus avec les systèmes d'activation de prodrogues suggèrent que cette approche puisse constituer une modalité thérapeutique efficace pour le traitement du cancer chez l'homme. Aussi, de telles stratégies sont-elles à présent testées cliniquement. Mais il faut constater cependant qu'un système « gène suicide » utilisé isolément, n'est pas apte à générer une régression tumorale complète et qu'il n'évite pas la reprise de la croissance de la tumeur à l'arrêt de l'administration de la prodrogue. Ces limitations de mono-thérapie par « gène suicide » amènent à concevoir une approche combinant différents systèmes d'activation de prodrogues avec l'espoir qu'ils puissent fonctionner de manière synergique.

L'objectif de notre étude s'inscrivait dans cette approche : il était de déterminer si le fait de combiner les deux systèmes de gènes suicides les plus étudiés que sont *hsv-TK/GCV* et *eCD/5-FC* pouvait constituer une alternative intéressante aux échecs de la chimiothérapie sur le cancer du pancréas.

Le modèle cellulaire utilisé était la lignée tumorale d'origine humaine, BxPC-3. Ces cellules de phénotype canalaire sont sécrétrices du marqueur tumoral, l'antigène carcino-embryonnaire ou ACE. Cette lignée constitue un des modèles largement utilisés pour l'étude des adénocarcinomes pancréatiques, puisque 90% des cancers du pancréas sont d'origine exocrine canalaire [Cowgil 2003]. Ce modèle cellulaire à tumorigénicité intacte, peut être injecté chez la souris immuno-compromise. Souhaitant utiliser un vecteur non viral comme vecteur de transfert dans cette expérience, des liposomes cationiques de BGTC/DOPE développés par l'équipe du Pr. JM Lehn et non injectables par voie systémique à leur stade de formulation, nous avons donc utilisé un modèle de carcinose péritonéale. Les liposomes BGTC/DOPE ont été complexés à un plasmide d'expression contenant les deux « gènes suicides » à tester. Le gène *eCD* était exprimé à partir d'une cassette bicistronique codant également pour l'uracile phosphoribosyl transférase ou UPRT d'*E.Coli*. Cette enzyme permet de potentialiser l'activité enzymatique de la *eCD* [Kanai 1998, Kawamura 2000]. Le transfert de ces gènes a été réalisé par une injection intra-péritonéale quotidienne pendant trois jours. Deux hypothèses pouvaient être testées : soit un traitement à visée préventive contre des micro-métastases indétectables par un traitement précoce, soit un traitement d'une

carcinose péritonéale avérée. C'est ce dernier cas que nous avons choisi car plus démonstratif et plus proche de la situation clinique. Ainsi la transduction a été initiée plus d'une semaine après inoculation des cellules dans la cavité péritonéale. L'injection des prodrogues respectives des deux gènes suicides, le GCV et le 5-FC a été effectuée quotidiennement par voie péritonéale afin de réaliser une fenêtre de traitement longue de vingt jours.

Nous avons évidemment, en préalable à toute investigation *in vivo*, testé *in vitro* la fonctionnalité du vecteur lipidique sur la lignée cellulaire BxPC-3. L'efficacité de transfection du BGTC/DOPE a été appréciée à l'aide des gènes « reporters » luciférase et la green fluorescent protéin ou GFP. Puis une étude pharmacocinétique et pharmacodynamiques en fonction des concentrations des prodrogues correspondantes nous a permis de caractériser l'efficience thérapeutique du tandem hsv-TK/eCD.

La démonstration d'une réponse thérapeutique a été alors tenté *in vivo* pour valider totalement cette approche originale. L'usage d'une lignée ACE-sécrétante nous a permis de suivre dans le temps la progression tumorale de manière non invasive par des prélèvements sanguins répétés pour des dosages sériques de l'ACE. Afin de confirmer l'efficacité de transduction réalisée avec le vecteur non viral utilisé, des animaux ont été sacrifiés en séquence afin de déterminer par analyse RT-PCR, le niveau d'expression d'un des deux gènes suicides au niveau des nodules de carcinomatose. Ainsi avons-nous collecté des informations non seulement sur l'efficacité du transfert de gènes réalisé mais aussi sur sa persistance dans le temps.



**Article** : Combined suicide gene therapy for pancreatic peritoneal carcinomatosis using BGTC liposomes. A.Hajri, S.Wack, P.Lehn, JP.Vigneron, JM.Lehn; M.Aprahamian. *Cancer Gene Ther.* 2004;11(1):16-27. **(suicide gene-BGTC - format pdf)**

*[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]*

A. Hajri, S. Wack, P. Lehn, J.P. Vigneron, J.M. Lehn, M. Aprahamian

**Combined suicide gene therapy for pancreatic peritoneal carcinomatosis using BGTC liposomes.**

Cancer Gen. Ther. 2004, 11 : 16-27

Pages 16-27 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est possible de la consulter dans la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr).

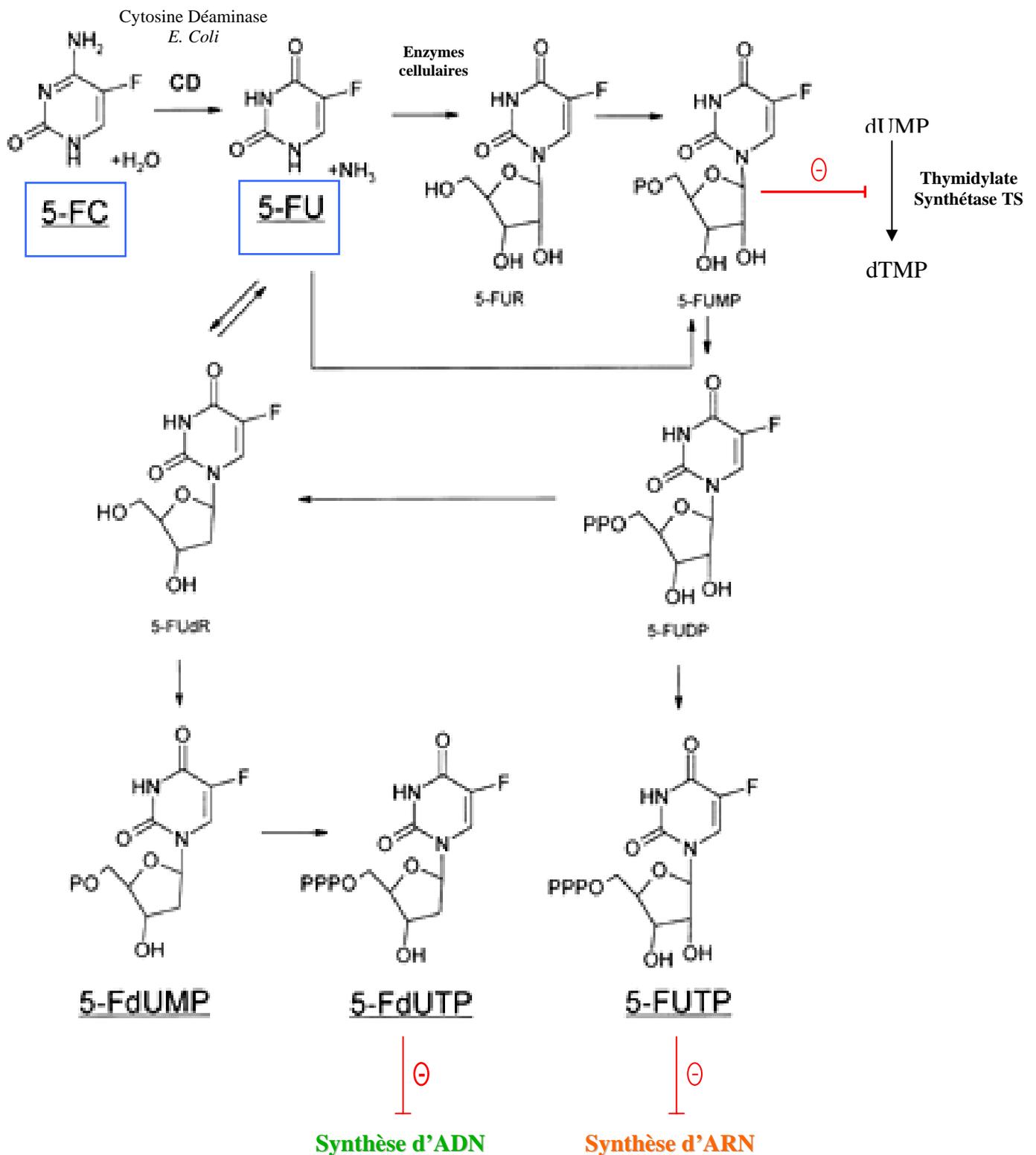
## Discussion

### Article I

Le but de ce travail a été double : déterminer l'efficacité de transfection par les liposomes BGTC/DOPE *in vitro* et établir l'activité antitumorale d'une approche multi-génique associant deux systèmes gène suicide/prodrogue combinés, ceci bien sûr avec une arrière pensée d'extension à des applications *in vivo* dans une démarche d'étude pré-clinique. Les résultats que nous avons obtenus sur le modèle de carcinose péritonéale chez la souris nude, montrent que les liposomes BGTC/DOPE peuvent donner lieu à une transfection efficace au niveau de nodules tumoraux disséminés dans le péritoine et que la lipofection de gènes suicides par l'intermédiaire de ces liposomes, réduit fortement la progression de la carcinose péritonéale tumorale chez les souris traitées sans qu'il soit pour autant possible de parler de guérison.

L'étude préalable *in vitro* a permis de démontrer sur la lignée pancréatique humaine BxPC-3, un effet synergique de la multi-thérapie génique. En effet, les  $IC_{50}$  des prodrogues respectives des gènes eCD et hsv-TK transfectés de façon stable dans la lignée cellulaire BxPC-3 sont diminuées de moitié par rapport à une monothérapie de gène suicide (5-FC : 50 versus 100  $\mu\text{g/ml}$  et GCV : 25 versus 50  $\mu\text{g/ml}$ ). Il semble donc bien s'agir d'un effet synergique et non pas d'une simple addition des deux effets toxiques. De plus, le fait d'administrer une plus faible quantité de chaque prodrogue ralentira l'apparition d'un phénomène de résistance à la drogue puisqu'elle sera présente en plus faible quantité dans l'organisme.

Cette synergie thérapeutique existante entre les deux systèmes est due à la polyvalence des mécanismes d'action de deux systèmes d'activation des prodrogues. La cible commune est l'inhibition de la synthèse de l'ADN par la présence en excès dans les cellules d'anti-métabolites, comme le GCV triphosphaté et le 5-FU par rapport aux composés naturels tels que les dTTP [Faulds 1990]. L'incorporation de ces molécules ne permet pas l'élongation des brins d'ADN et conduit à la mort cellulaire. En plus de cette action directe, il existe d'autres voies permettant d'augmenter l'effet anticancéreux. Ainsi par exemple pour le 5-FU obtenu par l'enzyme eCD qui est métabolisé en 5-fluoro-2'-déoxyuridine-5' monophosphate (FdUMP) et en FdUTP et FUTP (*Figure 13*). Le FdUMP inhibe l'enzyme thymidylate synthétase qui convertit le déoxyuridylate (dUMP) en déoxythymidylate (dTMP).



**Figure 13.** Conversion du 5-Fluorocytosine (5-FC) en 5-Fluorouracile (5-FU) par l'enzyme *E. Coli* cytosine Déaminase, eCD.

Le 5-FU est converti par les enzymes cellulaires en 5-fluorodéoxyuridine-5'-monophosphate (5-FdUMP), 5-fluorodéoxyuridine-5'-triphosphate (5-FdUTP), et 5-fluorouridine-5'-monophosphate (5-FUTP), responsable de l'inhibition de la thymidilate synthétase et de la formation des complexes (5-FU) ARN et (5-FU) ADN.

Comme cette enzyme est la seule source pour la synthèse *de novo* de thymidylate, les cellules traitées avec le 5-FU deviennent déficientes en déoxythymidine-5'-phosphate (dTTP), incitant à l'incorporation de l'uridine triphosphate et du FdUTP. Ce déficit en

métabolites entraîne aussi une incapacité à réparer les brins d'ADN par les enzymes uracile-*N*-glycosylases. Le 5-FU a également pour cible l'ARN *via* l'incorporation du FUTP dans cette molécule, inhibant donc la polyadénylation des ARN messager, la méthylation des ARN de transfert et le traitement des ARN ribosomiques [Takimoto 1996].

Le modèle animal que nous avons choisi d'utiliser dans ce travail présente l'avantage d'être plus représentatif de la réalité de l'évolution du cancer du pancréas en phase terminale que la classique xélogreffe en sous-cutanée. Il est en effet plus agressif, comme l'est dans la réalité clinique ce stade d'extension de la maladie, au dessus de toutes ressources thérapeutiques. En tant que tel, il est possible de considérer ce modèle de carcinose péritonéale comme le plus démonstratif de l'efficacité des nouvelles approches thérapeutiques dont la thérapie génique. De plus, il faut convenir que la cavité péritonéale constitue une cible idéale pour les vecteurs non viraux car elle permet une meilleure diffusion des complexes d'ADN en comparaison à une injection directe dans le micro-environnement d'une tumeur solide où la diffusion est quasi inexistante. Il eût certes été loisible d'apporter ces complexes par voie systémique, solution que nous n'avons pas retenue pour une double raison : la première est la plus rédhibitoire est qu'à ce stade de sa formulation, le BGTC/DOPE a tendance à former des micro-agrégats : la deuxième est que ce mode d'administration réalise une dispersion du gène thérapeutique dans des zones où son expression peut s'avérer nuisible. Alors que par le mode d'injection que nous avons choisi, les lipoplexes atteignent plus facilement tous les nodules tumoraux disséminés, augmentant ainsi le bénéfice thérapeutique de cette méthode. Ces résultats prometteurs nous offrent certes une ouverture vers des essais cliniques, bien que l'apport de principes actifs par voie péritonéale soit loin d'être une pratique courante chez l'homme. De plus, peu d'essais cliniques de thérapie génique ont été réalisés à ce jour avec des vecteurs non viraux. Les travaux les plus récents concernent des applications d'immunothérapie comme l'allovectine appliquées sur le mélanome [Stopeck 2001] et sur le carcinome colorectal au stade de diffusion avec métastases hépatiques [Rubin 1997]. La rareté de ces essais cliniques résulte du fait que les vecteurs non viraux sont beaucoup moins efficaces au niveau de transfert de gène que les virus.

De nombreuses études sont actuellement en cours pour modifier la formulation des liposomes afin d'augmenter leurs propriétés de vecteur de transfert. Une attention particulière est portée à leur domaine hydrophobe, au domaine de liaison avec l'ADN ainsi

qu'au groupement cationique de tête [Heyes 2002]. Une méthode efficace de synthèse de lipides asymétriques a été décrite, utilisant des chaînes alkyles et des groupements oléyles insaturés. La nature chimique et la basicité du groupement de tête ont été modifiées par le couplage de quatre acides aminés dont la chaîne latérale est cationique ; l'arginine, l'histidine, la lysine et le tryptophane. L'efficacité de transfection est plus importante pour les dérivés arginine/lysine avec des formules binaires contenant les acides aminés dérivés et le DOPE [Karmali 2004]. L'optique de ces études est de trouver un rapport optimal de charge entre les lipides et l'ADN afin d'obtenir un maximum de complexes ADN/liposomes. Une innovation particulièrement excitante dans le design de la partie de liaison avec l'ADN du liposome est l'incorporation de groupements « sensibles à l'environnement » ou à l'hydrolyse intracellulaire ce qui permettrait un meilleur contrôle du transfert de l'ADN. Un exemple de vecteurs lipidiques modifiés consiste en l'intégration de groupements fonctionnels d'enzymes sensibles aux pH ou aux variations redox. Le bénéfice de tels vecteurs dégradables, peut être évalué en terme d'efficacité de transfection et de cytotoxicité liée aux lipides cationiques [Martin 2005]. Zuber et Col. [2001] ont synthétisé des vecteurs multi-composants qui miment les propriétés clés des virus. La solution consiste à utiliser des molécules d'ancrage pour lesquelles les machineries endogènes d'import nucléaire ont été copiées de celles existantes à l'état normal chez les bactéries ou les virus. D'autres solutions encore plus originales proposent la condensation du génome de façon mono-moléculaire *via* des détergents de dimérisation ou la rupture de l'endosome par le phénomène « éponge à protons ». Ainsi tous ces composants ont été rassemblés dans un système supramoléculaire unique ; des virus artificiels. Enfin, la combinaison d'un lipopolyamine dioctadecylamidoglycylspermine (DOGS) avec un rétrovirus amphotropique a permis d'augmenter son pouvoir d'infectivité par un facteur cinq sur un modèle de foie de rat [Themis 1998]. Il n'y a pas eu de problèmes de toxicité lors de l'administration du mélange.

En tout état de cause, notre approche multi-génique par le biais d'un vecteur non viral nous a permis d'obtenir des résultats intéressants avec une efficacité de transfection estimée de manière indirecte par le dosage de la protéine GFP à environ 10% des cellules tumorales. La possibilité de suivre la progression tumorale par le biais des taux circulants d'ACE s'est avérée une solution forte élégante pour réaliser un suivi longitudinal. Cette méthode de suivi qui compare toujours sur les mêmes animaux l'évolution de la réponse thérapeutique, augmente la fiabilité des résultats obtenus tout en diminuant le nombre d'animaux

d'expérience. Il apparaît nettement dans ce travail, une remontée du taux circulant d'ACE chez les animaux traités. Cette augmentation est en corrélation directe avec la disparition de l'expression du transgène dans les différents nodules tumoraux au bout de deux semaines. Il eut été nécessaire à notre avis pour obtenir un effet thérapeutique plus important et durable, de répéter la lipofection au bout de quinze jours puisque aucune toxicité apparente du BGTC/DOPE n'a été observée.

Mais il existe une autre solution qui nous pourrait permettre de progresser dans la recherche de l'obtention d'une éradication complète de la tumeur. Il s'agirait, en s'inspirant de la pratique maintenant bien établie d'une stratégie associant plusieurs approches thérapeutiques, de coupler la thérapie génique à un autre traitement tel la chimiothérapie ou la radiothérapie. C'est ce type d'approche qui fait l'objet du travail suivant.

## **CHAPITRE II**

# **Etude d'une approche multi-thérapeutique et multi-génique**

Combinaison d'une stratégie de thérapie génique  
avec la chimiothérapie

## ARTICLE 2

Suicide gene therapy  
of pancreatic adenocarcinoma  
in combination with chemotherapy  
using HSV-TK/GCV and *E.coli* CD/5-FC with  
the chemotherapeutic agents,  
Tomudex and Gemcitabine

# Introduction

## Article II

La première étape de notre travail a mis en évidence l'efficacité de la combinaison de deux gènes suicides, eCD et hsv-TK sur un modèle de carcinose pancréatique humaine. Nous avons pu cependant constater dans cette étude la récurrence du processus de carcinose péritonéale au bout de quelques semaines, en dépit de la persistance du traitement par prodrogues. Ce phénomène de reprise de la croissance tumorale provient comme nous avons pu le constater de la perte d'expression des transgènes, un défi majeur en thérapie génique. Mais il ne faut pas exclure le développement du phénomène de résistance aux drogues synthétisées, un challenge également relevé en chimiothérapie conventionnelle. Des stratégies ciblées, surmontant ces limitations doivent être développées. Les limitations de la chimiothérapie conventionnelle peuvent être partiellement contournées en combinant les agents chimiothérapeutiques. C'est dans cette démarche et afin de réunir leurs avantages respectifs que nous avons pensé d'associer la thérapie des gènes activant les prodrogues à des agents anticancéreux.

Il convenait de choisir un, voir deux drogues pour tester la validité d'une telle approche. Cette dernière décennie, la disponibilité de plusieurs nouvelles molécules actives a conduit au développement de nouvelles combinaisons qui ont sensiblement augmenté le taux de réponse de tumeurs jusqu'à présent considérées intraitables. En clinique, beaucoup de combinaisons se composent d'un anti-métabolite associé à un ou plusieurs agents anti-cancéreux de mode d'action différent. La gemcitabine (« Gemzar<sup>®</sup> », dFdC), analogue de la déoxycytidine, est un nouvel agent anticancéreux suivant le principe des anti-métabolites [Peters 1993]. Cette molécule est une prodrogue, qui une fois dans la cellule, doit être phosphorylée en sa forme active par l'enzyme déoxycytidine kinase. Les deux formes diphosphatée et triphosphatée inhibent les mécanismes nécessaires à la synthèse de l'ADN. L'incorporation de cette dernière forme au niveau du brin en cours d'élongation est le mécanisme majeur de la gemcitabine conduisant à la mort cellulaire. Son incorporation ralentit l'ADN polymérase mais permet à quelques nucléotides d'être introduits avant que la réaction ne soit interrompue [Huang 1991, Plunkett and Huang 1996]. Cette action qui « masque les terminaisons » empêche la reconnaissance de la molécule de gemcitabine par les enzymes de correction et de ce fait, son excision au sein du brin d'ADN. En outre, les actions uniques qu'exercent les

métabolites cytotoxiques de cet agent sur les voies de régulation, servent à augmenter les activités inhibitrices globales de la croissance cellulaire. Ces interactions qui ont été peu démontrées pour d'autres agents anticancéreux, sont appelées « auto-potentialisation » [Heineman 1992]. Ce composé est utilisé comme traitement standard pour le cancer du pancréas à un stade avancé. Mais bien que la gemcitabine ait démontré une activité antitumorale supérieure à celle du 5-FU, pour ce type de cancer, Il est encore nécessaire d'améliorer les résultats obtenus à ce jour. la multiplicité de ses effets biochimiques et de ses produits cytotoxiques fait de la gemcitabine, une molécule idéale pour le développement rationnel de combinaisons. C'est pourquoi elle a constitué notre première candidate à une approche pluri-thérapeutique combinant gènes suicides et anti-métabolites.

L'agent anticancéreux utilisé en cancérologie digestive dont nous avons étudié la combinaison est le raltitrexed (« Tomudex® », ZD 1694) qui est un inhibiteur antifolate de la thymidylate synthétase ou TS. Cette enzyme est une cible majeure pour la chimiothérapie car la résistance aux fluoropyrimidines comme le 5-FU et à d'autres inhibiteurs de la TS peut se produire par une variété de mécanismes comprenant les niveaux intracellulaires élevés de la TS résultant de l'augmentation de la transcription et de la traduction de ce gène. Nous avons pensé réunir ces deux agents anticancéreux en raison d'une différence dans leur mode d'action, différence qui s'avère toutefois complémentaire permettant d'espérer une synergie d'action. Ils nous sont apparus comme les candidats idéaux à associer aux deux gènes suicides, *eCD* et *hsv-tk* que nous avons étudiés dans notre premier travail.

Fidèle à la même méthodologie, nous avons conduit ce travail d'abord *in vitro* sur la lignée cancéreuse de pancréas humain BxPC-3 exprimant de façon stable les deux gènes suicides avec plusieurs concentrations des deux prodrogues et des deux composés chimiothérapeutiques dans le but de trouver la combinaison optimale. Nous l'avons ensuite testé *in vivo*.

**Suicide gene therapy of pancreatic adenocarcinoma in combination with chemotherapy using HSV-TK/GCV and E.coli CD/5-FC with the chemotherapeutic agents raltitrexed and gemcitabine**

Séverine WACK<sup>1</sup>, Marc APRAHAMIAN<sup>1</sup>, Amor HAJRI<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Tumor biology and gene therapy laboratory *INSERM Unit 701, IRCAD, Strasbourg, France*

\* Correspondence to Amor HAJRI

INSERM Unit 701, IRCAD, 1 place de l'Hôpital, BP 426, 67091 Strasbourg cedex, France.

Phone: +33 3 88 11 90 73. Fax: +33 3 88 11 90 99

E-mail: [Amor.Hajri@ircad.u-strasbg.fr](mailto:Amor.Hajri@ircad.u-strasbg.fr)

## **Abstract**

Pancreatic cancer remains one of the most difficult cancers to treat. So an established principle of antineoplastic chemotherapy is that multidrug regimens are generally superior to single-agent therapy. This prompted us to elucidate whether a potent thymidylate synthase inhibitor, raltitrexed and a deoxycytidine analog, gemcitabine could enhance the efficacy of the herpes simplex virus thymidine kinase gene/gancyclovir (hsv-TK/GCV) and Escherichia coli cytosine deaminase gene/5-Fluorocytosine (eCD/5-FC) systems for the treatment of pancreatic cancer. We assessed the interaction between the two treatments in human BxPc-3 pancreatic carcinoma cell line that was genetically modified to constitutively express hsv-TK and eCD, sensitizing them to GCV and 5-FC respectively. Synergistic cell killing was observed in a proliferation and cytotoxicity assays over most of the large dose range. Subcutaneous tumor models, using the same cell line in athymic nude mice, demonstrated that the combination of prodrugs and anticancer drugs resulted in complete tumor regression in 50% of tumors at day 13, while no tumor regression was observed in control animals. Additionally, nude mice were injected intraperitoneally with this cells and treated with GCV, 5-FC, raltitrexed and gemcitabine alone or in combination. The group which receive all treatment in statistically significant enhanced survival relative to single-agent treatment instead of control groups showed short survival (40 days). Our results suggest that for antineoplastic therapy, molecular chemotherapy based on hsv-TK/GCV and eCD/5-FC systems combined with traditional chemotherapy is a logical and practical future direction to pursue. Given the low efficacy of currently used gene therapy systems, such combination might have important implications to improve the clinical application of suicide gene therapy.

**Key words** : suicide gene • pancreatic cancer • chemotherapy • multi modality

## Introduction

Pancreatic cancer is an aggressive and rapidly fatal disease exhibiting a very high mortality rate despite available therapies. At present, pancreatic cancer patient has the worst 5-year rate of any cancer; <5% of all pancreatic cancer patients survive 5 years [1-3]. Surgery is the only curative treatment currently available; however, >80% of patients have unresectable at diagnosis. Chemotherapy and radiation therapies most commonly play a palliative role in pancreatic cancer care [4-6]. But the disadvantages of chemotherapeutics agents are not much efficacious and with so many toxic side effects. Despite this, our understanding of the pathogenesis of the disease has advanced considerably over the past few decades. These findings provide the basis for the development of much needed new therapeutic modalities.

The development of new cancer therapies that the toxicity to normal tissues such as the gut lining and bone marrow is an important area of research. Gene therapy, which aims to modify cells for therapeutic gain, has been proposed as a method that may achieve this specificity [7-9]. The most common methods of cancer gene therapy have primarily focused on replacing a tumor suppressor gene, inactivating a specific oncogene, or using molecular chemotherapy by toxin gene. The possibility of rendering cancer cells more sensitive to chemotherapeutics or toxins by introducing “suicide gene” was suggested in the late 1980s. Suicide gene therapy approaches using deactivated drugs are know as gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT) or gene-prodrug activation therapy (GPAT). It is evident that the most interest and effort in cancer gene therapy in the coming years will be focused on targeting and delivery of therapeutic genes specifically to tumor cells in the patient, creating cell death of the transduced cells and the surrounding tumor tissue. For most of the solid tumors, the transfer efficiency represents an obstacle for therapy to eradicate tumor cell growth. Since expression of foreign suicide genes will not occur in all cells of a solid tumor, a “bystander effect” is required, allowing the produced cytotoxic metabolites to kill not only the transduced tumor cells but also the neighboring untransduced tumor cells. Therefore, an extended bystander effect, apoptosis induction, and immune response would be advantageous characteristics

of suicide gene/prodrug system for the treatment of cancer in general and particularly in solid tumors. Several suicide gene/prodrug systems have been developed and tested *in vitro* and *in vivo*. The most widely investigated is the thymidine kinase of herpes simplex virus (*hsv-TK*), which converts the antiviral agent ganciclovir (GCV) into monophosphate, which is further phosphorylated by cellular kinase enzyme to GCV triphosphate derivative, a potent inhibitor of DNA synthesis able to kill all the cells expressing *hsv-TK* [10-11]. A similar system uses the cytosine deaminase (CD), gene from bacteria *Escherichia coli* or yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which transforms the non toxic prodrug 5-fluorocytosine (5-FC) into the antimetabolite, 5-fluorouracil (5-FU) [12-14]. This chemotherapeutic agent, in common clinical use as an antitumor drug, can freely diffuse from transduced cells into neighboring cells in contrast to phosphorylated ganciclovir. Short-term therapeutic efficacy of these prodrug-activating gene therapies has shown in animals models [15, 16].

Recurrent tumor growth can arise either from the development of drug resistance (a challenge also faced in conventional chemotherapy) or from loss of transgene expression (a challenge unique to gene therapy). Strategies aimed at overcoming these limitations must be developed. Limitations in conventional chemotherapy can be partially overcome by combining chemotherapy agents, and it stands to reason that the same benefits could arise from combining prodrug-activating gene therapies. Thus, the aim of this study was to determine whether combining suicide gene therapy and also, chemotherapy strategies would result in enhanced antitumor effect in pancreatic cancer *in vitro* and *in vivo*. This hypothesis was tested using combination of suicide gene/prodrug systems (*HSV*-Thymidine Kinase/Ganciclovir and *E.coli* Cytosine Deaminase/5-Fluorocytosine) with clinically relevant chemotherapeutic drugs as raltitrexed (Tomudex®) or gemcitabine (Gemzar®). These two therapeutic modalities are on anti-metabolite *de novo* DNA synthesis inhibitors principle. The E.CD/HSV-TK fusion protein provides all the benefits associated with individual *eCD* and *hsv-TK* suicide genes: selective cytotoxicity of cells to 5-FC and ganciclovir and bystander effect [17, 18]. Gemcitabine (2', 2'-difluoro-2'-deoxycytidine; dFdCyd) is a promising new chemotherapeutic agent that has been recently studied for palliation of advanced (stage IV)

unresectable pancreatic cancer [19, 20]. This compound is a cell cycle-dependent deoxycytidine analogue of the anti-metabolite class. It must first be transported into the cell and then be phosphorylated to its active, triphosphate form. Incorporation of gemcitabine triphosphate into DNA is most likely the major mechanism by which gemcitabine exerts its cytotoxic actions [21-23]. Although anti-metabolites effects are partly due to thymidylate synthase (TS) inhibition, they also have non-specific, non TS effects on RNA and purine synthesis. Direct and specific TS inhibitors therefore presented an attractive research target. Raltitrexed (“Tomudex®”, ZD1694), a direct and specific folate-based inhibitor of thymidylate synthase (TS) that entered phase III studies in November 1993 [24, 25]. To do this study, suicide gene-transduced and parental pancreatic cancer cell lines BxPC-3 were used to evaluate the efficacy of this concomitant chemotherapy and gene therapy approach. We have investigated the combined efficacy of eCD/5-FC and hsv-TK/GCV suicide genes and the two agents chemotherapy for *in vitro* as well as *in vivo* cell killing of a human pancreas cell carcinoma cell line, BxPC-3.

## Materials and methods

### • Cell lines and cell culture

The human pancreatic cancer cell line BxPC-3 was maintained in RPMI 1640 glutamax containing 10% heat inactivated fetal bovine serum, and penicillin/streptomycin (all from Invitrogen-Life Technologies, Cergy Pontoise, France). The monolayer cell cultures were maintained in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Stock cultures were passed weekly and supplied with fresh medium every days. The cell lines were routinely examined to be free of mycoplasma infection.

### • Plasmid and generation of cell lines

Plasmid pCUT contains the eCD and uracil phosphoribosyltransferase (UPRT) genes in a bicistronic cassette driven by the CMV-IE promoter, whereas the *hsv-TK* gene is under the control of a CAG promoter (Fig. 1). pCUT expression vector (Cayla, Toulouse, France) containing the *hsv-*

*TK* gene under the control of the CAG promoter and the *CD/UPRT* genes under the cytomegalovirus (CMV) promoter was used for this study. This recombinant plasmid was amplified in TG<sub>2</sub> *E.Coli* bacteria and purified using Qiagen plasmid Endo-free Maxi-Prep Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

The pancreatic tumor cell BxPC-3 was transfected using the Lipofectamin 2000 (Invitrogen-Life Technologies) according to the manufacturer's instruction, and optimized with minor modifications. Two days after transfection, cells were reseeded in selection medium containing 200 and 400 µg/ml zeocine (Cayla). Three weeks later, many clones were appeared and expanded in the presence of zeocin. Resistant clones were selected and propagated, and the expression of *hsv-TK* was monitored by RT-PCR using specific primers for this gene. Clones producing high *TK* gene expression and the highest of the two prodrug, 5-FC and GCV sensitivity were used for subsequent experiments.

#### • Cytotoxicity assays

The sensitivity of *eCD/hsv-TK* transfected BxPC-3 cells to different treatments was determined using a tetrazolium-based colorimetric assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)). This test is based on the cellular reduction of MTT by the mitochondrial dehydrogenase of viable cells to a blue formazan product that can be measured by spectrophotometer. Transfected and parental cells were incubated for 4 days with the correspondent prodrug; gancyclovir (GCV) (Cymévan; Roche, Neuilly-Sur-Seine, France) and 5-Fluorocytosine (5-FC) (Sigma, St-Louis, USA) alone or in combination with raltitrexed (AstraZeneca, Rueil-malmaison, France), and gemcitabine (Lilly, St-Cloud, France). At the end of treatment period, MTT was added to each well (final concentration, 0.5 mg/ml). The plates were incubated at 37°C for 3 hours, the solution was removed, 150 µl dimethylsulfoxide was added, and the plates were gently shaken for 15 minutes to solubilize the formazan blue crystals. Absorbance at 570 nm was measured by a microplate reader (Biorad, marnes-la-Coquette, France). Cell viability was

expressed as the percentage of growth of untreated cells. Each experiment was undertaken using three wells per variable and performed at least twice.

- **Cell proliferation assays**

Parental and transfected cells were seeded at a density of  $6 \cdot 10^4$  cells per well in 24-well plates. After overnight incubation, cells were treated with different concentrations of prodrugs and chemotherapeutic agents. For the last 24 hours of cell culture treatment, 0,5  $\mu\text{Ci}$  of [methyl- $^3\text{H}$ ]thymidine (10mCi/ml) was added. After PBS washing, cells were incubated for 20 min in ice-cold 10% trichloroacetic (TCA; Roth, Karlsruhe, Germany), rinsed and lysed with 750  $\mu\text{l}$  per well of sodium hydroxide 0.4 N for 30 min at  $37^\circ\text{C}$ . The amount of radioactivity incorporated in DNA was determined by liquid scintillation spectrometry of the cell lysate. [ $^3\text{H}$ ]Thymidine incorporation was expressed in percentage of the control without treatment. Assays were performed in triplicate, and the experiment was repeated at least twice.

- ***In vivo* experiments**

*Animals*

Pathogen-free, 7-8 week-old female athymic NMRI-nu (nu/nu) nude mice (Elevage Janvier, le Genest, France) were allowed to acclimate for a least 2 weeks before starting experiments. Animals were maintained under specific pathogen-free conditions, kept at alternating 12-hour periods of light and dark, and given commercial food and water ad libitum. The procedures were performed in accordance with recommendations for the proper care and use of laboratory animals.

*Subcutaneous pancreatic tumor model*

The mice were injected subcutaneously into the dorsal flank with 200  $\mu\text{l}$  of parental or transduced BxPC-3 ( $10^7$  cells) on day 0. Investigations were carried out 10 days following inoculation, when the tumours reached 8-10 mm in diameter. The mice were divided randomly, 6 animals per group into 5 groups (1 control and 4 treated groups). The prodrug and chemotherapeutic agents were injected intraperitoneally at the dose to the following therapeutic schedule for 5 successive days (Fig. 2). The control group received intraperitoneal injections of 0.9% normal saline solution.

Tumor size was monitored for 30 days by measuring the width (w), length (l) and height (h) of each tumor twice a week in two perpendicular diameters by means of manual calipers. To calculate the volume (V), these data were integrated in the following formula:  $V = \pi.w.l.h/6$

#### *Induction of pancreatic peritoneal carcinomatosis*

To induce peritoneal carcinomatosis, nude mice were inoculated i.p. with  $5.10^6$  parental or transfected BxPC-3 in 200  $\mu$ l of RPMI-1640. In pilot experiments, the animals developed within 8-12 days a peritoneal carcinomatosis easily detectable with a binocular stereomicroscope. With the same schedule and the different groups, the therapeutic effect was followed over one month by survival curve determination.

#### • **Statistical analysis**

Mean and standard error of the mean were calculated. Statistically significant difference between treatments was assessed using a one-way analysis variance (ANOVA) followed by a parametric Student unpaired *t*-test, where Bartlett's test gave homogeneity of variance, or by a non-parametric Mann-Whitney test for significant different variances. Difference was considered significant when  $P < 0.05$ . Statistically significant difference towards 0 was assessed in the same way by a one-group comparison with a Student *t*-test. Correlation between some parameters was studied using a parametric Pearson test or a non-parametric Spearman test when variances were significantly different. InStat 2.00 Macintosh software (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) was used. Correlation curves were computed using Cricket Graph 1.2 software (Cricket Software, Malvern, PA, USA).

## **Results**

#### • **Vector functionality and establishment of stable transfectant pancreatic cell lines**

The functionality of the recombinant plasmid pCUT (Fig. 1) was confirmed by *hsv-TK* RT-PCR analysis after transient transfection of BxPC-3 cells. We observed that only RNA extracts from

transfected cells expressed high levels of *hsv-TK* mRNA, indicating that the expression plasmid construction is functional (data not show).

To evaluate the efficiency of *eCD/hsv-TK* double suicide genes system, we established a stable transfection of the cell line BxPC-3. Three to 4 weeks after transfection, clones resistant to zeocin selection were compared for their transcriptional expression of *TK* by RT-PCR assays and tested for their sensitivity to the two prodrugs, 5-FC and GCV (data not show).

- ***In vitro* cytotoxic effects of multi treatment analysis of *eCD/hsv-TK* transfected BxPC-3 cells**

The two prodrugs 5-FC and GCV, gemcitabine and raltitrexed were tested alone or combined for cytotoxicity against *eCD/hsv-TK* transfected or parental BxPC-3 cells. Transfected and non transfected cells were treated with different concentrations of two prodrugs, 5-FC and GCV, but also with chemotherapeutic agents, gemcitabine and raltitrexed. The viable cells were quantified by MTT assay (Fig. 2). After 72 hours of treatment, many of transfected cells detached from tissue culture plates and appeared “shrunken”. At the same time, the untransfected cells were adherent without any apparent cytotoxicity signs. The percentage of surviving cells after 3 days of treatment is show in Figure 2. Notably, treatment of parental cells did not significantly affect cell viability. In contrast, the viability of tumor cells expressing *eCD* and *hsv-TK* is sensitive to 5-FC and GCV prodrugs in concentration dependent manner (Fig.3). These results confirm the efficiency of our double suicide genes system on transfected BxPC-3 cells. The sensitivity to gemcitabine and raltitrexed alone was also dose dependent treatment. IC<sub>50</sub> values of raltitrexed ranged from 0.5 to 1 µg/ml instead of 1 to 2 µg/ml of gemcitabine for this pancreatic cancer cell line. So, raltitrexed was sensibly more potent than gemcitabine. The combination of chemotherapeutic agents and suicide genes system result in significantly greater loss of metabolite activity than that observed with treatment alone. This effect depends on the concentration of each molecule used.

- **Cell proliferation**

To clarify whether the combination multi treatment inhibits significantly the proliferation of the pancreatic tumor cells, transfected and parental BxPC-3 were incubated with different

concentrations of the two prodrugs, 5-FC and GCV and the two chemotherapeutic agents, gemcitabine and raltitrexed for 72 hours. Cell proliferation was estimated by [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation assay. As show in Figure 3, [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation levels decreased in transfected tumor cells in a concentration-dependant manner after combined treatment. Our results demonstrate that tumor cell growth was significantly inhibited at the second combining treatment. The cell proliferation was completely abolished with the highest concentrations present on the table 1. However, the growth of the parental cells was not affected by the different agents and continued to grow.

- **Therapeutic efficiency of multi treatment in pancreatic xenograft tumor model**

*Subcutaneous model*

The multi-treatment approach was further investigated on xenografted tumor growth. This *in vivo* experiment was performed with parental BxPC-3 cells and BxPC-3 stably transfected with the double suicide genes eCD and hsv-TK systems. 10<sup>7</sup> cells were inoculated subcutaneously into the dorsal flanks of female nude mice. The treatment protocol used for this experiment is described on Figure 4. Administration of prodrugs alone or in combination was initiated when tumors reached 0.4 to 0.5 cm in diameter. Animals received a different doses of compounds as indicated in the schedule experimental every 5 days for a total of three injections. Notably, the amounts used in combination are half compared to the treatment alone. After this administration, animals (5-7 per group) were monitored for tumor growth. There was no systemic toxicity observed after the prodrug and chemotherapeutic treatment. The body weight was not significantly changed after this injection (data not show). The intaperitoneal injection of 5-FC and GCV prodrugs suppressed significantly the tumor growth *in vivo* compared with tumor growth in control groups (P<0.01) (Figure 5). These results suggested that double suicide genes *eCD* and *hsv-TK* are effective in terms of antitumor activity *in vivo*. The double suicide genes treatment combined with gemcitabine and raltitrexed resulted a better antitumoral response than with the suicide gene system alone.

These results demonstrated that combining chemotherapy and suicide genes/prodrug strategy was more effective than each therapeutic modality used alone.

#### *Pancreatic peritoneal carcinomatosis model.*

The treatment with combining drugs and enzyme/prodrug systems also led to a survival advantage on carcinomatosis model (Fig. 6). The mean survival durations after treatment PBS, raltitrexed, gemcitabine, were 43, 54 and 68 days, respectively. A laparotomy examination showed that all mice treated with all compounds, remained tumor-free during this experiment with a better response with the last one (data not show).

## **Discussion**

Gene therapy represents a rapidly evolving approach to cancer treatment. While many types of transgenes have potential tumoricidal affects [27, 28], genes encoding for prodrug-activating enzymes have the most thoroughly investigated [29]. After genetically modifying tumor cells to express such enzymes, systemic prodrug treatment leads to the selective killing of tumor cells. This study confirms the efficacy of the double suicide genes/prodrug system eCD and hsv-TK in culture cells and in tumors established *in vivo*. The combination of both enzyme/prodrug systems and drugs was clearly more efficient in killing tumor cells than the application of a single treatment. This effect was not only additive but resulted in a slight synergistic cytotoxicity. For example, the coadministration of only 50/125 mg/kg GCV/5-FC, raltitrexed 10 mg/kg and gemcitabine 60 mg/kg (doses which are nontoxic) led to complete tumor rejection whereas the single concentrations of raltitrexed and gemcitabine protected only 25 and 33%, respectively.

Synergy between prodrug-activating systems could result from interactions between the prodrugs themselves, one prodrug being activated more in the presence of the other, or an interaction between the active metabolites of the prodrugs. One mechanism for synergism between the active metabolites involves the targeting of RNA processing by 5-fluorouracil complementing the targeting of DNA synthesis by gancyclovir phosphate [18]. Another explanation which explain the

synergistic effect is the complementary actions of the bystander effect of two suicide genes systems *eCD* and *hsv-TK*. The extent of the bystander effect can be determined from the effect of the treatment on non-genetically modified cells that takes place after prodrug administration, when only a fraction of the tumor mass is genetically, modified to express an activating enzyme [30, 31]. The striking successes described in gene-directed enzyme prodrug therapy would surely not be possible in the absence of such effect. For the eCD/5-FC system, toxic metabolites are formed after prodrug activation and may reload from dead and dying genetically modified cells. Supporting this model for the bystander effect is the observation that cell-to-cell contact is not required for the killing of untransfected cells by these agents, either *in vitro* or *in vivo*. For purine or pyrimidine nucleosides, the toxic metabolites are not diffusible across cell membranes, so the *hsv-TK/GCV* system requires necessary cell-to-cell contact, specially gap junction formation [32], to display a bystander effect. The benefit of combined gene therapy utilizing dual prodrug-activating systems will depend heavily on the individual bystander effects as well as on the extend of synergism between the bystander effects. Importantly also, the synergy between the eCD and *hsv-TK* bystander effects is important for *in vivo* gene therapy. The bystander effects is important because, during gene delivery, the gene transfer efficiency is low enough that most cells do not end up expressing the transgene. Moreover, the *in vivo* bystander effect may depend on an immune response against the prodrug-activating enzyme leading to a diffuse immune response against the entire tumor regardless of transgene expression [33]. Even if this mechanism is more important in the bystander effect than transfer of the prodrugs active metabolites, combining two foreign antigens like viral HSV-TK and bacterial CD could generate an augmented, synergistic antitumor immune response against nontransfected tumor cells.

Besides possible synergism, another potential advantage of combined gene therapy is that, as with combined conventional chemotherapy, combined gene therapy may diminish the impact of acquired drug resistance. 5-Fluorouracil 5-FU, a active chemotherapeutic agent is the final product of eCD/5-FC system but these compound show also a strong resistance. 5-FU resistance can result from altered binding affinity of thymidylate synthase for FdUMP and from amplification of the

thymidylate synthase gene [34]. The recognition of the pivotal role of TS in DNA synthesis and the limitations of fluoropyrimidines to produce profound and durable inhibition of the enzyme has led to the development of several new TS inhibitors, which have been rationally designed to bind to the folate pocket of the enzyme. One of them is raltitrexed which already approved for the therapy of advanced colorectal cancer in several European countries [35]. Both raltitrexed and 5-FU present the same action on the TS, block the formation of dTMP and deplete intracellular nucleotide pools so that actively proliferating cells then depend on salvage of performed nucleosides from extracellular. But raltitrexed has a specific mode of action and toxicity profile distinct from 5-FU. The mechanism of action of raltitrexed is also completely different from other chemotherapy drugs like gemcitabine. These compounds are attractive partners for combination treatment because of the non-overlapping toxicity profile of the two drugs (Fig. 6). The results of *in vivo* experiment suggested that the concomitant use of double suicide genes with raltitrexed or gemcitabine reduced significantly tumor growth and rendered tumor-free 50% of the co-treated mice. Notably in the schedule, the treatment in combination makes it possible to decrease by half the amounts of each compound compared to that used alone. Thus, decreased administration per systemic way can diminished the side effects for the patients. The impact of acquired prodrug resistance might be diminished through combination gene therapy followed by combined-prodrug and anticancer agent administration. Since the acquisition of simultaneous resistance to the active metabolites of prodrugs and drugs would be less likely than the acquisition of resistance to the single molecules.

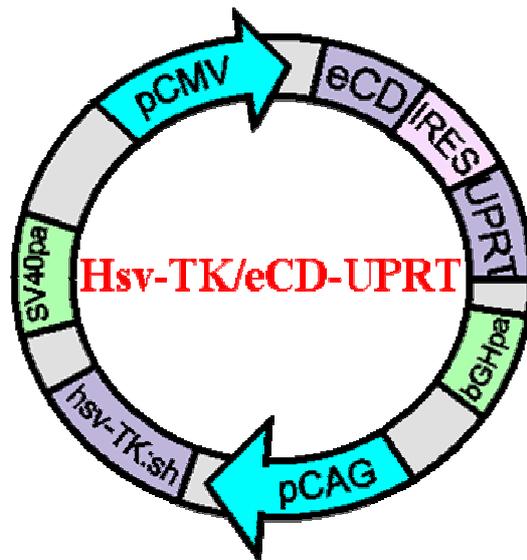
In conclusion, many agree that single-modality efforts are uniformly futile in pancreatobiliary tumors, and synergistic paradigms may offer a better chance of controlling tumor growth in clinical setting. These findings suggest a synergistic effect of combination of suicide genes and conventional chemotherapy in the treatment of pancreatic adenocarcinoma. This combination could be a strategy to reduced systemic cytotoxicity and chemoresistance observed in the majority of standard chemotherapy.

## References

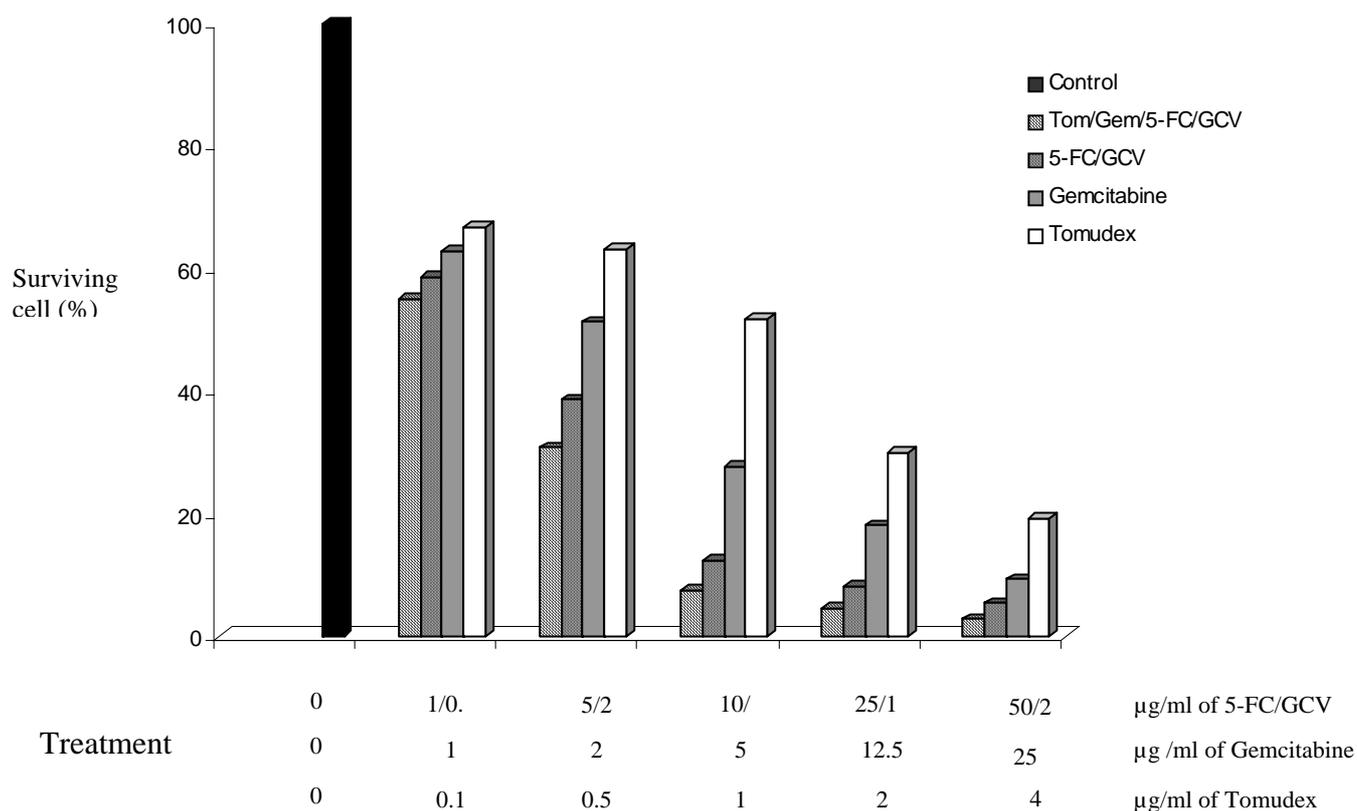
- 1 Ahlgren JD. Epidemiology and risk factors in pancreatic cancer. *Semin Oncol* 1996; **23**:241-50.
- 2 Sperti C, Pasquali C, Piccoli A, Pedrazzoli S. Survival after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Br J Surg* 1996; **83**:625-31.
- 3 Beger HG, Gansauge F, Leder G. Pancreatic cancer: who benefits from curative resection? *Can J Gastroenterol* 2002; **16**:117-20.
- 4 Bramhall SR, Neoptolemos JP. Adjuvant chemotherapy in pancreatic cancer. *Int J Pancreatol* 1997; **21**:59-63.
- 5 Johnson C. Prognosis in pancreatic cancer. *Lancet* 1997; **349**:1027-8.
- 6 Graziano F, Catalano G, Cascinu S. Chemotherapy for advanced pancreatic cancer: the history is changing. *Tumori* 1998; **84**:308-11.
- 7 Dachs GU, Dougherty GJ, Stratford IJ, Chaplin DJ. Targeting gene therapy to cancer: a review. *Oncol Res* 1997; **9**:313-25.
- 8 Roth JA, Cristiano RJ. Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going? *J Natl Cancer Inst* 1997; **89**:21-39.
- 9 Curiel DT, Gerritsen WR, Krul MR. Progress in cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2000; **7**:1197-9.
- 10 Moolten. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: Paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res* 1986; **46**:52-76.
- 11 Ezzedine, Martuza, Platika. Selective killing of glioma cells in culture and in vivo by retrovirus transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *New Biologist* 1991; **3**:608.
- 12 Mullen, Kilstrup, Blaese. Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: A negative selection system. *Proc Natl Acad Sci* 1992; **89**:33-7.
- 13 Mullen, Coale, Lowe, et al. Tumors expressing the cytosine deaminase suicide gene can be eliminated in vivo with 5-fluorocytosine and induce protective immunity to wild type tumor. *Cancer Res* 1994; **54**:1503-6.
- 14 Rowley, Lindauer, Gebert, et al. Cytosine deaminase gene as a potential tool for the genetic therapy of colorectal cancer. *J Surg Oncol* 1996; **61**:42-8.
- 15 Aghi M, Hochberg, Breakefield XO. Prodrug activation enzymes in cancer gene therapy. *Gene Med* 2000; **2**:148-64.
- 16 Springer CJ, Niculescu-Duvaz I. Prodrug-activating systems in suicide gene therapy. *J Clin Invest* 2000; **105**:1161-7.
- 17 Uckert, Kammertöns, Haack, et al. Double gene (cytosine deaminase and herpes simplex virus thymidine kinase) but not single gene transfer allows reliable elimination to tumor cells *in vivo*. *Human gene Therapy* 1998; **9**:855-65.
- 18 Aghi M, Kramm CM, Chou TC, Breakefield XO, Chiocca EA. Synergistic anticancer effects of ganciclovir/thymidine kinase and 5-fluorocytosine/cytosine deaminase gene therapies. *J Natl Cancer Inst* 1998; **90**:370-80.
- 19 Kaye, S.B. Gemcitabine. Current status of phase I and II trials. *J. Clin. Oncol.* 1994; **12**:1527-31.
- 20 Stornilo, A.M., Enas, Brown, et al. An investigational new drug treatment program for patients with gemcitabine-results for over 3000 patients with pancreatic carcinoma. *Cancer (Phila)* 1999; **85**: 1261-68.
- 21 Bouffard DY, Laliberte J, Momparler RL. Kinetic studies on 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) with purified human deoxycytidine kinase and cytidine deaminase. *Biochem Pharmacol* 1993; **45**:1857-61.

- 22 Plunkett W, Huang P, Gandhi V. Preclinical characteristics of gemcitabine. *Anticancer Drugs* 1995; **6**:7-13.
- 23 Plunkett W, Huang P, Searcy CE, Gandhi V. Gemcitabine: preclinical pharmacology and mechanisms of action. *Semin Oncol* 1996; **23**:3-15.
- 24 Van Cutsem E, Cunningham D, Maroun J, Cervantes A, Glimelius B. Raltitrexed: current clinical status and future directions. *Ann Oncol* 2002; **13**:513-22.
- 25 Jackman AL, Farrugia DC, Gibson W, Kimbell R, Harrap KR, Stephens TC, Azab M, Boyle FT. ZD1694 (Tomudex): a new thymidylate synthase inhibitor with activity in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1995; **31**:1277-82.
- 26 Kawamura K, Tasaki K, Hamada H, Takenaga K, Sakiyama S, Tagawa M. Expression of Escherichia coli uracil phosphoribosyltransferase gene in murine colon carcinoma cells augments the antitumoral effect of 5-fluorouracil and induces protective immunity. *Cancer Gene Ther* 2000; **7**:637-43.
- 27 Roth JA, Cristiano RJ. 1997. Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going? *J Natl Cancer Inst* 1997; **89**:21-39.
- 28 Kramm CM, Sena-Esteves M, Barnett FH, Rainov NG, Schuback DE, Yu JS, Pechan PA, Paulus W, Chiocca EA, Breakefield XO. Gene therapy for brain tumors. *Brain Pathol* 1995; **5**:345-81.
- 29 Connors TA, Knox RJ. Prodrugs in cancer chemotherapy. *Stem Cells* 1995; **13**:501-11.
- 30 Niculescu-Duvaz I, Spooner R, Marais R, Springer CJ. Gene-directed enzyme prodrug therapy. *Bioconjug Chem* 1998; **9**:4-22.
- 31 DiMaio, Clary, Via, and *al*. Directed enzyme prodrug gene therapy for pancreatic cancer in vivo. *Surgery* 1994; **116**:205.
- 32 Touraine RL, Ishii-Morita H, Ramsey WJ, Blaese RM. The bystander effect in the HSVtk/ganciclovir system and its relationship to gap junctional communication. *Gene Ther* 1998; **5**:1705-11.
- 33 Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL, Abraham GN. The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* 1993; **53**:5274-83.
- 34 Chu E, Grem JL, Johnston PG, Allegra CJ. New concepts for the development and use of antifolates. *Stem Cells* 1996; **14**:41-6.
- 35 Clarke SJ, Beale, PJ Rivory LP. Clinical and preclinical pharmacokinetics of raltitrexed. *Clin Pharmacokinet* 2000; **39**:429-43.

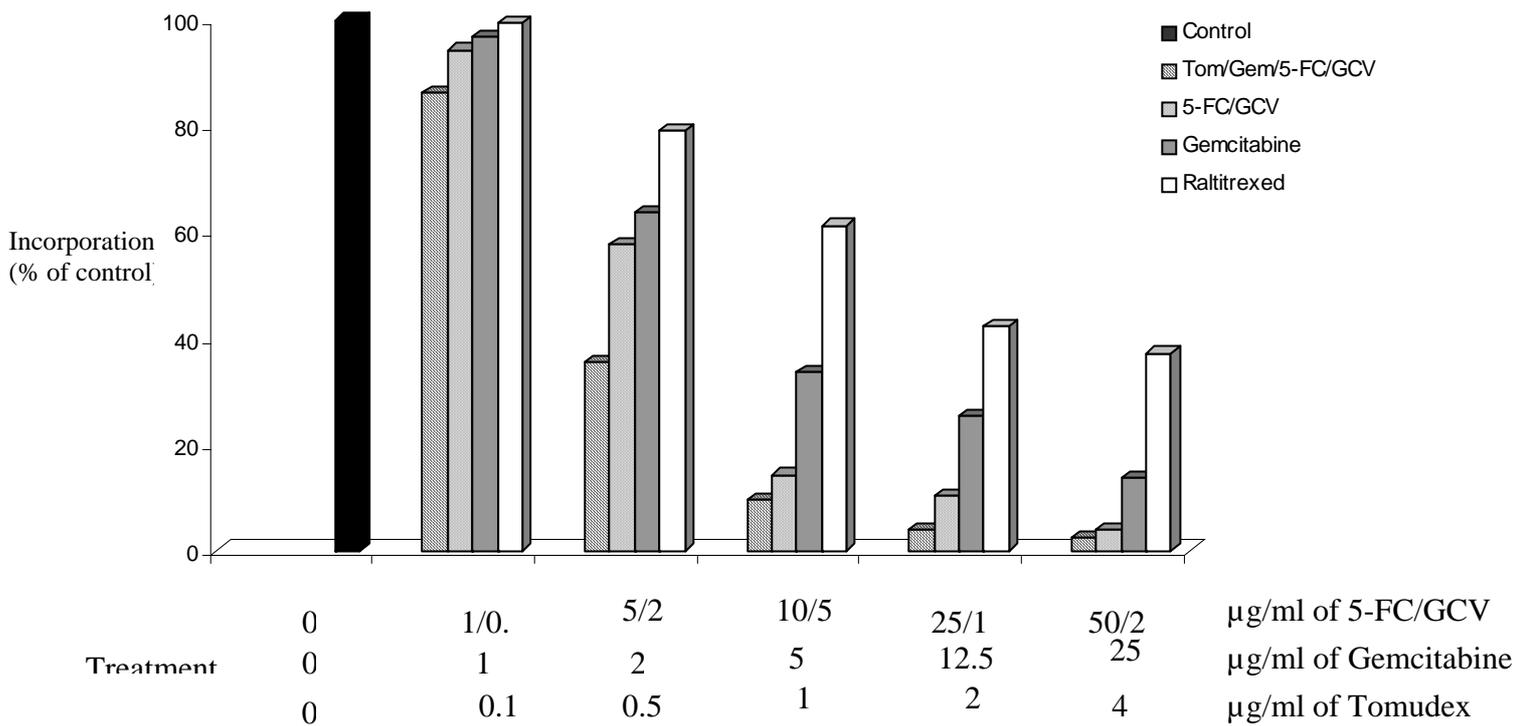
## FIGURE LEGENDS



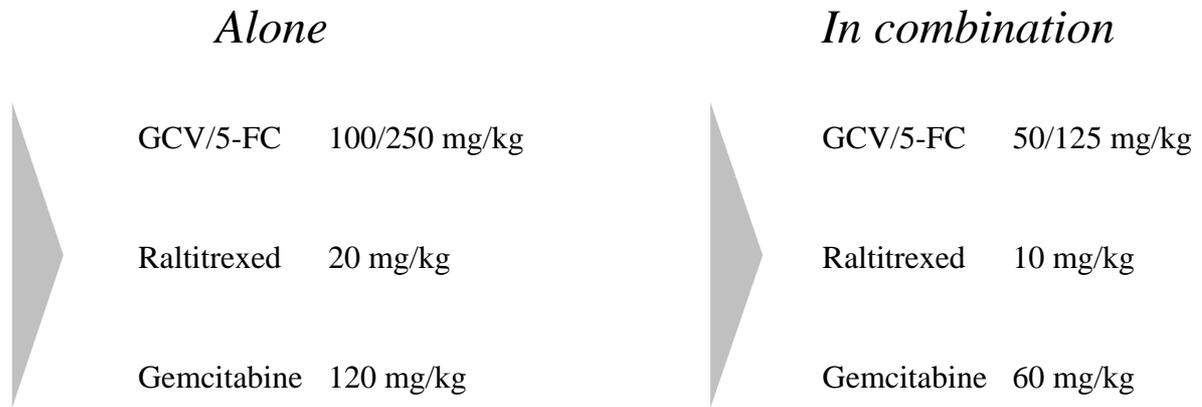
**FIGURE 1.** Schematic presentation of pCUT expression vector containing the hsv-TK gene under the control of the CAG promoter, the eCD/UPRT genes under the cytomegalovirus (CMV) promoter and zeocin selectable marker was used for this study.



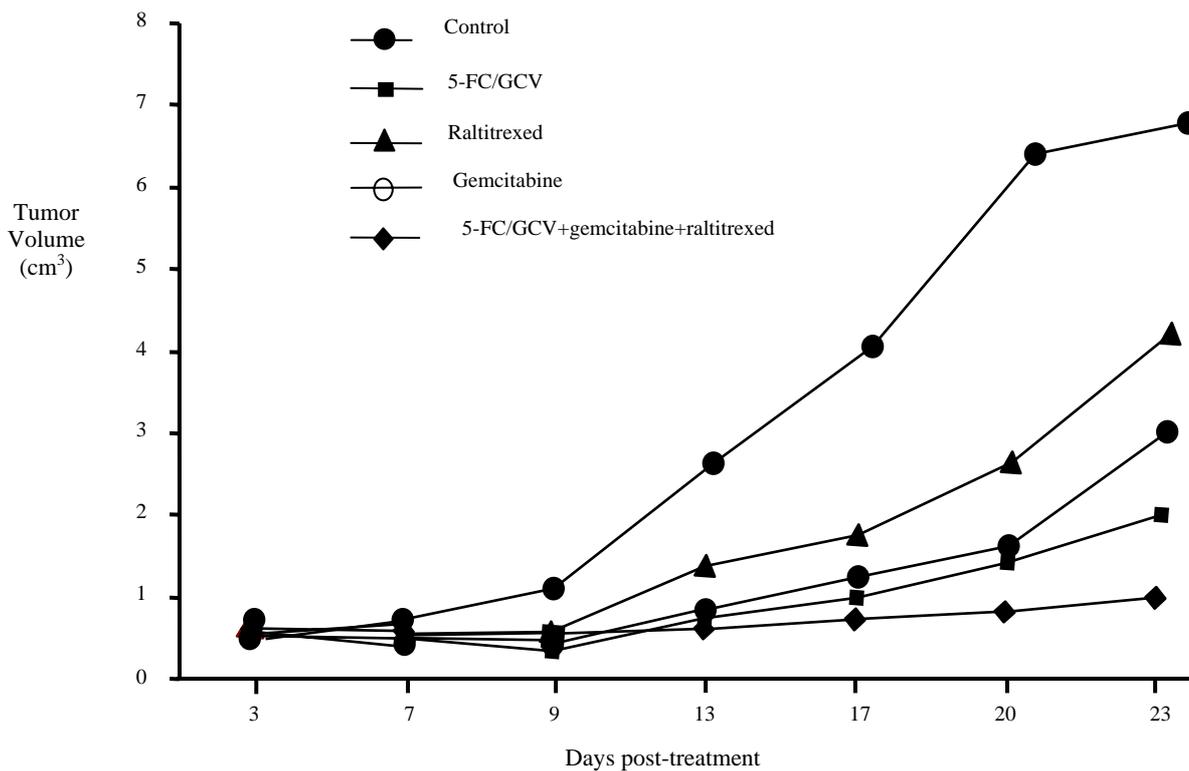
**FIGURE 2.** *In vitro* sensitivity of parental and transfected BxPC-3 pancreatic tumor cells to prodrugs and chemotherapeutic treatment. Parental as the control, stably transfected with the double suicide genes eCD and hsv-TK pancreatic tumor cells BxPC-3 was cultured for 72 hours in the presence of the dual prodrugs 5-FC and GCV and anticancer drugs, raltitrexed and gemcitabine at various concentrations as indicated. Cell viability was estimated by the colorimetric MTT assay. The cytotoxicity of untreated cells was evaluated and set to 100% to calculate the percentage of surviving cells. Three separate experiments were performed in triplicate. By 72 hours, treatment with double suicide genes had significantly reduced cell viability in transfected BxPC-3 cells when compared with controls. This reduction is more better in combining with anticancer drugs.



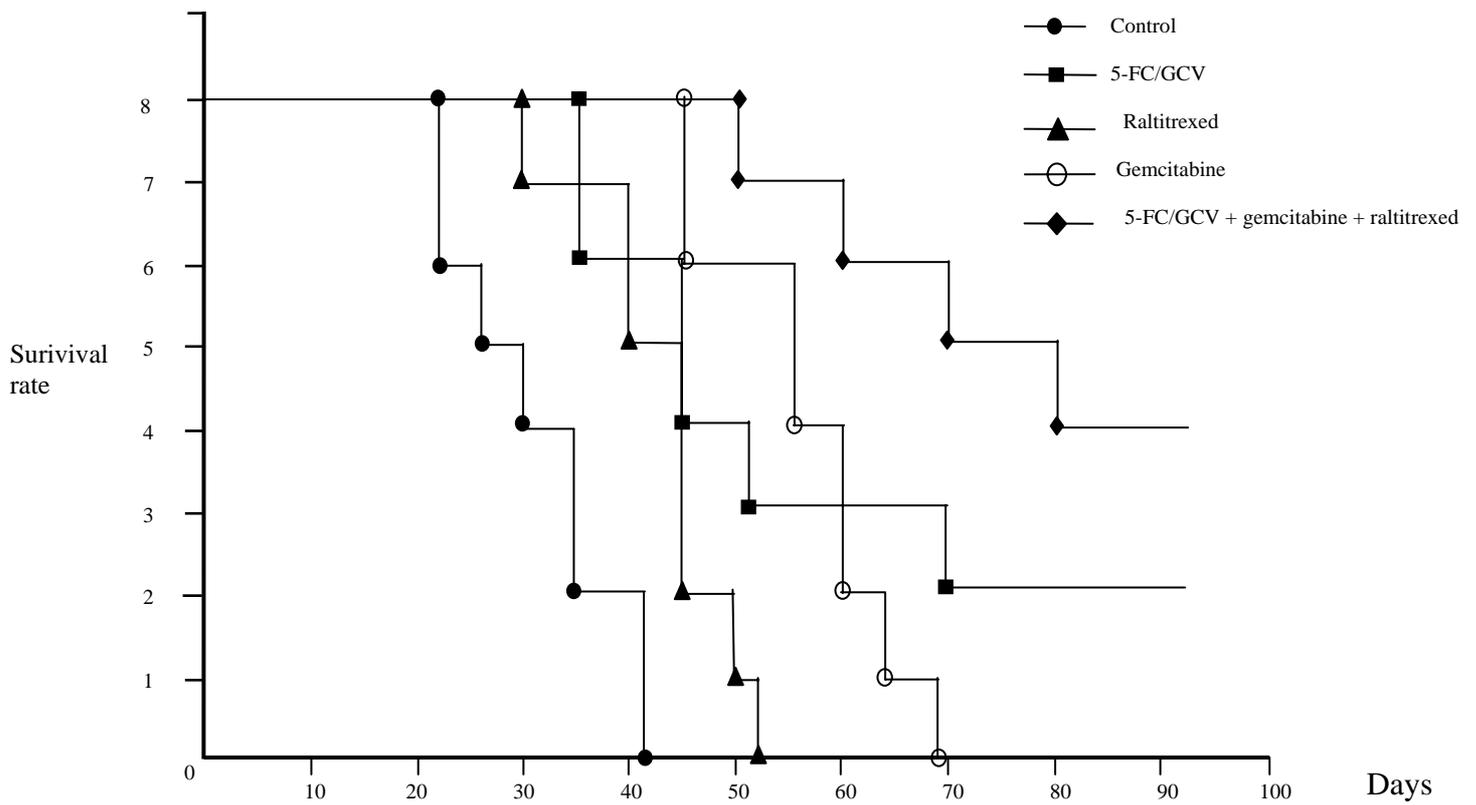
**FIGURE 3.** Proliferation of pancreatic tumor cells assessed by the uptake of tritiated thymidine. Parental stable transfected eCD/hsv-TK pancreatic tumor cells BxPC-3 were treated with different concentrations of dual prodrugs and anticancer agents, and cell proliferation was quantified 72 hours later by a [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation test. Incorporated [<sup>3</sup>H]thymidine was assayed as indicated in the methods section, and the average of 3 experiments presented as incorporation compared to the cells control. The different concentrations of compounds used did not affect the proliferative activity in the parental cell. However, uptake of [<sup>3</sup>H]thymidine in tumor cell expressing eCD and hsv-TK decreased in a concentration-dependent manner of 5-FC and GCV. This reduction is more important when the treatments are combined.



Schematic schedule of the experiment protocol on subcutaneous and pancreatic peritoneal carcinomatosis model in athymic mice, followed by anticancer agents and prodrugs combining or alone. At 8 days after injection of parental or transfected BxPC-3 pancreatic tumor cells, the mice were randomly affected to five treatment groups as indicated in the graph (n≥6). The treatment schedule for the last group receiving the full treatment scheme is shown here. Administration (i.p.) of the prodrugs GCV and 5-FC and anticancer agents raltitrexed and gemcitabine was for 21 successive days.



**FIGURE 4.** Suppression of tumor growth by multi-treatment. Subcutaneous tumors derived from parental and transduced BxPC-3 cells were treated with various concentrations of compounds as indicated. Tumor volume was monitored over time after inoculation of tumor cells. Values represent means  $\pm$  SD of at least six animals per group. Treatment with all compounds differs significantly from other control groups ( $P \leq 0.01$ ).



**FIGURE 5.** Kaplan Mayer survival curve of animals with BxPC-3 peritoneally xenografted mice. The difference in survival rates for athymic mice receiving combined treatment is significant compared with the single treatment with gemcitabine and raltitrexed.

## Discussion

### Article II

Le but principal de notre travail a été de démontrer que la combinaison entre une approche de la thérapie génique : celle des gènes suicides et la chimiothérapie, augmente l'effet anticancéreux par rapport à celui observé avec une seule de ces deux thérapies. Il est très important de remarquer que l'effet obtenu était plus important que celui prévisible par une simple addition des effets distincts des différents drogues et prodrogues.

Comme nous l'avons déjà mentionné pour l'article précédent, la synergie pharmacologique entre les systèmes d'activation des prodrogues, hsv-TK/GCV et eCD/5-FC résultent des interactions entre les prodrogues elles-mêmes qui peuvent être plus active en présence de l'autre, ou par une interaction entre les métabolites actifs des prodrogues. Cette synergie obtenue entre ces deux modalités d'activation a été déjà démontrée par Rogulsi [1997] et Freytag [1998]. Leurs mécanismes d'action sont impliqués au niveau cellulaire, dans la réduction de la thymidine *via* la déplétion médiée par le 5-FU et par la thymidylate cellulaire, et aussi la libération des sites actifs par l'enzyme hsv-TK pour la liaison du GCV [Aghi 1998]. De plus, le plasmide d'expression pCUT double gènes suicides comprend aussi le gène de l'uracile phosphoribosyl transférase ou UPRT d'*E.Coli*. Cette enzyme augmente l'activité du système eCD/5-FC en convertissant plus efficacement le 5-FU en ses métabolites toxiques. La présence de ce gène constitue une stratégie de chimiosensibilisation par l'amélioration du mode d'action de l'agent chimiothérapeutique, le 5-FU. Le gène UPRT est donc utilisé indirectement avec le système d'activation de prodrogue eCD/5-FC ou directement avec l'administration du 5-FU en obtenant un effet antitumoral plus important [Kanai 1998, Kawamura 2000].

D'une manière primordiale, cette approche de la thérapie génique, double gènes suicides potentialisés par le gène UPRT présente un « effet bystander » *in vivo* très important capable de contre-balancer l'efficacité relativement limitée en thérapie génique. En effet, alors que « l'effet bystander » du système hsv-TK/GCV nécessite un contact entre les cellules, le système eCD/5-FC présente « un effet bystander » plus important ne nécessitant pas ses contacts. Par conséquent, les mécanismes impliqués facilitent beaucoup mieux la diffusion du 5-FU [Kuriyama 1999, Aghi 2000].

Pour chaque molécule, autant pour les prodrogues que les agents chimiothérapeutiques utilisés dans ce travail, les mécanismes d'action sont basés sur le principe du mode d'action

des anti-métabolites. Ce sont des produits de synthèse, élaborés à partir de composés qui seront modifiés pour donner lieu à une « fausse clé » bloquant la « serrure » d'une activité cellulaire. Dans notre cas, leur structure chimique est voisine de celle des bases azotées (purine, pyrimidine) qui sont les précurseurs des acides nucléiques. Ces molécules seront intégrées dans la molécule d'ADN ou d'ARN, inhibant leur synthèse, indispensable à la croissance et la différenciation des cellules. Ainsi, leurs modes d'action sont complémentaires. L'ensemble des effets de ces agents anticancéreux cytotoxiques entraîne une inhibition de la croissance cellulaire, suivie d'une induction du phénomène d'apoptose ou de la mort cellulaire programmée. Mais cette voie se retrouve dérégulée dans les cellules tumorales, diminuant ainsi l'efficacité des traitements conventionnels [Making 2001, Tsuruo 2003]. En combinant les différentes approches thérapeutiques, le phénomène de l'apoptose est potentialisé donnant lieu à une meilleure réponse antitumorale. Il faudrait pour avoir une meilleure réponse de ces thérapies, surexprimer les gènes du mécanisme de l'apoptose comme les gènes pro-apoptotiques, bax [Kagawa 2000] faisant partie de la voie intrinsèque de l'apoptose ou celui de TRAIL [Lin 2003, Zhu 2004], gène du ligand d'un récepteur de mort ou de la voie extrinsèque. L'alternative à cette approche serait de diminuer les gènes anti-apoptotiques comme ceux de la famille de Bcl-2. Le gène bcl-2 lui-même, est une cible thérapeutique par l'utilisation de l'approche antisens. Les oligonucléotides antisens utilisés, sont orientés au niveau du cadre de lecture du gène bcl-2 pour empêcher son expression [Gutierrez-Puente 2002, Kim 2004]. Des résultats intéressants ont été décrits également concernant des peptides cellule-perméables qui miment le domaine BH3 de la famille des protéines Bcl-2. Ce domaine est très important pour les interactions entre les membres pro- et anti-apoptotiques de cette même famille. Ces petites molécules identifiées sont capables d'interrompre sélectivement la liaison de Bcl-X<sub>L</sub> ou Bcl-2 au domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques, les libérant pour induire le relargage du cytochrome *c* au niveau de la mitochondrie, puis l'apoptose [Degterev A 2001, Shangary 2002]. Ces deux alternatives pourraient être utilisées pour les tumeurs dans lesquelles le gène bcl-2 est surexprimé.

Pour évaluer l'efficacité de la combinaison entre deux gènes suicides eCD et hsv-TK et des agents anticancéreux, nous avons utilisé un modèle cellulaire exprimant de façon stable ces deux gènes suicides. Il est clair que ce travail demande une évaluation de la réponse antitumorale sur une expression transitoire de ces gènes. Lors du premier travail présenté, nous avons déjà prouvé l'efficacité de ce système double gènes suicides par lipofection sur

un modèle de carcinose péritonéale. Mais avec les expériences que nous programmions concernant la modulation de l'apoptose par le biais des gènes bax et TRAIL, il nous est apparu qu'il était essentiel de pouvoir quantifier la délivrance des transgènes au niveau de l'organisme entier, de connaître le comportement pharmacocinétique des différents vecteurs et d'estimer l'efficacité et la durée de l'expression des transgènes *in vivo*. Il était donc essentiel de disposer ou de développer une méthode simple et reproductible de visualisation de la biodistribution du transgène utilisé, sur l'animal anesthésié. La mise en place de ce type de système d'imagerie du vivant réalisé sur animaux anesthésiés, fait l'objet du travail suivant.

## **CHAPITRE III**

Etude d'un système  
d'imagerie moléculaire de fluorescence

## **ARTICLE 3**

**Feasibility, Sensitivity, and Reliability of  
Laser-Induced Fluorescence Imaging of  
Green Fluorescent Protein-Expressing Tumors  
*in Vivo***

# Introduction

## Article III

L'imagerie moléculaire *in vivo* est une méthode en émergence dans le domaine de la biologie du vivant. Elle permet de résoudre un certain nombre de problèmes liés à la compréhension des mécanismes impliqués dans les nouvelles disciplines que sont l'exploration du protéome et du métabolome. Il en est de même en ce qui concerne l'apparition des nouveaux outils de la thérapie génique. L'exploitation de la fluorescence de la Green Fluorescent Protein (GFP) est une des approches disponibles, utilisable de manière élémentaire en imagerie moléculaire pour tester l'efficacité de transfert de gène au cours d'une transduction *in vivo*. Sous excitation avec une lumière bleue, cette protéine émet une fluorescence verte caractéristique à 510 nm, sans la nécessité d'un apport exogène de substrat ou de cofacteur. Cette propriété est un avantage significatif par rapport aux autres gènes « reporters » communément utilisés tels que le gène de la  $\beta$ -galactosidase ou celui de la luciférase [Tsien 1998]. La capacité de contrôler la fluorescence de la GFP dans les tissus vivants fournit des informations fiables sur sa biodistribution et sa biodisponibilité. Cette technique offre aussi les moyens de déterminer la localisation et l'intensité de l'expression du gène reporter en fonction du temps.

Le but du travail présenté dans le prochain article était de déterminer la sensibilité et la spécificité d'un système d'imagerie moléculaire de fluorescence par l'étude *in vivo* de tumeurs contenant une concentration dégressive en cellules tumorales exprimant de façon stable la protéine GFP après transfection *in vitro*. Nous avons obtenu un clone de la lignée pancréatique cancéreuse humaine, BxPC-3 utilisé tout au long de notre travail, clone exprimant de façon constitutive cette protéine. Avant son utilisation proprement dite chez l'animal, l'expression et la fonctionnalité de la protéine ont été mises en évidence par différentes techniques comme la détection de la fluorescence au spectrofluorimètre après extraction de la protéine donnant lieu à un pic d'émission spécifique à 507 nm caractéristique de la GFP, la visualisation de la protéine au niveau cellulaire par observation au microscope à fluorescence et la vérification de l'expression du gène par RT-PCR en comparaison aux cellules parentales afin de corroborer les résultats en fluorimétrie. Le clone sélectionné exprimant de façon satisfaisante la protéine GFP fut alors utilisé comme une « sonde » fluorescente pour les expériences *in vivo*.

La mise en évidence de la faisabilité d'une telle approche repose sur la vérification de la fonctionnalité de l'expression du gène GFP non plus en situation de culture cellulaire mais dans un organisme vivant. Cette approche nécessite l'utilisation d'un système d'imagerie de fluorescence adapté au vivant et de modèles animaux dans lesquels puissent être « greffé » cette sonde. Ayant conservée sa tumorigénicité, une quantité bien précise de cellules BxPC-3 sont injectées selon le protocole envisagé soit en sous-cutanée, soit en intra-pancréatique *via* une mini-laparotomie sous anesthésie générale de l'animal.

Le dispositif d'imagerie de la GFP qui a été utilisé dans ce travail a été développé en collaboration avec le Groupe d'Optique Appliqué du CNRS de Cronenebourg et le groupe d'optique du Joint research Center de l'Union Européenne à Ispra. Ce procédé simple et maniable comprend : une source d'excitation laser Titane : Saphir en mode doublé ( $\lambda=400$  nm), des filtres interférentiels adaptés à la fluorescence spécifique de la GFP (520 nm dans les tissus vivants) et à la fluorescence constitutive des tissus (470 nm) dite autofluorescence. L'élimination de l'autofluorescence naturelle des tissus a été obtenue par traitement des images numériques primaires recueillies grâce à une caméra CCD.

Le but de cette étude était de tester la faisabilité et la fiabilité de ce procédé d'imagerie de fluorescence induite par laser pour la visualisation de gènes reporters *in vivo*. Une telle méthode doit être apte, pour présenter un intérêt dans l'étude d'un transfert de gène chez le vivant, à visualiser et à localiser les tumeurs et leurs métastases en les « allumant » directement chez l'animal anesthésié.



**Article** : Feasibility, sensitivity and reliability of laser-induced fluorescence imaging of green fluorescent protein expressing tumors *in vivo*. S.Wack, A.Hajri, F.Heisel, J.Marescaux, M.Aprahamian. Mol Ther. 2003;7(6):765-73. **(fluo - format pdf)**

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

**Severine Wack**, Amor Hajri, Francine Heisel, Malgorzata Sowinska, Cédric Berger, Maurice Whelan, Jacques Marescaux, and Marc Aprahamian

**Feasability, sensitivity, and reliability of laser-induced fluorescence imaging of green fluorescent protein-expressing tumors *in vivo* .**

Molecular Therapy 7, 765-773 (2003)

Pages 765-773 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

[http://dx.doi.org/10.1016/S1525-0016\(03\)00102-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1525-0016(03)00102-3)

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr).

## Discussion

### Article III

L'imagerie moléculaire par fluorescence à laser induite nous a permis d'obtenir 100% de sensibilité et de spécificité dans la détection *in vivo* de tumeurs ne comportant que 10% de cellules exprimant le gène de la GFP. Cette méthode d'imagerie moléculaire a détecté des taux plus faibles de cellules transfectées (1 à 5%) mais avec une perte de sensibilité de 50%. Les cellules BxPC-3 exprimant la GFP d'origine humaine ont été injectées de deux façons, soit en sous cutanée, soit en position orthotopique par implantation dans le pancréas de souris immuno-compromises. De plus, ce procédé a été utilisé sur une période de plus de cinq semaines afin de mettre en évidence la stabilité de l'expression de la GFP avec 10% de cellules BxPC-3/GFP implantées dans le pancréas, un modèle animal plus proche de la réalité pour ce type de cancer. Ainsi, nous avons pu réaliser une visualisation directe de la progression tumorale mais aussi de sa dispersion au niveau des autres organes.

Nous avons pu au cours de cette étude *in vivo*, démontrer la faisabilité et les performances d'une telle approche d'imagerie moléculaire. Ce dispositif accède maintenant à la possibilité de localiser et d'évaluer l'efficacité d'un transfert de gène réalisé sur l'animal de laboratoire. L'étape suivante de l'utilisation de ce procédé consiste à tester les différents types de vecteur proposés en thérapie génique dans le but de visualiser directement l'expression du gène reporter chez l'animal vivant. Nous avons déjà pu tester par imagerie (travail non publié) la transfection transitoire du gène GFP réalisé avec un vecteur non viral ; la solution lipidique, le BGTC, utilisée dans le premier article sur le modèle de carcinose péritonéale. Après 48 heures post-transfection du gène GFP, les nodules péritonéaux ont été soumis à une imagerie de fluorescence à la suite d'une incision médiane de la paroi abdominale sur souris anesthésiée et nous avons pu observer les différents nodules tumoraux, spécifiquement fluorescents par la présence de la GFP, disséminés dans le péritoine.

Comme indiqué précédemment, la détection de la fluorescence de la GFP par imagerie moléculaire pour de faibles taux de transfection (environ 10%) nécessite une laparotomie car la peau et les poils présentent une très forte autofluorescence naturelle à cette longueur d'onde d'excitation interférant avec celle du signal relativement faible de la GFP. Il existe d'autres fluorochromes endogènes tels que les cofacteurs à nicotinamide comme NADH et ceux à flavines tels que FADH, molécules nécessaires aux enzymes des voies métaboliques cellulaires, qui possèdent une fluorescence spontanée à 520 nm [Pitts 2001]. De plus, la

muqueuse du tractus digestif ainsi que certaines tumeurs synthétisent spontanément de la protoporphyrine IX ou PPIX, précurseur de l'hémoglobine et qui se comporte comme un chromophore endogène émettant un double pic de fluorescence à 630/690 nm sous une excitation à 400 nm. Pour remédier à ce phénomène d'autofluorescence, une série d'images a été réalisée en parallèle, par soustraction pixel par pixel des images obtenues au travers d'un filtre interférentiel centré à 630 nm de celles collectées *via* un filtre centré à 600 nm, recueillant le « bruit de fond » dans le rouge. Une autre alternative possible est d'utiliser la red fluorescent protein ou RFP, un homologue distant de la GFP provenant des coraux. Cette protéine possède deux nouvelles propriétés intéressantes dans le cadre de la famille des protéines fluorescentes ; un spectre d'émission déplacé vers le rouge et une oligomérisation pour former des tétramères au lieu de dimères comme dans le cas de la GFP [Campbell 2002]. Les avantages potentiels d'utilisation de cette protéine sont :

- une fluorescence beaucoup plus intense et plus brillante que celle de la GFP puisque l'émission dans le rouge est moins absorbée que dans le vert,
- une fluorescence plus spécifique de la tumeur comme son spectre d'émission est complètement séparé de celui de l'autofluorescence qui parasite celui de la GFP et enfin,
- une meilleure qualité d'acquisition des images pour de très petites tumeurs et de micro-métastases [Katz 2003].

De plus, la protéine fluorescente rouge a des propriétés spectrales qui sont idéales pour des expériences en duo avec la GFP. Ainsi, Yang et Col. [2003] ont développé une technique simple et très intéressante, permettant de délimiter les événements morphologiques de l'angiogenèse et d'autres phénomènes induits par la tumeur. Par cette méthode, des images nettes de tumeurs implantées et de stroma adjacents ont été obtenues, distinguant les composants de l'hôte de ceux de la tumeur. L'imagerie en duo de fluorescence a été effectuée en utilisant des cellules tumorales exprimant de façon stable la RFP implantées dans des souris transgéniques exprimant la GFP. Ce modèle montre clairement les détails des interactions stroma-tumeur, spécialement au cours de l'angiogenèse induite par la tumeur et l'infiltration des lymphocytes dans la lésion.

L'imagerie moléculaire est une discipline relativement nouvelle développée au cours de ces dix dernières années, limitée initialement à des technologies d'imagerie *in situ* de gènes « reporters ». Les techniques non invasives d'imagerie moléculaire *in vivo*, développées plus récemment, sont basées sur l'imagerie nucléaire comme la tomographie d'émission de

positrons ou TEP, la caméra gamma et l'autoradiographie aussi bien que la résonance magnétique et l'imagerie optique *in vivo* comprenant les gènes de la  $\beta$ -galactosidase et celui de la luciférase. Mais l'inconvénient de ces méthodes est soit l'utilisation de substances radioactives, soit la nécessité de l'addition de substrat et de cofacteurs pour l'acquisition des images. Le procédé utilisant la fluorescence de la GFP ne présente pas ces inconvénients majeurs. De plus, les méthodes d'endoscopie et de chirurgie mini-invasive sont en plein essor. Un système combiné avec ce système d'imagerie et un endoscope pourrait aisément être développé. Bird et Col. [2003] ont décrit un micro-endoscope équipé pour une imagerie de fluorescence dite deux-photons, basée sur un coupleur de fibres optiques en mode simple, d'un micro-prisme et d'un gradient-index. Ce type d'endoscope possède une résolution axiale de 3.2  $\mu\text{m}$  et donne la possibilité de collecter des images transversales de coupes de structures cylindriques internes de 3 mm de diamètre, taille correspondante à de nombreux viscères chez l'animal d'expérience. Un tel dispositif illustre bien le potentiel existant au développement d'outils diagnostic en temps réel applicable à la recherche biomédicale, méthodes qui permettront de supprimer le recours à des biopsies aussi bien chirurgicales que per-cutanées. Un tel potentiel trouvera des applications aussi bien dans le domaine de la détection précoce du cancer que dans le diagnostic et le suivi thérapeutique d'autres pathologies. A notre échelle, la combinaison d'un tel dispositif au système de fluorescence induite par laser devrait faciliter l'étude de la biodistribution du gène « reporter » au niveau des différents sites potentiels au cours de l'évolution du cancer.

Grâce au progrès des outils de la biologie moléculaire, le gène de la GFP, peut-être utilisé comme « marqueur » pour l'expression de gène et la localisation de protéine en le fusionnant au gène d'intérêt. Ces « protéines de fusion » donnent la possibilité de suivre l'efficacité, le rendement et la rémanence du gène thérapeutique tout au long de l'étude. C'est dans cette optique que nous avons conduit le travail suivant. Dans le même temps, nous souhaitons apporter la démonstration du potentiel en thérapie génique des cancers d'un ciblage transcriptionnel. A savoir que le ciblage constitue de manière générale, une des préoccupations majeures en thérapie génique.

## **CHAPITRE IV**

### Etude d'une approche multi-thérapeutique et multi-génique

Combinaison et visualisation d'une autre approche  
de thérapie génique avec la chimiothérapie

## **ARTICLE 4**

Combination and real time imaging  
of Bax & TRAIL Gene Therapy and  
Chemotherapy for  
the Treatment of Pancreatic Cancer

# Introduction

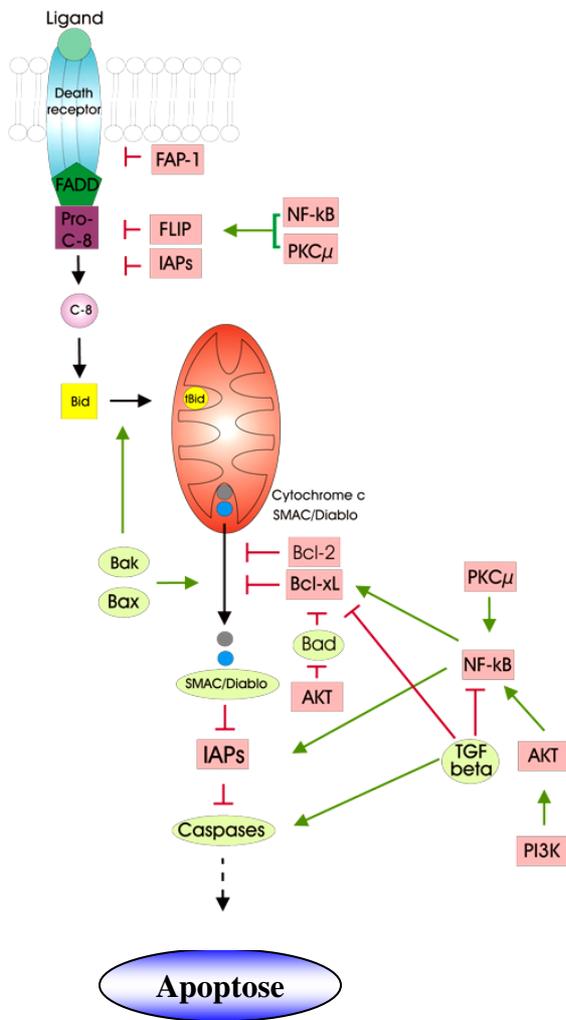
## Article IV

Le mécanisme de mort des cellules tumorales en réponse aux différentes thérapies anticancéreuses telles que la chimiothérapie et la radiothérapie, est généralement l'apoptose [Houghton 1999]. Ces traitements sont le plus souvent appliqués de manière discontinus du fait de la toxicité intolérable des agents thérapeutiques utilisés pour l'organisme et/ou aussi du fait d'un développement de résistance aux différentes modalités de traitement. Le mode majeur de résistance à ces thérapies anti-tumorales est en relation avec l'insensibilité des cellules tumorales à l'induction de l'apoptose.

Cette « mort programmée » est un procédé cellulaire qui joue un rôle important au cours du développement des mammifères, dans l'homéostasie des tissus et dans la régulation du programme de suicide cellulaire. Les désordres dans lesquels la régulation défectueuse de l'apoptose contribuant à la pathogenèse des maladies ou à sa progression, peuvent être impliquer au niveau de l'accumulation des cellules due à une altération de leur croissance ou de leur éradication, ou au niveau de la perte cellulaire où le programme de mort cellulaire est déclenché de façon inapproprié. L'apoptose est un phénomène nécessaire pour empêcher l'apparition ou le développement de nombreuses maladies dont le cancer et sa dérégulation aurait un lien directe avec la tumorigenèse [Reed 2000]. Ce mécanisme est contrôlé par une variété de gènes (*Figure 14*) qui présentent pour les uns, des fonctions pro-apoptotiques et pour d'autres, des fonctions anti-apoptotiques. La balance relative entre ces activités en compétition détermine le devenir des cellules.

Comme nous l'avons souligné dans l'introduction de l'article précédent, l'induction de l'apoptose constitue une approche des plus prometteuses en thérapie génique des cancers, ouvrant ainsi un nouveau champ de perspectives thérapeutiques [Levine 1995].

D'ailleurs, le cancer pancréatique est très résistant à la chimiothérapie [Groeningen van 1999]. Il nous a semblé judicieux, dans le cadre de l'application de ce type de cancer, de réaliser la combinaison d'un agent chimiothérapeutique avec des gènes pro-apoptotiques, permettant ainsi de déclencher l'apoptose à différents niveaux et/ou par des voies séparées. Nous espérons par ce biais augmenter l'induction de ce mécanisme, améliorant ainsi la réponse anti-tumorale de l'agent anticancéreux.

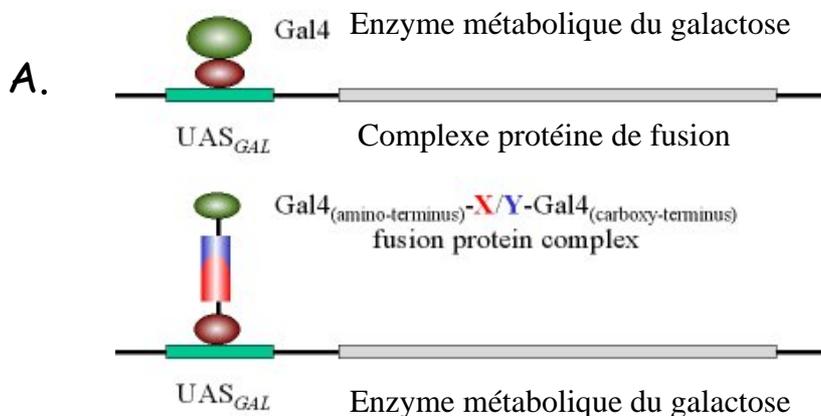


**Figure 14.** Les gènes impliqués dans l'apoptose. La mort cellulaire programmée est contrôlée par de nombreuses protéines pro- (verte) et anti- (rouge) apoptotiques. L'équilibre entre ces protéines est important pour assurer l'homéostasie des tissus.

Il existe schématiquement deux grandes voies de signalisation intracellulaire conduisant à la mort par apoptose : la première dite « extrinsèque » met en jeu des récepteurs membranaires ou récepteurs à domaine de mort ; la seconde dite « intrinsèque » fait intervenir la mitochondrie. Pour obtenir un effet antitumoral optimal, nous avons utilisé simultanément deux gènes, impliqués dans ces deux voies. Les gènes bax et tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand ou TRAIL, sont des gènes pro-apoptotiques très bien caractérisés et dont l'efficacité anti-tumorale a été déjà démontrée dans de nombreux travaux [bax ; Li 2001, Xu 2002, TRAIL ; Shah 2003]. Du fait de l'intensité de leur activité pro-apoptotique, nous avons choisi de les exprimer sous conditionnement afin d'éviter une atteinte des tissus sains. Pour ce faire, nous avons utilisé le promoteur tissu-spécifique, hTERT de la télomérase, une ADN-polymérase responsable de la réplication des extrémités des chromosomes, les télomères. Cette enzyme est fortement active dans les lignées cellulaires immortalisées et pour plus de 85% de cancers humains, mais elle est inactive dans la plupart des cellules somatiques [Kim 1994, Shay 1997]. L'utilisation de promoteurs spécifiques est néanmoins grevée d'un inconvénient majeur : leur faible activité

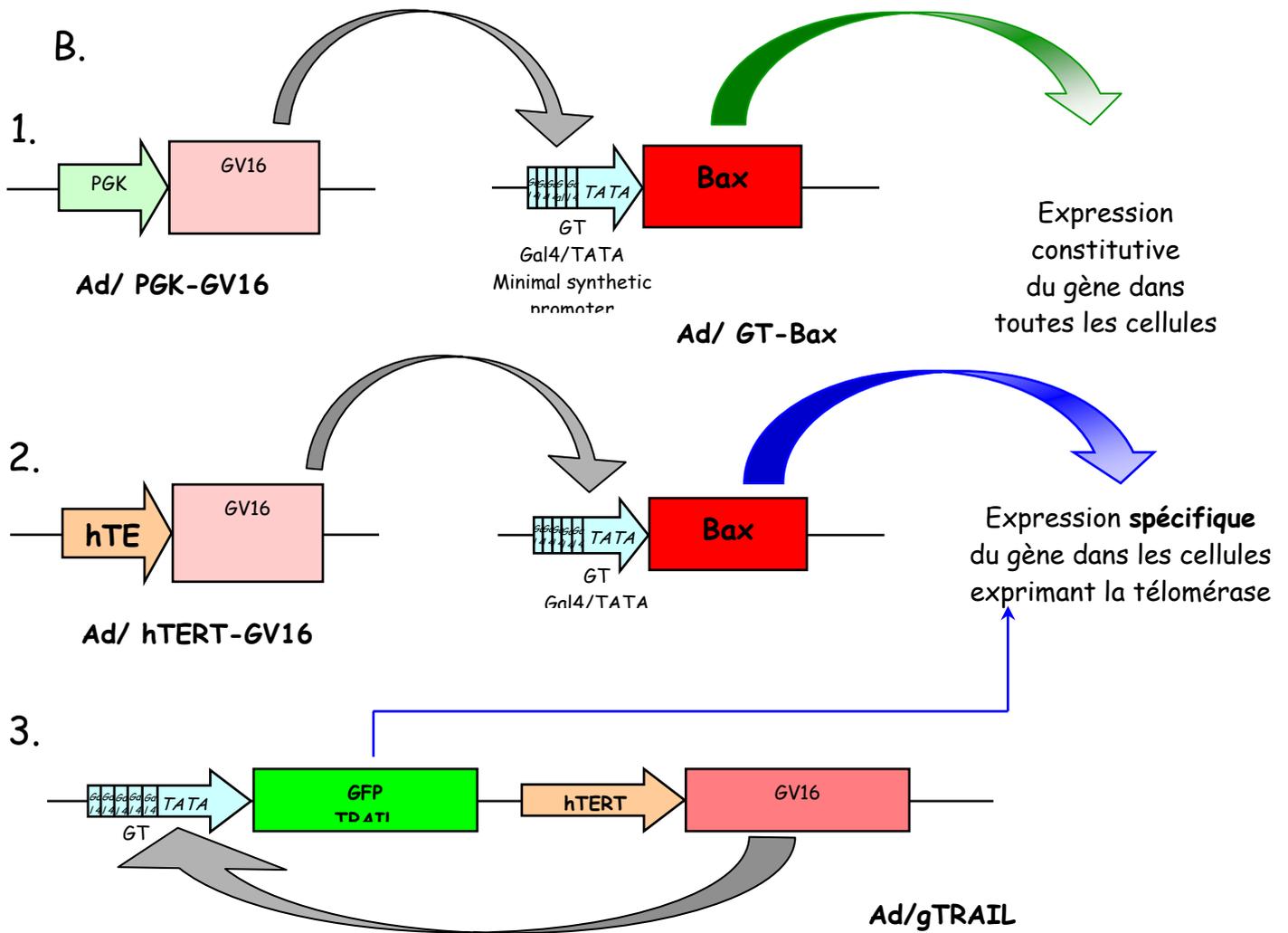
transcriptionnelle par rapport à un promoteur viral constitutif tel que celui du cytomégalovirus (CMV). Il a été précédemment par l'équipe de Koch que l'élément de réponse synthétique GAL4 du promoteur GAL4/TATA (GT) qui présente une activité basale faible dans une variété d'organes, est fortement inductible par une concentration peu élevée de la protéine trans-activatrice VP16 [Koch 2001]. Nous avons donc utilisé, en raison de cette propriété, le système GAL4 dans notre travail, afin d'augmenter l'activité transcriptionnelle du promoteur spécifique hTERT (*Figure 15*).

Dans cette étude, nous avons testé la capacité d'un transfert de gènes médié par un système binaire d'adénovirus et l'induction de leur expression par le promoteur spécifique hTERT sur des lignées cancéreuses pancréatiques humaines *in vitro* et *in vivo*. De plus, en raison des performances de l'imagerie moléculaire de fluorescence que nous avons observé dans notre travail précédent, nous avons visualiser dans ce travail à la fois, la réalité du ciblage par ce promoteur ainsi que son efficacité par l'appréciation de l'effet thérapeutique des gènes pro-apoptotiques, bax et TRAIL combinés à la gemcitabine, par le suivi temporel de l'évolution de la masse tumorale intra-pancréatique sur animal anesthésié.



**Figure 15.** Thérapie génique ciblée de l'apoptose des gènes bax et TRAIL utilisant le système régulateur Gal4/VP16 (GV16) et le promoteur tumeur spécifique, hTERT.

A. Le système GAL4 intervenant dans le métabolisme du galactose de la levure. Les gènes GAL produisent des enzymes responsables du métabolisme du galactose. Les promoteurs des gènes GAL1 et GAL10 sont activés lorsque le facteur de transcription GAL4 se fixe sur la séquence UAS (Upstream Activating Sequence) qui est l'équivalent de l'enhancer chez la levure. La protéine GAL80 empêche cette activation en se liant à GAL4.



**B.** Le système binaire d'adénovirus suivant le principe précédent du double hybride. **(1)** Système binaire avec le promoteur constitutif PGK, **(2)** Système binaire avec le promoteur spécifique hTERT, **(3)** Système simple d'adénovirus.

# **Combination and real time imaging of Bax & TRAIL Gene Therapy and Chemotherapy for the Treatment of Pancreatic Cancer**

Séverine WACK<sup>1</sup>, Marc APRAHAMIAN<sup>1</sup>, Amor HAJRI<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> *INSERM Unit 701, IRCAD, Strasbourg, France*

\* To whom correspondence should be addressed at INSERM Unit 375, IRCAD, 1 place de l'Hôpital, BP 426, 67091 Strasbourg cedex, France.

Phone: (33) 3 88 11 90 00. Fax: (33) 3 88 11 90 99

E-mail: [Amor.Hajri@ircad.u-strasbg.fr](mailto:Amor.Hajri@ircad.u-strasbg.fr)

## **Abstract**

Inability to die by apoptosis is one of the reasons for the deregulated growth of tumour cells and frequently observed failure of chemotherapy. Tumor necrosis factor (TNF) related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and bax genes have already been shown to induce apoptosis in neoplastic cells. However, it is unclear whether a combination of TRAIL and bax gene therapy and chemotherapy will have enhanced antitumor activity or can be used for the treatment of metastasis. In this study, we first investigated the combined effect of these two pro-apoptotic genes and in the second part their combination with chemotherapeutic agent, including gemcitabine, in different pancreas cancer cell lines. The cytotoxic effect of bax and TRAIL was evaluated *in vitro* by different recombinant adenovirus systems expressing the human bax or TRAIL genes under the control of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter (designated Ad/gBax and Ad/gTRAIL). In all the cell lines tested, including a pancreas cancer cell line that is resistant to chemotherapy, the combination of TRAIL and bax gene therapy and cytotoxic agent had either a synergistic or an additive effect. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that treatment with the two adenoviral systems result in high-level expression of bax gene in cancer cells or in tumors but no detectable transgene expression in normal mouse tissues. Furthermore, treatment with adenovirus and gemcitabine suppressed tumor growth and prolonged duration of survival *in vivo* in comparison with one treatment. This antitumoral response was monitored with whole-body optical imagery system. This should facilitate studies of modulators of cancer growth including new therapeutic strategies. Together, these results suggest that the two gene pro-apoptotic genes driven by the hTERT promoter has potential application in cancer therapy and therefore their combination with gemcitabine increased therapeutic efficacy of the anticancer agent.

**Key words** : gene therapy, targeting, apoptosis induction, imagery optical molecular.

## **Introduction**

Human pancreatic cancer is a dismal disease with a poor prognosis and a short patient survival of approximately 4-6 months after diagnosis. It is the fourth or fifth most common cause of cancer-related death in the European Community and in North America each year [1-4]. Because of difficulties in early diagnosis, the aggressive character of the tumor and the lack of effective systemic therapies, over 95% of patients with pancreatic cancer die within 5 years of diagnosis. It develops, often without clinical manifestations, until it is at an advanced stage [5-9]. Consequently, 80% of patients have involved regional lymph nodes or distant metastases at time of diagnosis [10]. Surgical resection in dedicated specialist units [11-13] provides the best possibility for long-term survival [14-20] but is feasible only in the minority of patients [21] and is not without risk [22]. In advanced disease where surgery is not an option, chemotherapy, including gemcitabine [23, 24] or biomodulated 5-fluorouracil (5-FU and folinic acid) [8, 25], is considered, although the effects are modest [26]. In randomized trials, gemcitabine was the first and only chemotherapeutic agent that has been shown to have any meaningful impact on either survival or disease-related symptoms in pancreatic adenocarcinoma [27]. But pancreatic cancer invariably responds poorly to chemotherapy [28] because this cancer remains a highly chemoresistant malignancy. Another problem is the disadvantages of chemotherapeutic agents are not much efficacious and with so many toxic side effects. Next, safe and effective further therapy is needed. The development of new cancer therapies that the toxicity to normal tissues such as the gut lining and bone marrow is an important area of research [29]. Gene therapy, which aims to modify cells for therapeutic gain, has been proposed as a method that may achieve this specificity [30, 31].

Since chemotherapeutic agents act through induction of programmed cell death, or apoptosis, more effective treatment modalities may be devised thorough understanding of the underlying mechanisms [32]. Apoptosis is a cell death process that plays a critical role in mammalian development and tissue homeostasis but this process also directly regulates tumorigenesis. Correspondingly, insensitivity to apoptosis induction may be a major mode of resistance to

antitumor therapy. [33]. Apoptosis induction is a promising approach for cancer gene therapy. Several proteins that control programmed cell death in cancer cells have been identified and implicated in this mechanism. Apoptosis is controlled by a variety of genes, some with pro- and others with anti-apoptotic functions. The relative balance of these competing activities determines cell fate. The overexpression of the two of pro-apoptotic genes, bax and TRAIL leads separately to apoptosis in a wide variety of cancer cell lines and sensitizes them to treatment [34-39]. On the basis of these first results, we hypothesize that simultaneous activation of the membrane and mitochondria-dependent pathways would elicit a stronger antitumor effect than a single. In this work our prime objective is to evaluate therapeutic efficacy of two proapoptotic genes, bax and TRAIL on different cancer pancreatic models. However, a drawback of current proapoptotic gene therapy is its toxicity. This could be avoided by targeting gene expression through tumor-specific promoters. In this regard, we used the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter, - whose gene is highly active in immortalized cell lines and in more than 85% of human cancers including pancreatic cancer but quiescent in most of the somatic cells [40, 41] to target proapoptotic genes to cancers [42]. Moreover, Lin and al. demonstrated that the GAL4 gene regulatory system can be used to augment transgene expression from a tumor-specific promoter without losing the target specificity [43]. To combine all these qualities into one treatment, we used binary adenoviral recombinant systems that express the bax and TRAIL genes separately driven by the hTERT promoter via GAL4 gene regulatory components (Ad/GT-Bax and Ad/g TRAIL).

The goal of the present study was to determine, both *in vitro* and *in vivo*, the therapeutic efficacy of simultaneous binary adenoviral vector systems encoding bax and TRAIL genes by specific promoter and to evaluate their combination with a chemotherapeutic agent. Treatment with Ad/gTRAIL and Ad/GT-Bax resulted in the high-level expression of genes and a strong antitumor effects in comparison with only one system. This gene therapy approach can increase sensitivity to chemotherapeutic drugs in pancreatic cancer cell lines, including chemoresistant cells. In addition, the primary and metastatic tumors can be visualized, tracked and imaged, in real time, using selective tumor GFP fluorescence. Treatment with two well-described therapeutic agents,

adenoviruses and gemcitabine, is used to show the ability to compare therapeutic efficacy among different strategies using preclinical model.

## **Materials and Methods**

### **• Cells and cell culture**

Human pancreatic cancer cell line Tumor cell lines BxPC-3 (human pancreatic adenocarcinoma, ATCC), Capan-1 (human colon carcinoma, NCI) and Panc-1 (human pancreatic epithelioid carcinoma, ATCC) were used in this study. All cells were maintained in RPMI 1640 glutamax or in Dulbecco's modified Eagle's glutamax medium (DMEM; Gibco, Scotland, UK) containing 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum and 1% antibiotics (all from Invitrogen-Life Technologies, Cergy Pontoise, France). The monolayer cell cultures were maintained in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

### **• GFP transfection of tumor cells**

We used a pEGFP-N1 expression vector (Clontech, Ozyme, Montigny-Le-Bretonneux, France) expressing enhanced GFP under the control of the strong cytomegalovirus promoter and the neomycin-resistance gene on the same bicistronic message (annotated map available on clontech Web site at [www.clontech.com/techinfo/vectors/](http://www.clontech.com/techinfo/vectors/)) for Capan-1 tumor cell transfection. Lipofectamine Plus (Life Technologies) was used for integration of pEGFP-N1 vector. This recombinant plasmid was amplified in TG<sub>2</sub> *E.Coli* bacteria and purified using Qiagen plasmid Endo-free Maxi-Prep Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

The pancreatic tumor cell Panc-1 was transfected using the Lipofectamin 2000 (Invitrogen-Life Technologies) according to the manufacturer's instruction, and optimized with minor modifications. Two days after transfection, cells were reseeded in selection medium containing 150 µg/ml G418 (Promega, Charbonnières, France). Three weeks later, many clones were appeared and expanded in the presence of G418. Resistant clones were first selected by fluorescence microscopy, allowing a rapid screening of GFP-expressing clones. Then we selected among the Capan-1/GFP

clones the best GFP-expressing clone at transcriptional levels by RT-PCR of GFP mRNA and compared to constitutive GAPDH mRNA as a internal control.

- **Recombinant adenoviral vectors**

Adenoviral vectors Ad/CMV-GFP, Ad/PGK-GV16, Ad/GT-Bax, Ad/hTERT-GV16 and Ad/gTRAIL have been described previously [44-46] and were provided by Dr S. Kagawa (MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA). All of the viral preparations were shown to be free of the E1<sup>+</sup> adenovirus by PCR assay and of endotoxin by a Limulus amoebocyte lysate endotoxin detection kit (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA). Virus were expanded in 293 cells and purified twice by ultracentrifugation on a cesium chloride gradient. The titers used in this study were determined by the absorbency of the dissociated virus at A<sub>260nm</sub> (one A<sub>260</sub> unit = 10<sup>12</sup> particles/ml), while titers determined by the plaque assay were used to obtain additive information. Particle: Infectious unit (IU) ratios were usually between 30:1 and 100:1. Thus, the multiplicity of infection (MOI) of 1000 vp is equivalent to an MOI of 10-30 IU. The optimal MOI was determined by infecting each cell line with Ad/CMV-GFP and assessing the expression of GFP via fluorescent microscopy. The MOIs used in the experiment were those that resulted in 50-80% of cells fluorescent green. The MOI of BxPC-3, Capan-1 Panc-1 were 500 and 1000 particles. Unless otherwise specified, Ad/CMV-GFP was used as vector control and PBS as mock control.

- **Gene expression analysis**

BxPC-3, Capan-1 and Panc-1 cells were infected with Ad/CMV-GFP, Ad/GT-Bax + Ad/PGK-GV16 and Ad/GT-Bax + Ad/hTERT-GV16 at MOIs of 500. After 48 hours, total RNA was isolated from infected as well as uninfected cells using the trizol extraction method (Gibco, France). A total of 5 µg of purified total RNA was reverse transcribed using 200 U of superscript Reverse Transcriptase II (Life Technologie) for cDNA synthesis. Five microliters of RT reaction product was subjected to PCR amplification. Each reaction was performed two times using independent RT reactions to confirm the results and the reproducibility. Bax primers (5'-primer, 5'-TGCTTCAGGGTTTCATCCAGG-3', and 3'-primer, 5'-TGGCAAGTAGAAAAGGGCGA-3')

provided by Life Technologies, were used to amplify an appropriate 300-pb fragment. The GAPDH primers (5'-primer, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', and 3'-primer, 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'), provided by Life Technologies, were used to amplify an appropriate 450-pb fragment. Equal amounts of PCR products were analysed on 1% ethidium bromide-stained agarose gels and visualized by UV light.

#### • **Cell viability Assay**

Cell viability was determined using a tetrazolium-based colorimetric assay (3-(4,5-diethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)). This test is based on the cellular reduction of MTT by the mitochondrial dehydrogenase of viable cells to a blue formazan product that can be measured by spectrophotometer. Briefly, cells were plated on 24-well plates at  $2 \cdot 10^5$  for Panc-1 and at  $3 \cdot 10^5$  for BxPC-3 and Capan-1 per well one day prior to virus infection. The medium was then replaced with fresh medium containing different concentrations of gemcitabine (Eli Lilly, Geneva, Switzerland) or with the viral vector system : Ad/CMV-GFP, Ad/GT-Bax + Ad/PGK-GV16, Ad/GT-Bax + Ad/hTERT-GV16 and Ad/gTRAIL. Cells were transduced with adenoviral vectors at various multiplicities of infection (MOIs). In each group, the ratio of the two viral vectors was 2:1, a ratio shown to be optimal for the induction of transgene expression in previous experiments [43]. At the end of treatment period, MTT was added to each well (final concentration, 0.5 mg/ml). The plates were incubated at 37°C for 3 hours, the medium was removed, 150  $\mu$ l dimethylsulfoxide was added, and the plates were gently shaken for 15 minutes to solubilize the formazan blue crystals. Absorbance at 570 nm was measured by a microplate reader (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Cell viability was expressed as the percentage of growth of untreated cells. Each experiment was undertaken using three wells per variable and repeated at least twice.

#### • ***In vivo* experiments**

##### *Animals*

Pathogen-free, 7-8 week-old female athymic NMRI-nu (nu/nu) nude mice (Elevage Janvier, le Genest, France) were allowed to acclimate for a least 2 weeks before starting experiments. Animals

were maintained under specific pathogen-free conditions in a barrier facility on High Efficiency Particulate Air (HEPA)-filtered racks, kept at alternating 12-hour periods of light and dark, and given commercial food (teckland LM-485; Western Research Products, orange, CA) and water ad libitum. Animal experiments were performed in accordance with the guidelines for the Care and Use of laboratory Animals (National Institutes of Health Publication Number 85-23).

#### *Subcutaneous pancreatic tumor model*

Panc-1 ( $10^7$  cells) in 200  $\mu$ l of DMEM were injected subcutaneously into 6- to 8- week- old female BALBC/c *nu/nu* mice (Janvier, Le Genest-St-Isle, France). Investigations were carried out 10 days following inoculation, when the tumours reached 8-10 mm in diameter. The mice were divided randomly, 6 animals per group into 5 groups (2 control and 3 treated groups). Each mouse was given three doses of intratumoral injection of  $10^9$  particles of Ad/CMV-GFP and Ad/GT-Bax mixed at a 1:1 ratio with Ad/PGK-GV16 and Ad/hTERT-GV16 in a volume of 100  $\mu$ l per dose. For bax gene expression, mice were killed 10 and 30 days after cells inoculation. Tumors were harvested for total RNA extraction and RT-PCR analysis. Tumour size was monitored for 50 days by measuring the width (w), length (l) and height (h) of each tumour three times a week in two perpendicular diameters by means of manual callipers. To calculate the volume (V), these data were integrated in the following formula:  $V = \pi \cdot w \cdot l \cdot h / 6$ . When a mouse's tumor reached 1.5 cm in diameter, the mouse was killed according to institutional guidelines.

#### *Surgical Orthotopic Implantation (SOI) of Panc-1/GFP Tumors*

Orthotopic, green-fluorescent human pancreatic cancer xenografts were established in nude mice with SOI [45]. Mice were anesthetized and their abdomens were sterilized with alcohol. An incision was created through the left upper abdominal pararectal line and peritoneum. The pancreas was carefully exposed, and  $5 \cdot 10^5$  Panc-1/GFP cells were injected onto the middle of the gland using a single 8-0 surgical suture (Davis-Geck, Inc., Manati, Puerto Rico). The pancreas was returned into the peritoneal cavity and the abdominal wall and the skin were closed in 2 layers using 6-0 surgical suture.

Ten days after SOI of Panc-1/GFP tumors, mice were randomized into 3 groups of 6-7 mice each. The first group served as a negative control and did receive Ad/CMV-GFP intraperitoneally. Mice in group 2 and 3 were injected with  $6.10^{10}$  viral particles of Ad/hTERT-GV16 + Ad/GT-Bax + Ad/TRAIL in the peritoneum. After 3 days post-infection, three mice were killed by CO<sub>2</sub> inhalation. Various organs (tumor, liver, spleen) were then harvested for total RNA extraction and RT-PCR analysis. Mice in the third group received three weekly intraperitoneal injections of gemcitabine at 60 mg/kg/dose. The therapeutic effect was followed over one month by survival curve determination.

- **External *in vivo* whole body imaging**

The IVIS® Imaging System 100 Series (Xenogen Corporation, California, USA) was used for this study. The system features a 25 mm (1.0 inch) square back-thinned, back-illuminated CCD, which is cryogenically cooled to  $-105^{\circ}\text{C}$  via a closed cycle refrigeration system (without liquid nitrogen) to minimize electronic background and maximize sensitivity. At 10 and 30 days post-cell inoculation, the tumor-bearing mice were also examined in a fluorescence light box illuminated by fiberoptic lighting at 440/20 nm with images collected with the Xenogen camera described above. High resolution images of 1024 x 724 pixels were captured directly on an PC personal computer (IBM, Kotech, Strasbourg). Images were processed for contrast and brightness and analysed with the use of the IVIS® Imaging System.

- **Statistical analysis**

Mean and standard error of the mean were calculated. Statistically significant difference between treatments was assessed using a one-way analysis variance (ANOVA) followed by a parametric Student unpaired *t*-test, where Bartlett's test gave homogeneity of variance, or by a non-parametric Mann-Whitney test for significant different variances. Difference was considered significant when  $P < 0.05$ . Statistically significant difference towards 0 was assessed in the same way by a one-group comparison with a Student *t*-test. Correlation between some parameters was studied using a parametric Pearson test or a non-parametric Spearman test when variances were significantly

different. InStat 2.00 Macintosh software (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) was used. Correlation curves were computed using Cricket Graph 1.2 software (Cricket Software, Malvern, PA, USA).

## Results

### • Sensitivity of pancreatic carcinoma cells to gemcitabine

We examined three pancreatic cancer cells lines (BxPC-3, Capan-1 and Panc-1) for their sensitivities to drug with clinical relevance to pancreatic cancer, gemcitabine. Changes in the proliferative activity of these cells were measured using the MTT cell proliferation assay.

The cell lines varied in their sensitivities to these drug (Fig.1). The concentration inhibiting 50% of cells ( $IC_{50}$ ) of the different cells were  $8.10^{-8}$  M for Capan-1,  $10^{-7}$  M for BxPC-3 and  $6.10^{-6}$  M for Panc-1. Capan-1 showed greatest sensitivity to gemcitabine compared with the other cell lines. Panc-1 cells exhibited low sensitivity to this drug. Since our study was aimed at increasing the sensitivity of pancreatic cancer cells to cytotoxic drugs, Panc-1 cells were considered suitable for further study. Capan-1 cells showed low sensitivity to drug and were also selected for further analysis.

### • Adenoviral-mediated overexpression of Bax in pancreatic cells lines

In order to study the impact of pro-apoptotic genes on gemcitabine treatment, the pancreatic cell lines were transduced with a binary adenoviral system for either bax , TRAIL or GFP as a control. For this purpose, Bxpc3, Capan-1, and Panc-1 were treated with either PBS, Ad/GT-Bax + Ad/PGK-GV16 or Ad/hTERT-GV16 at a total of 1000 viral particles/cell. In a binary adenoviral vector system, the expression of the bax and TRAIL genes in target cells is achieved by cotransfection of Ad/GT-Bax and the transactivator adenovirus, Ad/PGK-GV16 or Ad/hTERT-GV16. The expression of bax gene by this system was confirmed *in vitro* in pancreatic human cancer cell lines by RT-PCR (Fig. 2). Treatment of cells with the strong promoter PGK or the tissue specific promoter hTERT resulted in a strong bax-specific band in comparison with the

constitutive gene GAPDH, whereas mock infection resulted in basal expression. We can see also in Capan-1 and Panc-1 cells lines, Bax expression is equivalent with the strong and the tissue specific promoter. These results suggest that Bax expression is specific and efficient with the hTERT promoter.

- **Combined effect of recombinant adenoviruses**

In order to examine the sensitivities of the three human pancreatic cell lines; BxPC-3, Capan-1 and Panc-1 to combined treatment with the bax and TRAIL genes, the cells were incubated with binary systems vectors at two low multiplicities of infection (MOIs) doses of system alone or combined. Cell viability was measured by MTT cell proliferation assay (Fig. 3). Cells treated with Ad/CMV-GFP under the same conditions as the binary systems were used as controls. This study showing a significant difference in cell killing between lines in response to treatment with Bax and TRAIL-expressing vectors versus control vectors Ad/CMV-GFP. We can also observed that Ad/gTRAIL is more efficient than the binary system Ad/GT-Bax but the combination of the two systems was more efficacious than Ad/gTRAIL or Ad/GT-Bax alone. Together, this results suggest that the combination of adenoviruses systems had a supra-additive effect in Capan-1 cells and an additive effect in BxPC-3 and Panc-1 cells.

- **Combined effects of adenoviruses systems and Gemcitabine *in vitro***

Having determined the sensitivity of pancreatic cell lines to selected concentrations of gemcitabine or TRAIL/bax expression adenoviruses systems, we wishes to determine whether combining cytotoxic drug with viral vectors would allow us to use the drug at concentration that were, on their own, relatively ineffective. This combination can also achieve enhanced cell-killing effects, we evaluated such combinations in this pancreatic cell lines using an MTT assay (Fig. 4).

We therefore treated BxPC-3, Capan-1 and Panc-1 cells with  $5 \cdot 10^{-8}$  M or  $10^{-7}$  M gemcitabine and infected these cell lines 48h later with either adenovirus systems or with the control Ad/CMV-GFP vector. Inversely, the infection firstly done and gemcitabine treatment in second. These concentrations of gemcitabine drug, when used alone, had variable effects on MTT reading. They

correspond to a concentration much weaker than the  $IC_{50}$  and there is only 60 to 90% of surviving cells. We also decreased the quantity of virus in order to be under conditions minimum of treatment. In the case of Capan-1 cell, solo gemcitabine ( $10^{-7}$  M) reduced metabolic activity by 50%; the combination of adenoviruses systems and this drug did result in significantly greater loss of metabolic activity than observed with gemcitabine alone. When this experiment was carried out in Panc-1 cells, we observed that gemcitabine alone reduced the MTT readings by 35%. Subsequent combination of this compound and adenoviruses systems had surprisingly less effect than gemcitabine alone. We thus found no evidence that pre-incubation of cells with gemcitabine followed by infection with adenoviruses systems was more beneficial than inversely. These results suggested that is a synergism effect between gemcitabine and TRAIL/bax expression adenoviruses systems for the three pancreatic cell lines. But interestingly, it is more evident for Panc-1 cells which is more resistant for chemotherapeutic treatment.

• ***Bax* and *TRAIL* gene expression driven by the hTERT promoter suppresses tumour growth *in vivo***

To evaluate the possibility to use the hTERT promoter for *in vivo* bax and TRAIL gene therapy, we established Panc-1 tumours s.c. in nude mice and treated the tumours with bax and TRAIL genes the expression of which was driven by the hTERT or PGK promoter. This is a preliminary experiment making it possible to highlight the functionality and the efficacy of the various adenovirus systems and the targeting of two genes. After three sequential intratumoral injections of adenoviral vectors, tumour size changes were monitored for 7 weeks. In first, we investigated levels of bax transgene expression by RT-PCR over two times in the tumor (Fig. 5). In the beginning of this experiment, the induction of bax is present as well as with the strong promoter PGK as the specific promoter hTERT. But there is no significant expression after one month of treatment. So expression of Bax is more important with the strong promoter but also present with specific promoter and its expression is time dependant.

In tumors derived from Panc-1 cells, treatment with bax and TRAIL adenovectors significantly suppressed tumor growth when compared with other controls (Fig 6). The treatment efficacy is equivalent with constitutive or specific promoters. Overexpression of the bax and TRAIL genes driven by hTERT promoter elicit antitumor activity.

- **Transgene expression and toxicity of combined adenoviruses after intra-peritoneal (i.p.) administration**

After i.p. injection of recombinant adenoviruses systems, we investigated the bax level expression in different organs and the possible toxicity of combined adenoviruses after peritoneal administration. For this purpose, BALBC/c *nu/nu* mice were injected three times with Ad/CMV-GFP, Ad/hTERT-GV16 + Ad/GT-Bax + Ad/gTRAIL in peritone (ratio 1:1 in this group) at a total of  $10^9$  particules/mouse. In complement this treatment, one group of mice received three injections weekly of gemcitabine at 60mg/kg. There was no systemic toxicity observed in connection with the different treatments. Animals were sacrificed at three days after the last injection. Liver, spleen and tumor were harvested for RNA extraction and RT-PCR analysis (Fig. 7). The mouse which is treated with Ad/GFP, present a GFP band in the liver and in the spleen. There is reduction in band GFP between the groups control and treated, this indicates that the treatment is effective. However interestingly, when tumor were infected with the different adenoviruses, the results show that a significant bax expression only in the tumor tissue but no expression in the liver and the spleen. These results suggested there is a specificity of transgene expression with hTERT tissue-specific promoter.

- **Real-time visualisation of tumor growth and therapeutic efficacy evaluation**

Tumor model expressing stably GFP fluorescence enabled real-time, sequential whole body imaging without the need for laparotomy, contrast agent or invasive procedures (Fig. 8). In control animals, rapid primary tumor growth over the first 2 weeks was accompanied by progressive intra-abdominal tumor dissemination to all 4 abdominal quadrants. In contrast, treated mice had slower rates of tumor growth; these mice had, on average, approximately half the visualized, total tumor

burden as control animals. Progression of disease in this group was rapid over the third and fourth weeks, leading ultimately to death from disease in all animals. The growth-suppressive effects of gemcitabine combining with the adenoviruses system were dramatically visualized by whole-body imaging. Progression of disease in each group, as visualized by real-time, GFP fluorescence imaging, had a strong inverse correlation with survival curve.

The intraperitoneal injection of adenoviruses systems suppressed significantly tumor growth compared with tumor growth in control group (Fig. 9). Specifically, complete tumor regression occurred in 60% and even 40% of the animals treated with the two treatment. These animals remained tumor-free for over 5 months. In comparison, tumors treated with Ad/CMV-GFP grew fast and all animals in these group died within 2 months. consequently, mice treated with the two treatments had a survival advantage compared with those treated with combined adenoviruses alone.

## **Discussion**

The majority of patients with diagnosed pancreatic cancer do not benefit from surgery and frequently need palliative chemotherapy. Pancreatic cancer invariably responds poorly to chemotherapy [46]. Patients are commonly given palliative chemotherapy with gemcitabine alone or in combination with other drugs [47]. Gemcitabine reportedly induces apoptosis in pancreatic tumor cells, as well as in various other cancer cells [48]. Evidence that the antitumor therapies function by inducing apoptosis is revealing the crucial role apoptosis plays in tumorigenesis and antitumor therapy. So, a major obstacle in cancer therapy is resistance to treatment. Resistance can occur at the beginning of the treatment (intrinsic) or through a selection of subpopulation of resistant cells during anticancer therapy (acquired) [49]. Strategies for overcoming resistance are essential to the success of anticancer therapy.

One of them is the apoptosis induction by gene therapy. The widely expressed bax and TRAIL are two of the well-characterized proapoptotic genes, and their overexpression leads to apoptosis in a wide variety of cells, with or without additional stimuli [43, 50-52]. Here we used a binary

adenoviral vector to assess simultaneously the antitumor effects of bax and TRAIL genes *in vitro* and *in vivo* in pancreas cancer cell lines. As the PGK promoter is ubiquitarily active in mammalian cells, this system may be useful for testing the antitumor activities of the bax and TRAIL genes in variety of tumor models. The results we obtained demonstrated that the bax gene can effectively induce apoptosis and suppress tumor growth both *in vitro* and *in vivo*. But resistance to apoptosis is mediated by different signalling pathways in pancreatic tumor cells [54]. For this reason, we used simultaneously the two proapoptotic genes in order to consider a largest of the apoptosis process. Ours results show significantly a more important antitumoral effect compared with only one surexpressed gene.

As the strong proapoptotic genes, overexpression of the bax and TRAIL genes may induce in normal cells as well. One common approach to target transgene expression is to control the gene expression via tissue- or cell-specific promoters. In fact, we demonstrated that the hTERT promoter has high transcriptional activity in a variety of human cancer cell lines and can be used to prevent the toxic effects of the bax and TRAIL *in vitro* and *in vivo* without compromising the antitumor activity of the genes. Thus, hTERT should be useful for targeting the pharmaceutical effects of several genes to cancer cells. Indeed, the fact that telomerase is highly active in various tumor types and in more than 85% of all primary tumors suggests that the hTERT promoter will find broad applications in cancer gene therapy. By taking advantage of this tumor-specific feature, high levels of the bax and also TRAIL genes were introduced into pancreatic cancer cells with subsequent growth suppression. More interestingly is that synergistic or additive effects can be achieved by a combination of bax and TRAIL gene therapy with chemotherapy in different pancreas cancer cell models that are sensitive to treatment with bax and TRAIL-expressing vectors. In this study we showed an improvement and a potentialisation of the chemotherapy with this gene therapy strategy. Because synergistic interactions can lead to a reduction in the dose of the component agents needed, any synergy that's results from combined therapy is expected to improve the overall therapeutic results by reducing toxicity, enhancing efficacy, or both.

Targeted expression of therapeutic genes can be accomplished at several levels, including direct injection into a target site, vector targeting, and tissue-specific gene expression [55]. Whereas intratumoral injection is appropriate for the treatment of unresectable primary tumors, systemic gene delivery may be necessary for the treatment of metastasis. In this study, we used a *in vivo* model which corresponds more to clinical reality. In our results, AdCMV-GFP generates expression in pancreatic tumor but also in normal tissues as well as liver and spleen of control mice. However interestingly, when mice were treated with combined adenoviruses, there were a significant GFP and bax expressions in the pancreatic tumor, but no expression in the liver and the spleen. These results suggest the specificity of gene expression with specific promoter hTERT. So this strategy allows us to consider a systemic gene delivery in order to address all metastasis.

The recent developments in fluorescence imaging systems allow measurement of tumor development and expansion in living animals [56-60]. Also, in contrast to the conventional imaging approaches, which mostly provide end point data, fluorescent imaging permits temporal and spatial information throughout an entire experiment by acquiring consecutive images from the same animals. The visualization with these techniques is sensitive and allows us to make a follow-up of the treatment tested in real-time. Now we can have windows of the treatment according to tumoral evolution in a very short time enable us to have an idea on the threshold of sensitivity of the technic. but that facilitates the work of the researcher while indicating to which moment a treatment should be remade because there was treatment remission. The paucity of using tumor-specific apoptotic genes and non-invasive imaging methods to monitor gene delivery and expression *in vivo* has been one of the main limitations to the development of cancer therapy using viral vectors. We have shown that Bax and TRAIL induces apoptosis *in vivo* and the treatment can be monitored in a non invasive way using a GFP pancreas cancer cell line.

In conclusion, ours study showed that gene therapy combined with anticancer agent had synergistic or additive effects. Taking in amount all this results we are convince that the multi modality therapy may be one solution in combating pancreatic cancer. But this is not necessary to forget that therapeutic answer is different and according to the cellular type. There is a difference in

the level of infectivity but also of sensibility of anticancer agents. The engineering of new combined therapeutic strategies that resensitize tumor of apoptosis and , the use of multiple in vivo fluorescent imaging agents to allow real-time, multidimensional assessment of tumor therapy will be useful in broadening the scope of analyses that can be performed.

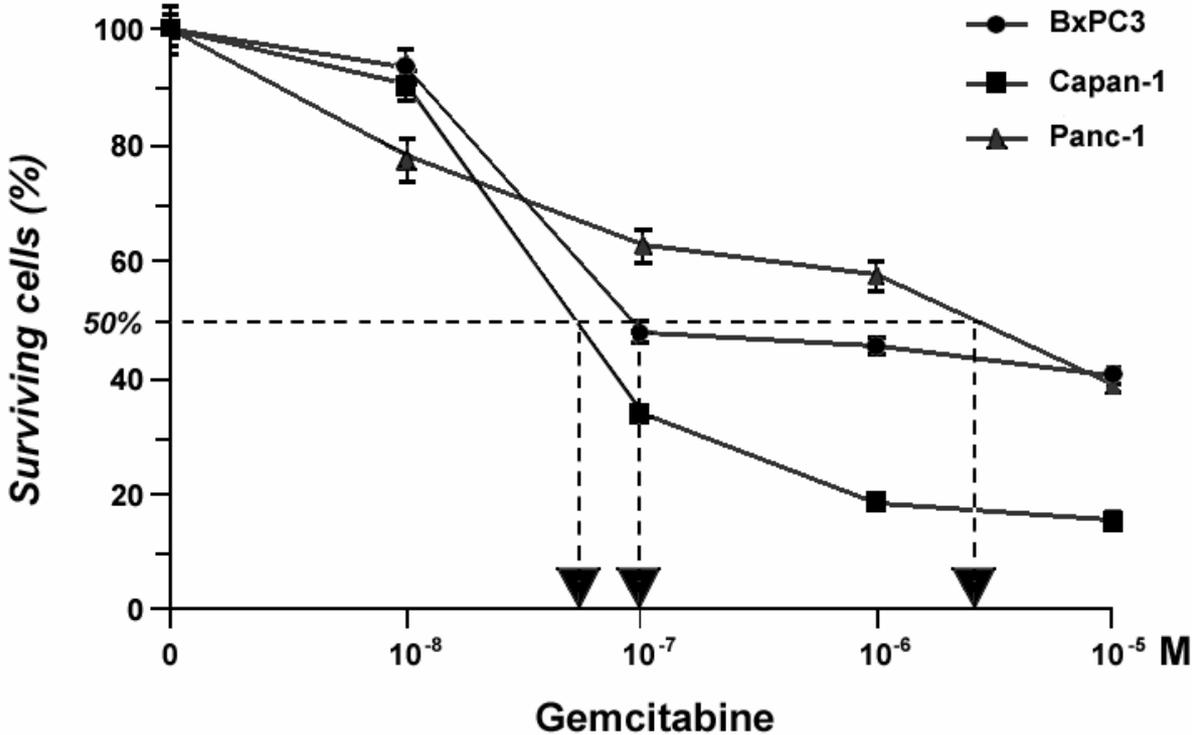
## References

1. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin.* 2001 Jan-Feb;51(1):15-36. Erratum in: *CA Cancer J Clin* 2001;51(2):144.
2. Janes RH, Niederhuber JE, Chmiel JS et al: Pattern of care for pancreatic cancer: results of a survey by the omission on cancer. *Ann Surg* 223: 261-272, 1996.
3. Bramhall SR, Neoptolemos JP. Advances in diagnosis and treatment of pancreatic cancer. *Gastroenterologist.* 1995;3(4):301-10.
4. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer.* 1999;80(6):827-41.
5. Gall FP, Kessler H, Hermanek P. Surgical treatment of ductal pancreatic carcinoma. *Eur J Surg Oncol.* 1991;17(2):173-81.
6. Pour PM, Egami H, Takiyama Y. Patterns of growth and metastases of induced pancreatic cancer in relation to the prognosis and its clinical implications. *Gastroenterology.* 1991;100(2):529-36.
7. Haycox A, Lombard M, Neoptolemos J, Walley T. Review article: current treatment and optimal patient management in pancreatic cancer. *Aliment Pharmacol Ther.* 1998;12(10):949-64.
8. Bramhall SR, Allum WH, Jones AG, Allwood A, Cummins C, Neoptolemos JP. Treatment and survival in 13,560 patients with pancreatic cancer, and incidence of the disease, in the West Midlands: an epidemiological study. *Br J Surg.* 1995;82(1):111-5.
9. Cubilla AL, Fortner J, Fitzgerald PJ. Lymph node involvement in carcinoma of the head of the pancreas area. *Cancer.* 1978;41(3):880-7.
10. Neoptolemos JP, Russell RC, Bramhall S, Theis B. Low mortality following resection for pancreatic and periampullary tumours in 1026 patients: UK survey of specialist pancreatic units. UK Pancreatic Cancer Group. *Br J Surg.* 1997;84(10):1370-6.
11. Pasquali C, Sperti C, Filippini C, Pedrazzoli S. Epidemiology of pancreatic cancer in North eastern Italy: incidence, resectability rate, hospital stay, costs and survival (1990-1992). *Dig Liver Dis.* 2002;34(10):723-31.
12. Sener SF, Fremgen A, Menck HR, Winchester DP. Pancreatic cancer: a report of treatment and survival trends for 100,313 patients diagnosed from 1985-1995, using the National Cancer Database. *J Am Coll Surg.* 1999;189(1):1-7.
13. Andren-Sandberg A, Neoptolemos JP. Resection for pancreatic cancer in the new millennium. *Pancreatology.* 2002;2(5):431-9.
14. Edge SB, Schmiegel RE Jr, Rosenlof LK, Wilhelm MC. Pancreas cancer resection outcome in American University centers in 1989-1990. *Cancer.* 1993;71(11):3502-8.
15. Conlon KC, Klimstra DS, Brennan MF. Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. Clinicopathologic analysis of 5-year survivors. *Ann Surg.* 1996;223(3):273-9.
16. Allema JH, Reinders ME, van Gulik TM, Koelemay MJ, Van Leeuwen DJ, de Wit LT, Gouma DJ, Obertop H. Prognostic factors for survival after pancreaticoduodenectomy for patients with carcinoma of the pancreatic head region. *Cancer.* 1995;75(8):2069-76.
17. Nitecki SS, Sarr MG, Colby TV, van Heerden JA. Long-term survival after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. Is it really improving? *Ann Surg.* 1995;221(1):59-66.
18. Mosca F, Giulianotti PC, Balestracci T, Di Candio G, Pietrabissa A, Sbrana F, Rossi G. Long-term survival in pancreatic cancer: pylorus-preserving versus Whipple pancreatoduodenectomy. *Surgery.* 1997;122(3):553-66.
19. Yeo CJ, Cameron JL, Sohn TA, Coleman J, Sauter PK, Hruban RH, Pitt HA. Pancreaticoduodenectomy with or without extended retroperitoneal lymphadenectomy for periampullary adenocarcinoma: comparison of morbidity and mortality and short-term outcome. *Ann Surg.* 1999;229(5):613-22; discussion 622-4.

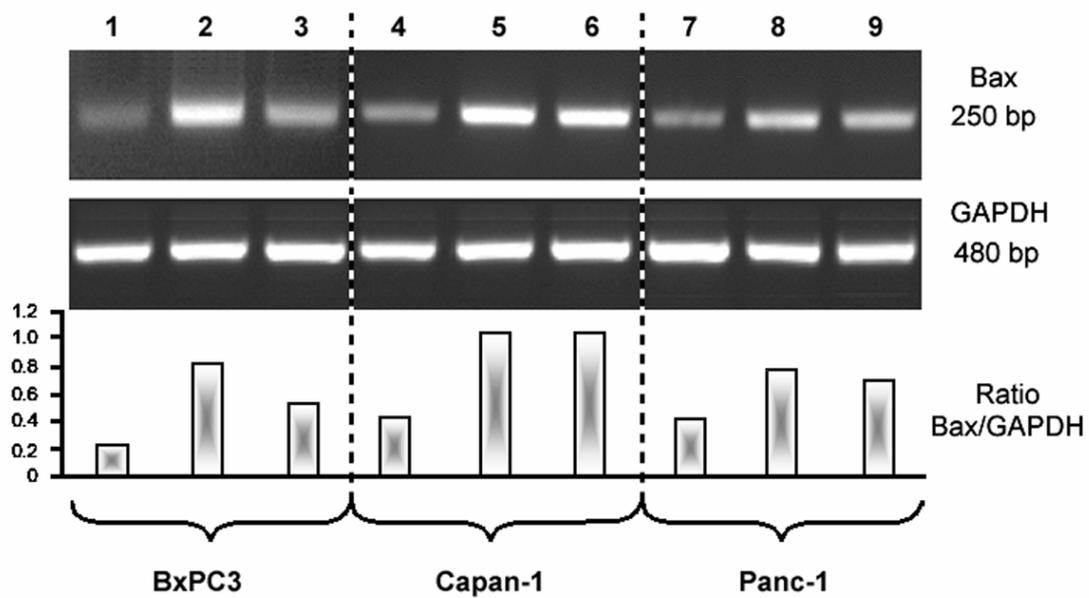
20. Allison DC, Piantadosi S, Hruban RH, Dooley WC, Fishman EK, Yeo CJ, Lillemoe KD, Pitt HA, Lin P, Cameron JL. DNA content and other factors associated with ten-year survival after resection of pancreatic carcinoma. *J Surg Oncol*. 1998;67(3):151-9.
21. Northern and Yorkshire Cancer Registry and Information Service. Cancer treatment policies and their effect on survival-Pancreas. 2000; Section 4.3: 19.
22. Halloran CM, Ghaneh P, Bosonnet L, Hartley MN, Sutton R, Neoptolemos JP. Complications of pancreatic cancer resection. *Dig Surg*. 2002;19(2):138-46.
23. Hertel LW, Boder GB, Kroin JS, Rinzel SM, Poore GA, Todd GC, Grindey GB. Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine). *Cancer Res*. 1990;50(14):4417-22.
24. Huang P, Chubb S, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res*. 1991;51(22):6110-7.
25. Sotos GA, Grogan L, Allegra CJ. Preclinical and clinical aspects of biomodulation of 5-fluorouracil. *Cancer Treat Rev*. 1994;20(1):11-49.
26. Burris HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff DD. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol*. 1997;15(6):2403-13.
27. Moore, M.J. Current status of chemotherapy in advanced pancreatic cancer. *Curr. Oncol.*, 1994;1: 212-216.
28. van Riel JM, van Groeningen CJ, Pinedo HM, Giaccone G. Current chemotherapeutic possibilities in pancreaticobiliary cancer. *Ann Oncol*. 1999;10 Suppl 4:157-61.
29. Akerele CE, Rybalova I, Kaufman HL, Mani S. Current approaches to novel therapeutics in pancreatic cancer. *Invest New Drugs*. 2003;21(1):113-29.
30. Halloran CM, Ghaneh P, Neoptolemos JP, Costello E. Gene therapy for pancreatic cancer--current and prospective strategies. *Surg Oncol*. 2000 Dec;9(4):181-91.
31. Katz MH, Bouvet M. Novel gene therapy approaches to pancreatic cancer. *Int J Gastrointest Cancer*. 2003;33(1):89-97.
32. Xu ZW, Friess H, Buchler MW, Solioz M. Overexpression of Bax sensitizes human pancreatic cancer cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2002;49(6):504-10. Epub 2002 Mar 12.
33. Kagawa S, Gu J, Swisher SG, Ji L, Roth JA, Lai D, Stephens LC, Fang B. Antitumor effect of adenovirus-mediated Bax gene transfer on p53-sensitive and p53-resistant cancer lines. *Cancer Res*. 2000;60(5):1157-61.
34. Gu J, Kagawa S, Takakura M, Kyo S, Inoue M, Roth JA, Fang B. Tumor-specific transgene expression from the human telomerase reverse transcriptase promoter enables targeting of the therapeutic effects of the Bax gene to cancers. *Cancer Res*. 2000;60(19):5359-64.
35. Xu ZW, Friess H, Buchler MW, Solioz M. Overexpression of Bax sensitizes human pancreatic cancer cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2002 Jun;49(6):504-10.
36. Lin T, Huang X, Gu J, Zhang L, Roth JA, Xiong M, Curley SA, Yu Y, Hunt KK, Fang B. Long-term tumor-free survival from treatment with the GFP-TRAIL fusion gene expressed from the hTERT promoter in breast cancer cells. *Oncogene*. 2002;21(52):8020-8.
37. Lin T, Zhang L, Davis J, Gu J, Nishizaki M, Ji L, Roth JA, Xiong M, Fang B. Combination of TRAIL gene therapy and chemotherapy enhances antitumor and antimetastasis effects in chemosensitive and chemoresistant breast cancers. *Mol Ther*. 2003;8(3):441-8.
38. Zhu H, Zhang L, Huang X, Davis JJ, Jacob DA, Teraishi F, Chiao P, Fang B. Overcoming acquired resistance to TRAIL by chemotherapeutic agents and calpain inhibitor I through distinct mechanisms. *Mol Ther*. 2004;9(5):666-73.
39. Hylander BL, Pitoniak R, Penetrante RB, Gibbs JF, Oktay D, Cheng J, Repasky EA. The anti-tumor effect of Apo2L/TRAIL on patient pancreatic adenocarcinomas grown as xenografts in SCID mice. *J Transl Med*. 2005;3(1):22.

40. Harley CB, Kim NW, Prowse KR, Weinrich SL, Hirsch KS, West MD, Bacchetti S, Hirte HW, Counter CM, Greider CW, et al Telomerase, cell immortality, and cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1994;59:307-15.
41. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer.* 1997;33(5):787-91.
42. Gu J, Kagawa S, Takakura M, Kyo S, Inoue M, Roth JA, Fang B. Tumor-specific transgene expression from the human telomerase reverse transcriptase promoter enables targeting of the therapeutic effects of the Bax gene to cancers. *Cancer Res.* 2000;60(19):5359-64.
43. Lin T, Zhang L, Davis J, Gu J, Nishizaki M, Ji L, Roth JA, Xiong M, Fang B. Combination of TRAIL gene therapy and chemotherapy enhances antitumor and antimetastasis effects in chemosensitive and chemoresistant breast cancers. *Mol Ther.* 2003;8(3):441-8.
44. Kagawa S, Pearson SA, Ji L, Xu K, McDonnell TJ, Swisher SG, Roth JA, Fang B. A binary adenoviral vector system for expressing high levels of the proapoptotic gene bax. *Gene Ther.* 2000;7(1):75-9.
45. Koch PE, Guo ZS, Kagawa S, Gu J, Roth JA, Fang B. Augmenting transgene expression from carcinoembryonic antigen (CEA) promoter via a GAL4 gene regulatory system. *Mol Ther.* 2001;3(3):278-83.
46. Fu X, Guadagni F, Hoffman RM. A metastatic nude-mouse model of human pancreatic cancer constructed orthotopically with histologically intact patient specimens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(12):5645-9.
47. Van Riel JM, van Groeningen CJ, Pinedo HM, Giaccone G. Current chemotherapeutic possibilities in pancreaticobiliary cancer. *Ann Oncol.* 1999;10 Suppl 4:157-61.
48. Cohen SJ, Pinover WH, Watson JC, Meropol NJ. Pancreatic cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2000;1(5):375-86.
49. Bold RJ, Chandra J, McConkey DJ. Gemcitabine-induced programmed cell death (apoptosis) of human pancreatic carcinoma is determined by Bcl-2 content. *Ann Surg Oncol.* 1999;6(3):279-85.
50. Zhu H, Zhang L, Huang X, Davis JJ, Jacob DA, Teraishi F, Chiao P, Fang B. Overcoming acquired resistance to TRAIL by chemotherapeutic agents and calpain inhibitor I through distinct mechanisms. *Mol Ther.* 2004;9(5):666-73.
51. Xu ZW, Friess H, Buchler MW, Solioz M. Overexpression of Bax sensitizes human pancreatic cancer cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2002;49(6):504-10.
52. Pirocanac EC, Nassirpour R, Yang M, Wang J, Nardin SR, Gu J, Fang B, Moossa AR, Hoffman RM, Bouvet M. Bax-induction gene therapy of pancreatic cancer. *Surg Res.* 2002;106(2):346-51.
53. Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;10;93(25):14559-63.
54. Westphal S, Kalthoff H. Apoptosis: targets in pancreatic cancer. *Mol Cancer.* 2003;2:6.
55. Middaugh C.R., Chastain M. and Caskey CT. Tissue-directed gene delivery systems. *Gene therapy.* 1996;11-32
56. Contag CH, Jenkins D, Contag PR, Negrin RS. Use of reporter genes for optical measurements of neoplastic disease in vivo. *Neoplasia.* 2000;2(1-2):41-52.
57. Contag CH, Bachmann MH. Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression. *Annu Rev Biomed Eng.* 2002;4:235-60.
58. Gambhir SS. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(9):683-93.
59. Tjuvajev JG, Doubrovin M, Akhurst T, Cai S, Balatoni J, Alauddin MM, Finn R, Bornmann W, Thaler H, Conti PS, Blasberg RG. Comparison of radiolabeled nucleoside probes (FIAU, FHBG, and FHPG) for PET imaging of HSV1-tk gene expression. *J Nucl Med.* 2002;43(8):1072-83.
60. Weissleder R. Scaling down imaging: molecular mapping of cancer in mice. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jan;2(1):11-8.

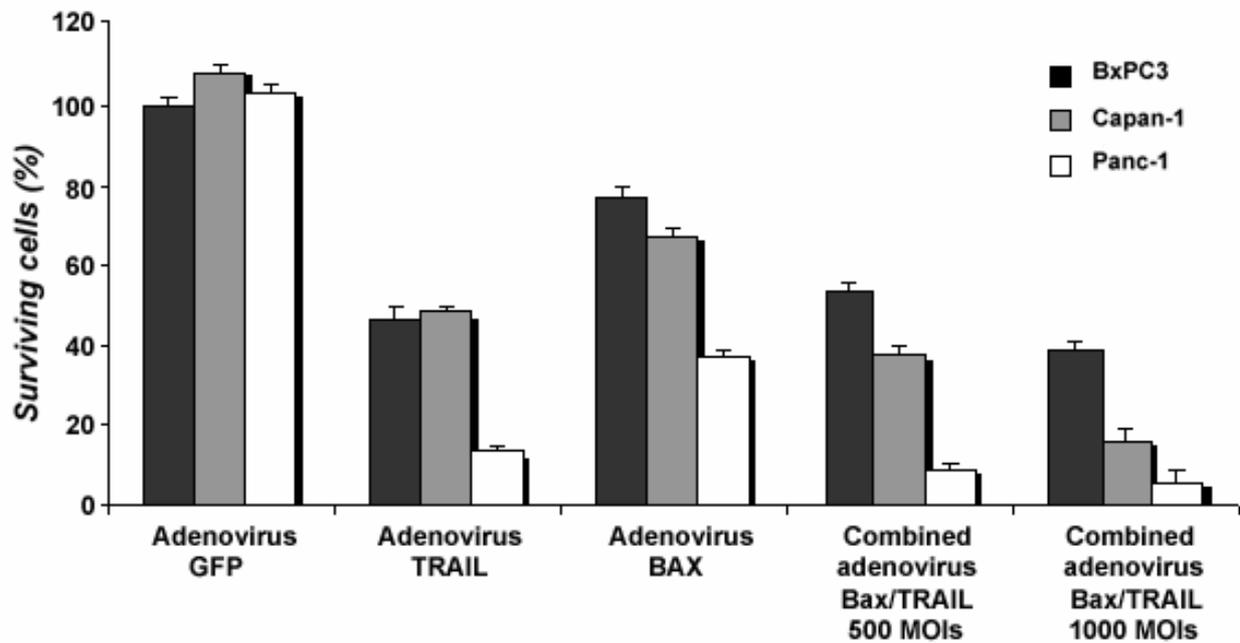
**FIGURE LEGENDS**



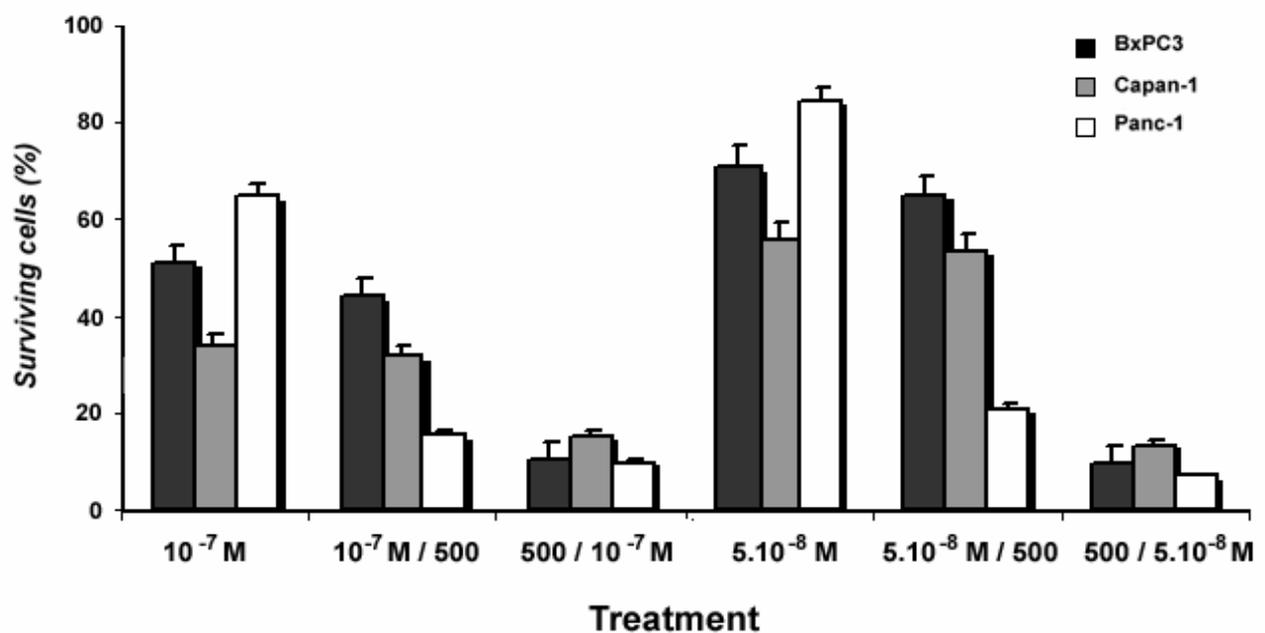
**FIGURE 1.** Effects of increasing concentrations of Gemcitabine on cell viability of three human pancreatic adenoma cell lines, assayed by measuring the bioreduction of MTT 72 h after drug addition to cell culture medium. Arrows indicate the IC<sub>50</sub> of each cell line respectively. Data, expressed as a percentage of the mean value of untreated cells, are the means ± SD for triplicate wells.



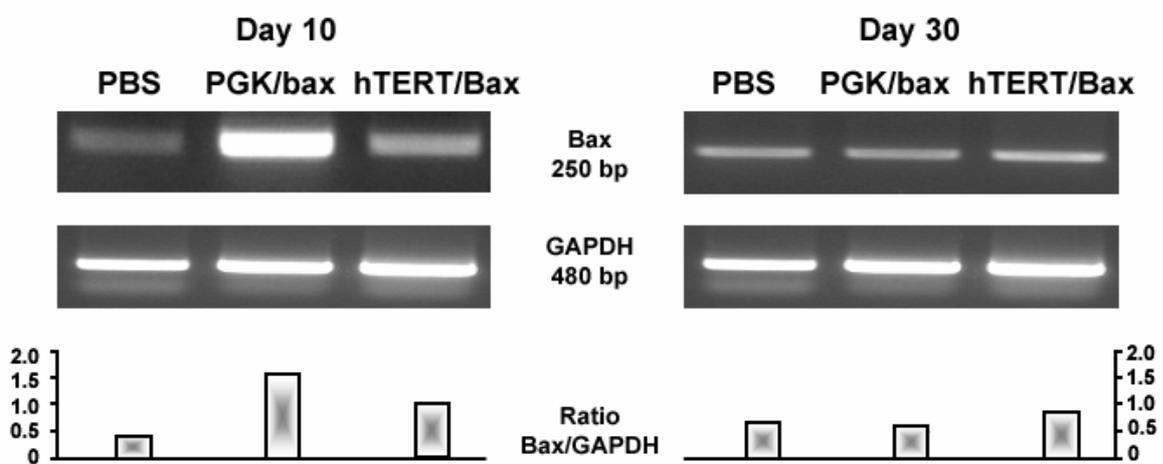
**FIGURE 2.** RT-PCR analysis of Bax expression in vitro. Cultured cells were infected with Mock (lanes 1, 4, 7), Ad/GT-Bax plus Ad/PGK-GV16 (lanes 2, 5, 8) or Ad/GT-Bax + Ad/hTERT-GV16 (lanes 3, 6, 9) for 48 h. The Bax transcripts were quantified versus GAPDH as an internal control (see Materials and Methods).



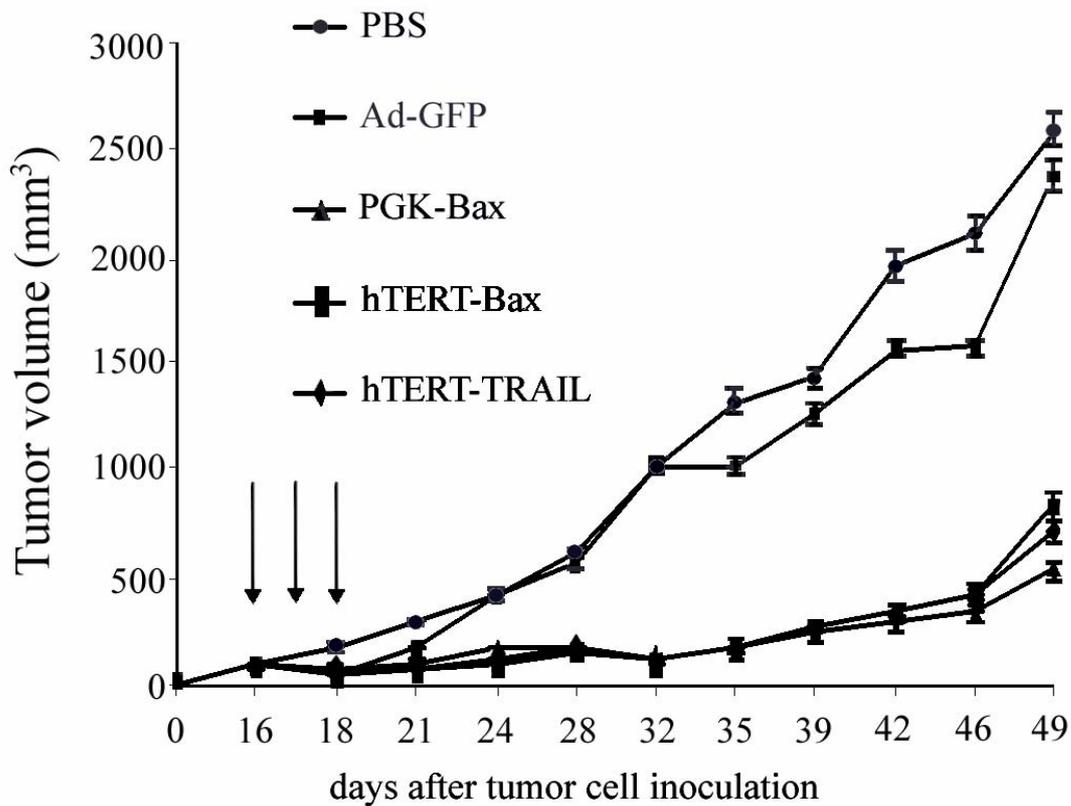
**FIGURE 3.** Combined effects with TRAIL and bax-expressing adenovector on cell proliferation. The treatments are shown at the base of the graphs. Ad/GT-Bax and Ad/PGK-GV16 were used at total m.o.i. of 500 particles/cells. Cell proliferation was monitored at 72-h time intervals after transduction using a cell toxicity assay (see material and methods for experimental details). Bax and TRAIL with  $5 \cdot 10^2$  MOIs treatment suppressed growth of three different human pancreatic cancer cell lines. Viability of cells treated with Bax plus TRAIL was significantly lower than in other treated cells. At these MOIs, few effects were seen with control adenovirus.



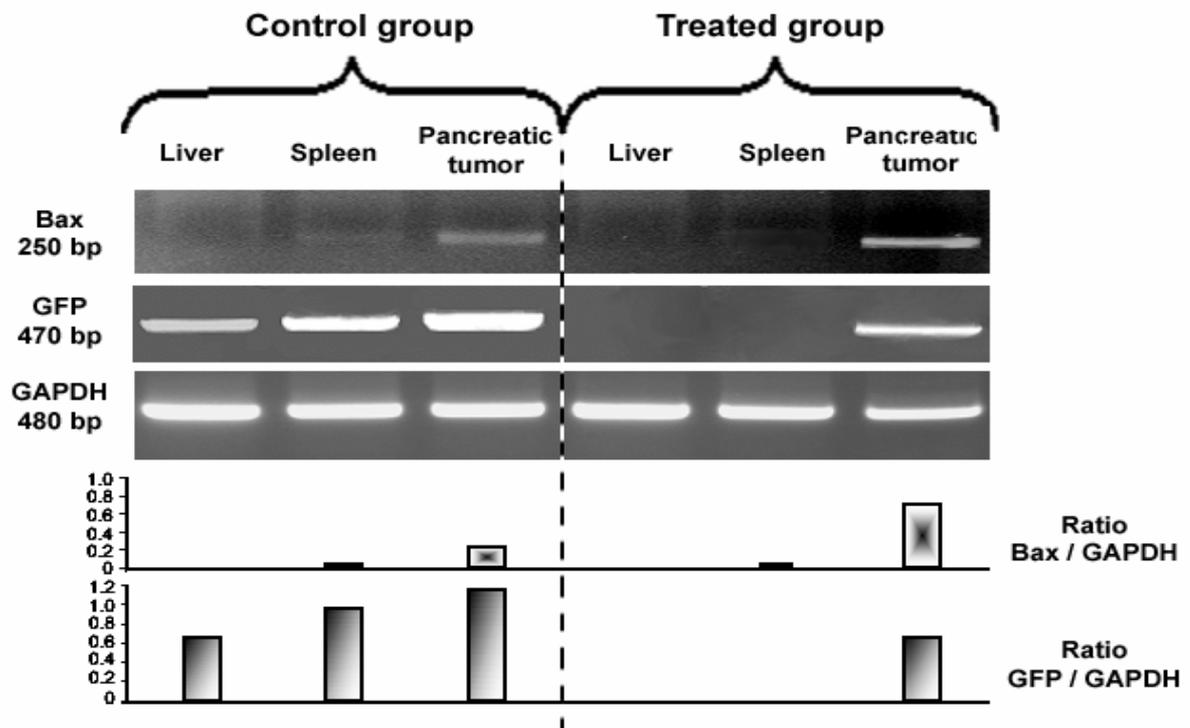
**FIGURE 4.** Combined effects of adenovirus systems and Gemcitabine in human pancreatic cancer cell lines. Cell viability after different treatments ( $10^{-7}$  and  $5.10^{-8}$  molar are the concentration of gemcitabine and 500 MOIs is the adenovirus dose) was determined using MTT assay 72 h after treatment. The data show mean values  $\pm$  SD of three experiments. Chemotherapeutic agent concentration used is much lower as the  $IC_{50}$ .



**FIGURE 5.** *In vivo* assessment of Bax mRNA in animals bearing subcutaneous xenografts derived from Panc-1 cells. RT-PCR analysis of tumor samples collected at 10 and 30 days after cell inoculation. PBS was used as a control. In the beginning of the treatment, Bax induction was observed as well as with the strong promoter as the specific promoter. But this induction decreased with time. The GAPDH expression was used as an internal control.



**FIGURE 6.** Suppression of tumor growth by adenovirus-mediated gene transfer. S.c. tumors derived from Panc-1 cells were treated with various vectors as show in the figure. Tumor volume was monitored over time (days) after inoculation of tumor cells. Values, the mean  $\pm$  SD of at least eight mice per group; *arrows*, the time at which treatment ( $10^9$  total viral particles/mouse/treatment) was given. The growth curve for tumors treated with Ad/gTRAIL or Ad/GT-Bax + Ad/PGK-GV16 or Ad/GT-Bax + Ad/hTERT-GV16 overlaps almost completely. Both differed significantly from treatment with PBS or ad/ CMV-GFP control.



**FIGURE 7.** Bax expression pancreatic tumor and normal tissue. RT-PCR analysis of Bax mRNA was obtained from samples of tumor-bearing animals from treated group (*on right*; mice injected with combined adenovirus with hTERT tissue-specific promoter) and of tumor-free animals (*on left*; mice injected with adenovirus CMV/GFP as the control) after 3 days post-infection. Interestingly, there is a significant GFP and Bax mRNA in the tumor but not in normal tissues.

## Discussion

### Article IV

Depuis quelques années, en recherche biologique, l'apoptose est un sujet « à la mode ». En effet, une fois établies les premières bases moléculaires et biochimiques du phénomène, l'acquisition des connaissances concernant l'apoptose est en pleine explosion. Un aperçu moléculaire de la régulation et des signaux défectueux de l'apoptose dans la tumeur nous aide à définir le phénomène de résistance ou de la sensibilité des cellules tumorales aux thérapies antitumorales et nous permet de caractériser de nouvelles cibles et approches pour des interventions chimiothérapeutiques rationnelles. Deux gènes de ce mécanisme, bax et TRAIL ont déjà prouvé leur activité antitumorale au niveau de nombreux cancers, dont celui du pancréas [bax : Pirocanac 2002], des poumons [TRAIL : Kagawa 2001, Bax : Kaliberov 2002], du sein [TRAIL : Lin 2002]... Dans ces différents travaux, ces gènes ont été utilisés seuls. Dans notre présent travail, réalisé sur plusieurs modèles du cancer du pancréas, nous avons pensé à les combiner pour obtenir une meilleure réponse antitumorale. Ainsi par cette approche, nous agissons sur les deux voies principales de l'apoptose, la voie « extrinsèque », celle des récepteurs de mort, et la voie « intrinsèque », celle de la mitochondrie [Blackstone 1999, Kandasamy 2003]. Le gène bax est commun à ces deux voies ; ainsi son effet est potentialisé par celui de TRAIL [Bouillet 2002]. De plus, la molécule TRAIL présente aussi des propriétés intéressantes :

- la portion extracellulaire de cette protéine est suffisante pour assurer une activité antitumorale potentielle mais son homo-trimérisation est nécessaire pour obtenir cet effet [Ashkenazi 1999, Walczak 1999]. Cette constatation suggère que la structure conformationnelle de TRAIL est cruciale pour l'interaction avec son récepteur,

- le traitement avec TRAIL présente un « effet bystander » à travers des interactions sur les cellules voisines au niveau de la surface cellulaire par la molécule de TRAIL liée à son récepteur ou par l'action de la forme soluble de TRAIL provenant des cellules exprimant la protéine [Kagawa 2001]. Mais des études ont révélé qu'un certain nombre de lignées cellulaires sont résistantes à TRAIL [Keane 1999, Nguyen 2001, Voelkel-Johnson 2002]. Cette éventualité sera contournée dans notre étude, par l'utilisation d'un autre gène pro-apoptotique faisant partie d'une autre voie de l'apoptose.

Il a cependant été montré dans les travaux mentionnés ci-dessus ainsi que dans notre étude que ces deux gènes présentent une forte induction de l'apoptose, ce qui est un élément important à prendre en considération pour d'ultérieures applications *in vivo*. Le but premier de la thérapie génique est de cibler directement l'expression du gène thérapeutique dans la tumeur, sans atteindre les tissus sains. Pour ce faire, il existe plusieurs méthodes détaillées dans notre introduction, à savoir : une injection directe dans la tumeur, le ciblage par le vecteur et une expression tissu-spécifique du gène thérapeutique. Dans cette étude, nous avons utilisé le promoteur spécifique, hTERT de la sous-unité catalytique de l'enzyme télomérase. En effet, cette enzyme est active dans de nombreux types de cancers et dans plus de 85% des tumeurs primaires suggérant que ce promoteur puisse trouver de larges applications en thérapie génique des cancers. Remarquons que les modèles cellulaires que nous avons étudiés, présentent un niveau d'expression de la télomérase variable : la lignée BxPC-3 possédant un niveau très faible par rapport aux deux autres lignées utilisées, Capan-1 et Panc-1. Mais il est intéressant de remarquer que malgré cette faible expression dans la lignée BxPC-3, nous avons observé un effet des gènes bax et TRAIL sur la croissance tumorale. De plus, nos résultats *in vivo* ont justifié l'utilisation du promoteur hTERT puisque la réponse antitumorale obtenue sur le modèle de tumeur sous-cutanée était équivalente à celle observée avec le promoteur ubiquitaire de la phosphoglycérol kinase (PGK). De plus pour le promoteur hTERT, la démonstration du ciblage par son intermédiaire est non seulement faisable mais aussi très performant grâce à la stratégie adoptée dans la construction du système (voir ci-après). Nous avons aussi pu montrer sur le second modèle de greffe orthotopique dans le pancréas qui est beaucoup plus proche de la réalité clinique et ceci par analyse RT-PCR que l'expression du gène pro-apoptotique bax est uniquement retrouvée dans la tumeur et non dans le foie ou la rate des souris ayant été injectées avec les adénovirus. Ceci démontre bien la spécificité de l'expression du gène thérapeutique par le promoteur hTERT dans la tumeur et permet de négliger le tropisme naturel des adénovirus recombinants de sérotype 2 ou 5 pour le foie au niveau duquel ils exercent une forte toxicité [Yee 1996, Van der Eb 1998, Lozier 1999]. Ce résultat ouvre d'autres perspectives que la simple injection intra-tumorale en ce qui concerne les voies d'administration possibles pour ce type de vecteur. Par ce ciblage réussi de gènes thérapeutiques, nous pouvons envisager une modalité de traitement de stade avancé du cancer du pancréas par injection systémique de ce système d'adénovirus. Une autre possibilité de ciblage est l'utilisation de virus réplicatifs

sélectivement dans la tumeur. L'équipe de Kawashima a construit un vecteur adénoviral dans lequel les éléments du promoteur hTERT dirigent l'expression des gènes viraux E1A et E1B. Les résultats de ce travail montrent que ce virus se réplique effectivement au niveau de la tumeur et induit l'apoptose pour un certain nombre de lignées cancéreuses, tout en évitant les tissus sains ceci pour des expériences aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* [Kawashima 2004].

L'un des inconvénients de l'utilisation de promoteur tissu-spécifique en thérapie génique est leur faible activité transcriptionnelle par rapport à un promoteur viral commun comme celui du sarcome de Rous (SRV) ou le promoteur PGK. Pour remédier à ce point négatif, de nombreux outils moléculaires sont utilisés comme le système Cre/loxP afin d'augmenter l'expression du transgène *via* le promoteur de l'ACE [Kijima 1999] ou le système d'induction Tet-ON par un rétrovirus pRetro-ON [Kuhnel 2004]. Dans cette étude, nous avons utilisé un autre système, celui du régulateur GAL4 de levure *via* une stratégie de co-infection binaire d'adénovirus recombinants. Son principe est basé sur la fusion du domaine de liaison à l'ADN de l'activateur GAL4 de la levure à un fragment fortement acide de la protéine VP16 du virus de l'herpès. Ainsi, dans ce système d'adénovirus qui correspond à celui que nous avons utilisé, l'expression de la protéine VP16 est soit sous le contrôle du promoteur ubiquitaire PGK, soit du promoteur spécifique hTERT [Oligino 1996]. La protéine VP16 reconnaît les sites de liaison de GAL4 et de la TATA box, induisant l'expression du transgène qui se trouve en aval, dans notre étude, les gènes bax et TRAIL. Le travail de Koch et Col. montre que l'utilisation d'un tel système binaire augmente le niveau d'expression du gène lacZ d'un facteur 20 à 100 illustrant bien sa potentialité [Koch 2001]. Pour optimiser au maximum l'expression d'un transgène dans une tumeur, il serait également judicieux d'exploiter le procédé physiologique de l'hypoxie qui sévit à leur niveau. Car aussi étrange que cela puisse paraître, les cellules cancéreuses ont besoin d'être oxygénées si l'on veut les détruire efficacement. Ce manque d'oxygène, rend les cellules résistantes à divers traitements conventionnels notamment du fait de l'acquisition d'une néo-vascularisation relativement aberrante. Ce phénomène d'hypoxie active en effet, de nombreuses voies de signalisation par l'intermédiaire du facteur de transcription HIF-1 qui reconnaît les gènes possédant l'élément de réponse à l'hypoxie (HRE). Il serait ainsi intéressant d'insérer cet élément dans les promoteurs tumeur-spécifiques utilisés en thérapie génique pour que le « gène médicament » soit présent dans tout le micro-environnement de la tumeur oxygéné ou non.

Beaucoup de drogues utilisées en chimiothérapie, peuvent induire la mort des cellules tumorales par apoptose. L'analyse des mécanismes moléculaires qui régulent ce phénomène indique que les agents anticancéreux activent simultanément plusieurs voies qui régulent positivement ou négativement le procédé de mort. La voie principale d'apoptose induite par ces drogues implique l'activation des caspases dans le cytosol par des molécules pro-apoptotiques. En utilisant dans cette étude des gènes avec cette même fonction, nous avons démontré un effet synergique entre le traitement avec la gemcitabine et celui avec les gènes bax et TRAIL. Pour la lignée cellulaire BxPC-3, nous obtenons 15% de survie cellulaire avec les deux stratégies par rapport à 50% en utilisant les adénovirus combinés et plus de 90% avec la gemcitabine seule. Par cet effet synergique observé entre les deux traitements, nous avons utilisé *in vitro* de très faibles doses d'adénovirus et une concentration de gemcitabine de  $5.10^{-8}$  molaire, supérieure à l' $IC_{50}$  pour tous les modèles cellulaires. Ces résultats sont un avantage pour les expériences *in vivo*, par ces faibles doses administrées, peu d'effets secondaires ont été observés.

Le récent développement des systèmes d'imagerie moléculaire et les résultats obtenus dans le travail précédent sur la validité d'un système de fluorescence induite par laser sur nos modèles *in vivo*, nous a permis lors de cette étude, de suivre l'évolution tumorale au cours de la combinaison entre une stratégie de thérapie génique et la chimiothérapie. Ces observations rapides et non invasives peuvent être obtenues avant, pendant, et après le traitement en cours d'étude [Contag 1998] et elles se trouvent en corrélation avec le volume tumoral [Rehmtulla 2000]. Dix jours après injection des cellules tumorales, les premières images de fluorescence obtenues, mettent en évidence les souris du groupe contrôle qui présentent une tumeur visible au niveau du pancréas contrairement à celles traitées. Ces images démontrent la sensibilité du système utilisé (Hamamatsu, logiciel C. Imaging) lors des premiers jours de traitement. Vingt jours après, la différence de taille des tumeurs en fonction du spot fluorescent est bien réelle entre les trois groupes de souris. L'image en pseudo-couleur obtenue met en évidence l'efficacité *in vivo* du traitement avec les gènes pro-apoptotiques combinés à la gemcitabine. En contraste avec les approches d'imagerie conventionnelles qui fournissent, pour la plupart du temps, des données à la fin de l'expérience, le système d'imagerie de fluorescence permet d'obtenir des informations en temps réel par l'acquisition d'images consécutives d'un même animal pour une expérience complète. Dans cette étude, nous avons montré la possibilité de combiner deux approches thérapeutiques et son

efficacité a pu être suivie de façon non invasive en utilisant un système d'imagerie moléculaire basée sur la fluorescence de la GFP.

*DISCUSSION*

*GENERALE*

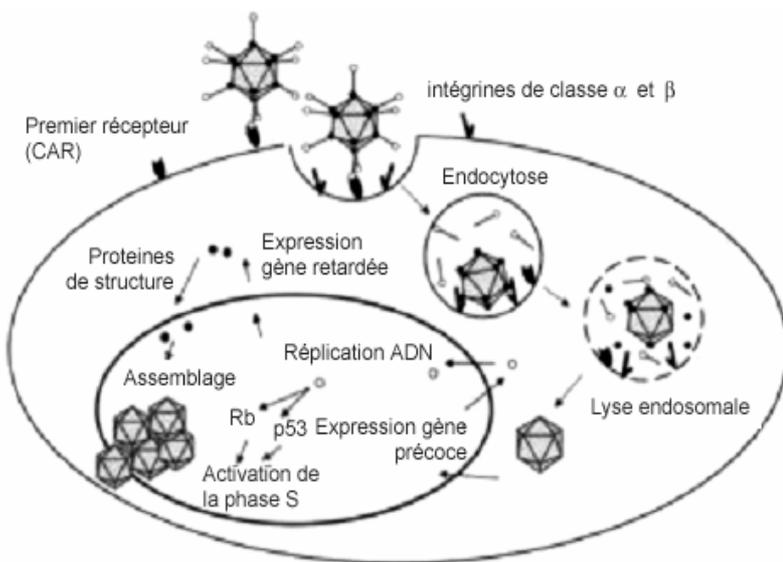
*CONCLUSIONS &  
PERSPECTIVES*

Le cancer est une affection en constante progression, représentant un véritable problème de santé publique. Le cancer du pancréas est un des plus mortels de tous les cancers de l'appareil digestif. La thérapie basée sur plusieurs modalités thérapeutiques a déjà été utilisée dans les traitements de ce type de cancer afin d'augmenter leur efficacité, de réduire la toxicité des agents et d'empêcher ou retarder le développement du phénomène de résistance. Cependant, du fait d'une différence généralement insignifiante entre les cellules normales et malignes au niveau des signaux biochimiques, les combinaisons entre les thérapies conventionnelles engendrent souvent des niveaux élevés de toxicité. L'équipe de recherche, dans laquelle j'ai effectué ma thèse, a pour thématique le développement de nouvelles approches thérapeutiques appliquées sur les cancers de l'appareil digestif. Une des plus innovantes au cours de ces dernières décennies pour le cancer, est la **thérapie génique** qui utilise des fonctions codées génétiquement pour atteindre les événements impliqués dans le développement et la progression de cancers. Cette approche moléculaire permet donc d'éradiquer les cellules cancéreuses ou de protéger les cellules normales de la toxicité des traitements conventionnels. En outre, elle permet d'augmenter les signaux biochimiques nécessaires à l'induction de ces thérapies standards. Plusieurs essais cliniques de phases I et II ont démontré que la thérapie génique anticancéreuse est bien tolérée et que sa combinaison à d'autres thérapies résulte en une réponse antitumorale potentialisée sans pour autant augmenter leurs toxicités [Fang 2003]. Ainsi cette association multi-thérapeutique devrait améliorer le traitement des cancers surtout pour les cancers dits chimio- ou radio-résistants, tel est le cas pour le cancer du pancréas [Chandler 2004]. Les différents résultats présentés dans le présent travail, illustrent bien l'intérêt d'une telle association, confirmant leur synergie voir même une potentialisation de la réponse thérapeutique. Un tel constat constitue un encouragement à poursuivre l'analyse des potentialités aussi bien thérapeutiques que diagnostiques de la thérapie génique des cancers.

L'efficacité de la thérapie génique repose sur deux facteurs essentiels que sont le mode de transfert et le ciblage. Sa progression est directement dépendante du développement de ces outils, discipline encore appelée la **vectorologie**, qui doivent être non toxiques, non immunogènes, potentiellement spécifiques ou limités aux cellules tumorales et capables de délivrer le gène approprié à de fortes concentrations uniquement dans les cellules cibles. Les vecteurs de transfert sont généralement soit d'origine virale soit non virale. Nous avons démontré, dans notre première étude, l'efficacité thérapeutique de la lipofection per-

péritonéale de plusieurs gènes suicides par le biais d'un lipide cationique, le BGTC sur un modèle de carcinose pancréatique humain chez la souris immuno-compétentes. Ces résultats suggèrent que l'approche multi-génique basée sur l'utilisation de type de vecteur de transfert puisse constituer une modalité de traitement pour les patients présentant une carcinose péritonéale.

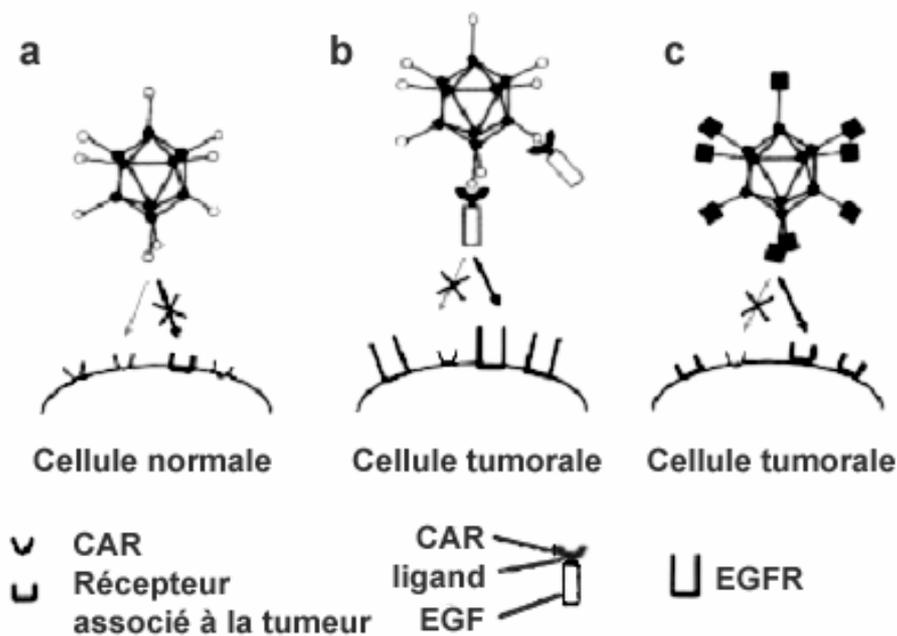
Les vecteurs viraux les plus communément utilisés en thérapie génique à l'heure actuelle, dérivent des adénovirus sauvages de sérotype 5 (Ad5). Ces virus entrent dans les cellules *via* une liaison entre les fibres knob du virus et le récepteur coxsackie-adénovirus (CAR) [Bauerschmitz 2002] (Figure 16A).



**Figure 16A.** La voie d'infection des adénovirus.

L'entrée du virus dans la cellule est initiée par une liaison à forte affinité du domaine knob des fibres du virus à son récepteur primaire, CAR. Cette liaison est suivie d'une endocytose médiée par les interactions entre le motif pentone-RGD et les intégrines cellulaires. Après la lyse endosomale, l'ADN est transporté dans le noyau via les microtubules. Les gènes viraux ou le transgène seront alors exprimés.

De récents travaux ont suggérés que cette liaison pouvait constituer une étape limitante pour le transfert de gène en cas d'absence de CARs au niveau des tissus cibles [Okegawa 2001]. Bien que ces récepteurs soient exprimés de façon ubiquitaire dans la plupart des cellules épithéliales normales, son expression dans les tumeurs est beaucoup plus variable avec pour conséquence une résistance à l'infection par l'Ad5. Dans un premier temps, le **ciblage transductionnel** de l'adénovirus est à envisager pour augmenter sa spécificité pour les cellules tumorales. Le but de cette modification est de diminuer le tropisme trop large de l'Ad5 pour les cellules épithéliales normales et/ou pour augmenter l'infectivité des cellules déficientes en CARs. Les différentes stratégies consistent soit en l'utilisation de molécules bispécifiques qui bloquent les interactions avec les CARs et qui redirigent le virus vers un autre récepteur, soit au ciblage génétique où les particules virales sont génétiquement modifiées [Kanerva 2004] (Figure 16B).



**Figure 16B.** Ciblage transductionnel.

(a) Ad5 se lie aux récepteurs CAR des cellules normales. (b) Les molécules adaptatrices peuvent recibler

la liaison de l'adénovirus à un autre récepteur. La protéine de fusion sCAR-EGF cible la liaison aux EGFR surexprimés dans de nombreux cancers. (c) Le domaine de liaison des fibres aux récepteurs peut être modifié génétiquement pour obtenir une liaison non plus dépendante des CAR mais à des récepteurs associés aux tumeurs.

La première stratégie est basée sur l'utilisation conjuguée de deux-composants reconnaissant de manière spécifique le domaine knob des fibres de l'adénovirus. Ces adaptateurs sont soit de nature chimique pour le fragment Fab de l'anticorps anti-knob, soit des ligands naturels spécifiques des récepteurs cellulaires de surface tels que le folate [Douglas 1996] ou le FGF2 [Rancourt 1998]. La seconde stratégie de « reciblage » de l'adénovirus par modification génétique rajoute une complexité au système, ce qui pourrait s'avérer être un désavantage dans la perspective de futurs essais cliniques. En effet, la quantité de conjugués modifiés liés à chaque virion pourrait être variable et sa stabilité chez l'homme n'est pas connue. La capside de l'adénovirus a été modifiée génétiquement afin d'y incorporer la partie nécessaire au ciblage. L'équipe de Wickham a ainsi entrepris des modifications au niveau du domaine knob de la fibre protéique de l'adénovirus en y ajoutant des peptides tels que le motif de liaison RGD des  $\alpha_v$  intégrines ou des résidus polylysine liant l'héparane sulfate sur la partie C-terminale de cette protéine [Wickham 1997]. Ces virus modifiés présentent des résultats intéressants aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

Une autre approche envisagée pour augmenter la spécificité de l'infectivité de l'adénovirus est le **ciblage transcriptionnel** qui permet d'augmenter l'entrée du vecteur dans les cellules cibles et de réduire le transfert vers les cellules non impliquées. En contraste avec les modifications précédentes, ce ciblage qui ne change pas le tropisme naturel du virus, est obtenu en plaçant les gènes viraux et le transgène sous le contrôle de promoteurs tissu- ou tumeur-spécifiques. Ces virus sont alors capables d'infecter un grand nombre de cellules qui possèdent les facteurs de transcription nécessaires à l'activité du promoteur spécifique. Une

telle stratégie n'est pas réservée aux adénovirus, mais peut être étendue à tous les autres type de vecteurs viraux afin de disposer d'une répllication dépendante du type cellulaire. A titre d'exemple, il est ainsi possible avec cette approche de combiner la thérapie génique à la radiothérapie en utilisant le promoteur enhancer early growth response gene 1 (egr-1), inductible lors des radiations. Un travail très intéressant de l'équipe de Xia et Col. utilise cet enhancer pour contrôler l'expression des gènes suicides eCD et hsv-TK dans un modèle de carcinome naso-pharyngé. Dans ce travail, il a été démontré que la thérapie par gènes suicides et la radiation agissent en synergie et que cette stratégie présente un potentiel intéressant par rapport à une thérapie unique pour ce type de cancer [Xia 2004].

Dans notre dernier travail, nous avons utilisé ce type de ciblage pour contrôler l'expression des gènes pro-apoptotiques, bax et TRAIL dans les lignées cellulaires exprimant la télomérase. Cette enzyme est fortement active dans plus de 85% des cancers primaires dont celui du pancréas mais beaucoup moins présente dans les cellules somatiques différenciées [Kim 1994, Shay 1997]. L'ensemble de nos résultats ont montré que les deux systèmes d'adénovirus exprimant les gènes bax et TRAIL sous le contrôle du promoteur hTERT sont non seulement fonctionnels mais qu'ils inhibent significativement la croissance tumorale. De plus, l'association de ces deux gènes permet d'obtenir une synergie avec une réponse antitumorale beaucoup plus importante que celles obtenues avec les systèmes utilisés isolement. Nous avons également pu démontrer par RT-PCR semi-quantitative que l'expression contrôlée de bax et de TRAIL se trouvaient préférentiellement au niveau de la tumeur donc le ciblage est efficace dans nos modèles. Enfin, le traitement avec ces adénovirus recombinants permet également d'augmenter la sensibilité des tumeurs pancréatiques à la gemcitabine, agent anticancéreux très utilisé actuellement.

Le ciblage transcriptionnel est aussi applicable et très appréciable pour la thérapie basés sur les gènes suicides ou « la chimiothérapie moléculaire ». Dans ce cas, la drogue toxique se retrouve uniquement dans les cellules qui expriment l'enzyme de la réaction d'activation de cette prodrogue par l'intermédiaire d'un promoteur spécifique. En plus de cette propriété de concentrer la drogue dans la tumeur, un autre avantage de cette stratégie est le phénomène « bystander » qui augmentent les chances d'atteindre toutes les cellules tumorales même celles ne possédant pas le transgène. L'impact de cet effet sur le succès d'une telle approche est si important que de nombreuses études se focalisent sur sa potentialisation. Deux catégories majeures « d'effet bystander » ont été identifiées : localement et à distance.

Dans le premier cas, la mort des cellules voisines est due à la diffusion des métabolites toxiques au travers des gap junctions. Ces communications peuvent être augmentées en régulant l'expression des protéines membranaires majoritaires de ces jonctions que sont les connexines (Cx), aussi responsables du « phénomène bystander » [Mesnil 2000]. Il serait donc judicieux de transférer les gènes codant pour les connexines (Cx43, Cx32, Cx40) ou d'induire chimiquement leur surexpression. Ceci a été démontrée à la fois *in vitro* [Ghoumari 1998, Tanaka 2001] et *in vivo* [Cirenei 1998, Duflot-Dancer 1998]. Il est important de noter que pour certaines lignées tumorales, il ne suffit pas de surexprimer le gène des Cx mais il faut aussi corriger la présence de ces protéines au niveau membranaire [Mc Masters 1998]. Ainsi le co-transfert du gène Cx ne semble pas être applicable pour toutes les tumeurs. Cette régulation au niveau de l'expression des Cx est potentiellement intéressante pour les systèmes d'activation des prodrogues qui nécessitent des contacts directs entre les cellules comme c'est le cas pour le système hsv-TK/GCV. « L'effet bystander » à distance est lui amélioré en stimulant le système immunitaire qui est impliqué dans cet effet. Le transfert simultané de gènes de cytokines et de gènes suicides suivi d'un traitement avec les prodrogues correspondantes, présente des résultats variés [Coll 1997, Pizzato 1998, Cao 2000]. Un bénéfice clinique et une sûreté dans le traitement ont été démontrés pour quatre patients atteints de glioblastome multiforme qui ont été co-transduits avec les gènes hsv-TK et IL-2, après une chirurgie et une radiothérapie [Palù 1999].

Les perspectives d'évolution de la chimiothérapie suggèrent que celle-ci pourra constituer une arme majeure dans l'arsenal thérapeutique des cancers. D'immenses progrès ont été enregistrés ; son association à la chirurgie ou à la radiothérapie augmente la probabilité de guérison. Il faut cependant reconnaître son échec devant les tumeurs solides qui sont les plus fréquentes dans les sociétés occidentales : cancer du sein, du poumon, de la prostate, tumeurs digestives et urinaires... Mais des perspectives encourageantes s'ouvrent devant nous car : 1) la chimiothérapie classique est en perpétuelle amélioration, 2) l'accroissement des doses de chimiothérapie permet d'augmenter son efficacité sur certaines tumeurs et 3) les chercheurs ont une meilleure connaissance des mécanismes de la chimiorésistance ce qui leur permet d'envisager de nouvelles stratégies. Définir des gènes appropriés et des cibles moléculaires pour la thérapie génique des cancers doivent rester notre objectif principal afin d'accroître les connaissances des facteurs moléculaires déterminants dans les phénomènes de cancérisation et de résistance. Le groupe de Chandler a étudié les mécanismes par

lesquels la gemcitabine bloque la prolifération cellulaire et induit l'apoptose sur la lignée pancréatique humaine BxPC-3, modèle cellulaire utilisé dans nos études. Ils ont montré que l'activation des caspases est nécessaires à l'action de cet agent chimiothérapeutique. De plus, afin d'intensifier son activité antitumorale, ils l'ont combiné à un inhibiteur du protéasome 26S, bloquant ainsi la voie de NF- $\kappa$ B, orientant ainsi plus efficacement les cellules tumorales pancréatiques vers cette voie défectueuse [Chandler 2004]. L'inhibition de cette voie de signalisation s'avère être une approche efficace pour augmenter l'apoptose induite par les drogues pour un certain type de cancers. Comme illustré dans cet exemple, il est clair que l'approche consistant à utiliser des gènes impliqués dans des voies de signalisation est très importante et intéressante. Ceci a été aussi démontré pour le gène p53 où des récents essais cliniques avec la forme sauvage semblent très prometteurs mais restent discutables pour certains types de cancers. Une solution possible à ce problème est de transférer des gènes régulant p53 et situé en aval comme p21 ou bax [Eastham 1995, Kagawa 2000]. L'inactivation du gène p53 est un événement commun dans les carcinomes pancréatiques pour 50 à 70% des cas [Barton 1991]. Une stratégie originale consisterait à utiliser le promoteur du gène p53 en vue d'un diagnostic pré-clinique afin de déterminer le statut moléculaire des tumeurs et d'adapter la thérapie génique en fonction du résultat obtenu. Un vecteur comportant le gène de la protéine GFP qui est sous le contrôle de l'élément de réponse de P53 reconnaîtrait les tumeurs où le gène p53 est sauvage et déclencherait alors une fluorescence signant le statut de ce gène au niveau de la tumeur.

En pathologie digestive, le modèle animal joue un rôle clé puisqu'il va permettre à partir d'une « reproduction » d'une pathologie humaine de tester des hypothèses sur les causes, les mécanismes et la thérapie de ces maladies. Pour caractériser et étudier ces modèles, il est indispensable de disposer d'outils adaptés. Afin de répondre à cette difficulté, des **techniques d'imagerie moléculaires** *in vivo* se sont progressivement imposées au cours de la décennie passée. La fluorescence de la GFP peut être utilisée en imagerie « corps entier » pour tester l'efficacité de transfert de gènes au cours d'une transduction *in vivo*. Dans notre travail, nous avons déterminé la sensibilité et la spécificité d'un système d'imagerie moléculaire par l'étude *in vivo* de tumeurs contenant une concentration dégressive en cellules tumorales exprimant la GFP après transfection stable *in vitro*. Une telle approche nous a permis d'obtenir 100% de sensibilité et de spécificité dans la détection *in vivo* de tumeurs pancréatiques ne comportant que 10% de cellules exprimant le gène de la GFP. Ce modèle

cellulaire d'origine humaine a été injecté de deux façons ; soit en sous-cutanée, soit en orthotopique dans la pancréas de souris Nude. Cette méthode d'imagerie moléculaire a permis de détecter des taux plus faibles de cellules transfectées, soit de 1 à 5%, mais avec une perte de sensibilité dans 50% des cas.

Une autre application potentiellement intéressante pour la fluorescence de la GFP est la visualisation de l'angiogenèse au niveau de la tumeur. La patte de la souris est quasi transparente, représentant un site idéal pour réaliser une imagerie quantitative de l'angiogenèse tumorale chez l'animal vivant. Les vaisseaux peuvent être visualisés grâce à leur contraste augmenté par la fluorescence de la GFP avec la tumeur [Yang 2001]. L'équipe de Yang a ainsi injecté des cellules de carcinome pulmonaire exprimant la GFP au niveau de la patte de souris immuno-déficientes et en utilisant un système d'imagerie de fluorescence, ils observent une augmentation progressive de la densité capillaire. Une incision cutanée a permis d'augmenter la sensibilité de cette méthode. Ces modèles d'angiogenèse sur la souris peuvent être utilisés pour réaliser une évaluation *in vivo* en temps réel, de l'efficacité thérapeutique d'agents anti-angiogéniques. Plus de trente agents différents concernant ce concept, sont actuellement en cours d'essai clinique. Il est donc clair qu'il est nécessaire de disposer de moyens aptes à discriminer toutes les molécules qui sortent sur le marché du médicament. Les nouvelles technologies d'imagerie, couplées à des logiciels plus performants au niveau de l'acquisition et de l'analyse des images, permettraient de nouveaux progrès dans la conception des sondes protéiques fluorescentes. L'acquisition de ce type d'images tendra vers l'obtention simultanée d'informations sur plusieurs mécanismes cellulaires. Notre aptitude à visualiser les phénomènes moléculaires sur le vivant à pour seule limitation notre créativité dans ce domaine ainsi que notre capacité à évaluer et comprendre les données en cours d'acquisition qui se présentent naturellement en deux dimensions.

Les progrès dans les stratégies d'imagerie optique moléculaire proviennent aussi du développement récent de sondes telles que des sondes bioluminescentes ciblées et des fluorochromes émettant ou activable dans le rouge [Lin 2002]. Un avantage théorique notable des techniques d'optique est le fait que des sondes multiples avec des caractéristiques spectrales différentes pourraient être utilisées pour de l'imagerie multi-canaux, comme pour le caryotype *in vivo* [Weissleder 1999]. Des outils intéressants présentant les propriétés énoncées ci-dessus sont constitués par les « Quantum Dots », composés de nanocristaux inorganiques. Beaucoup plus brillants, ils émettent sur des durées plus longues que les

fluorophores organiques et ils sont virtuellement exempts de photo-blanchiment (photobleaching). Ces nouvelles sondes repoussent les limites de l'imagerie par fluorescence en terme de détection d'antigènes, méthode peu représentée, et de capture d'images en temps réel. Leurs propriétés spectrales uniques en font par ailleurs des outils remarquablement adaptés aux expériences de marquage multi-couleurs. Certaines entreprises proposent de marquer l'anticorps primaire de son choix par un quantum dot. La réaction de conjugaison entre l'anticorps d'intérêt et le quantum dot repose sur le couplage covalent entre des groupements thiols et des groupements maléimides. Les ponts disulfures de l'anticorps sont réduits en groupements thiols par le DTT. Les groupements amines en surface du quantum dot sont convertis en groupements maléimides réactifs aux thiols. Le quantum dot activé et l'anticorps « réduit » sont mélangés pour former un conjugué qui est ensuite concentré et purifié avant utilisation. Les avancées technologiques dans l'identification et le clonage de gènes permettent une appréciation plus claire des événements moléculaires du cancer. L'addition de ces connaissances et l'utilisation de ces fluorochromes, nous permettent d'envisager un diagnostic moléculaire pré-clinique à une période précoce de l'évolution du cancer en utilisant les qdots marqués avec des anticorps reconnaissant les antigènes tumoraux. Un autre moyen d'affiner les techniques optiques d'imagerie moléculaire est d'associer bioluminescence et fluorescence ainsi que d'autres techniques comme le PET scan, le scanner X ou l'IRM. A cet égard, un certain nombre de progrès technologiques ont été réalisés concernant les images de faible intensité, par l'utilisation de détecteurs hautement sensibles sur des individus et non plus seulement limités aux cultures cellulaires ou aux petits animaux « transparents » tels que les souris. Une des évolutions importantes du matériel d'imagerie a consisté à réfrigérer la caméra afin d'augmenter sa sensibilité. On évite par ce biais le bruit thermique encore appelé « courant noir » provenant de l'énergie thermique relarguée constamment par les électrons de la caméra. Le refroidissement de la pièce réduit efficacement ce bruit de fond, l'intensité du courant diminuant d'un facteur 10 pour chaque abaissement de 20°C [Spibey 2001]. Actuellement les images obtenues sont en deux dimensions ; pour obtenir des images volumétriques il faudrait une caméra en rotation autour de l'animal ou disposer de vues multiples du même animal prises par une caméra simple. Une autre approche pour obtenir des images de structures plus profondes est l'utilisation de tomographie médiée par la fluorescence [Ntziachristos 2002]. Le sujet est exposé à des pulsations continues ou à une

lumière pulsée provenant de différentes sources et les détecteurs sont arrangés dans un ordre bien défini dans l'espace au niveau de la chambre de capture des images. Les procédés mathématiques de ces informations résultent en une image tomographique reconstruite. Les images obtenues ont une résolution de 1 à 2 mm et le seuil de détection du fluorochrome est de l'ordre du nanomolaire. Les tentatives les plus récentes sur la construction de scanner basé sur caméra CCD pour la tomographie de sondes fluorescentes proches du rouge ont donné également des résultats encourageants. Les prototypes obtenus atteignent une résolution de 3 mm, possèdent une détection linéaire avec plus de deux ordres de magnitudes de la concentration du fluorochrome et peuvent détecter un objet fluorescent à des quantités de l'ordre du femtomolaire dans la géométrie des petits animaux de laboratoire. Cette technique n'est encore qu'à ses débuts et nécessite une validation mathématique plus importante avant son usage pratique.

Bien que le modèle orthotopique dans le pancréas, utilisé dans les différents travaux que nous présentons ici, constitue une amélioration significative par rapport au modèle en sous-cutané. Mais beaucoup de paramètres clés de l'oncogenèse restent encore hors de portée pour les chercheurs dans le domaine du cancer. Les lignées mutantes ou transgéniques de souris qui développent spontanément des tumeurs sont des modèles plus proches de la réalité des maladies humaines, [Macleod 1999, Van Dyke 2002]. Ces événements de l'oncogenèse peuvent être alors évalués dans ces modèles, y compris des événements initiaux et précoces dans le processus de la maladie. Afin de démontrer la richesse d'informations que peut procurer cette approche, le groupe de Vooijs a étudié un modèle conditionnel de souris transgénique développant un cancer sporadique dépendant du gène rétinoblastome Rb où le gène reporter de la luciférase a été fusionné, permettant ainsi de suivre la progression de la maladie par imagerie de bioluminescence [Vooijs 2002]. Dans ce modèle, l'animal développe des tumeurs pituitaires qui sont marquées par l'expression du gène de la luciférase. Le système d'imagerie est utilisé pour étudier les événements et la progression de la maladie mais aussi la réponse aux thérapies en cours d'essai. La combinaison des méthodes sensibles d'imagerie moléculaire avec le développement de modèles spontanés de tumeur dans lequel la maladie est dépendante des altérations génétiques bien définies, faciliterait l'analyse des étapes critiques de l'initiation et de la progression de la maladie néoplasique et accélérerait le développement de thérapies anticancéreuses plus efficaces, ciblant les événements moléculaires spécifiques de l'oncogenèse.

L'ensemble des résultats de mes travaux démontre qu'il est impossible d'uniformiser l'approche thérapeutique en ce qui concerne le cancer du pancréas. Il faut donc considérer chaque type de tumeur comme une entité originale à laquelle le traitement se doit d'être adapté. Il convient de noter qu'il est fort probable dans l'avenir d'envisager un traitement des cancers en fonction du statut génétique de chaque tumeur. En effet, il apparaît clairement qu'il faut adapter le traitement chimiothérapeutique en fonction du niveau d'expression des gènes qui sont responsables du métabolisme de la drogue administrée. De plus, la stratégie d'une **approche « multigénique »** permet d'améliorer le potentiel de la thérapie génique. Son association avec d'autres modalités de traitements conventionnels permet d'obtenir une meilleure réponse antitumorale. Dans les années à venir, la **stratégie thérapeutique « multimodale »** va s'imposer pour le traitement des cancers surtout ceux reconnus résistants aux différents traitements.



# *ANNEXES*

*Références*  
*Bibliographiques*

**Abdallah B**, Hassan A, Benoist C, Goula D, Behr JP, Demeneix BA. A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine. *Hum Gene Ther.* **1996**;7(16):1947-54.

**Abratt RP**, Sandler A, Crino L, Steward WP, Shepherd FA, Green MR, Nguyen B, Peters GJ. Combined cisplatin and gemcitabine for non-small cell lung cancer: influence of scheduling on toxicity and drug delivery. *Semin Oncol.* **1998**;25(4 Suppl 9):35-43.

**Aghi M**, Kramm CM, Chou TC, Breakefield XO, Chiocca EA. Synergistic anticancer effects of ganciclovir/thymidine kinase and 5-fluorocytosine/cytosine deaminase gene therapies. *J Natl Cancer Inst.* **1998**;90(5):370-80.

**Aghi M**, Hochberg F, Breakefield XO. Prodrug activation enzymes in cancer gene therapy. *J Gene Med.* **2000**;2(3):148-64.

**Almoguera C**, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell.* **1988**;20;53(4):549-54.

**Andre T**, Lotz JP, Bouleuc C, Azzouzi K, Houry S, Hannoun L, See J, Estes A, Avenin D, Izrael V. Phase II trial of 5-fluorouracil, leucovorin and cisplatin for treatment of advanced pancreatic adenocarcinoma. *Ann Oncol.* **1996**;7(2):173-8.

**Apple SK**, Hecht JR, Lewin DN, Jahromi SA, Grody WW, Nieberg RK. Immunohistochemical evaluation of K-ras, p53, and HER-2/neu expression in hyperplastic, dysplastic, and carcinomatous lesions of the pancreas: evidence for multistep carcinogenesis. *Hum Pathol.* **1999**;30(2):123-9.

**Arafat WO**, Gomez-Navarro J, Xiang J, Barnes MN, Mahasreshti P, Alvarez RD, Siegal GP, Badib AO, Buchsbaum D, Curiel DT, Stackhouse MA. An adenovirus encoding proapoptotic Bax induces apoptosis and enhances the radiation effect in human ovarian cancer. *Mol Ther.* **2000**;1(6):545-54.

**Ashkenazi A**, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokh Z, Schwall RH. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest.* **1999**;104(2):155-62.

**Austin EA**, Huber BE. A first step in the development of gene therapy for colorectal carcinoma: cloning, sequencing, and expression of *Escherichia coli* cytosine deaminase. *Mol Pharmacol.* **1993**;43(3):380-7.

**Baldwin HS**. What's new in cardiology! *Pediatr Rev.* **1995**;16(12):443-7.

**Barton CM**, Staddon SL, Hughes CM, Hall PA, O'Sullivan C, Kloppel G, Theis B, Russell RC, Neoptolemos J, Williamson RC, et al. Abnormalities of the p53 tumour suppressor gene in human pancreatic cancer. *Br J Cancer.* **1991**;64(6):1076-82.

**Bauerschmitz GJ**, Barker SD, Hemminki A. Adenoviral gene therapy for cancer: from vectors to targeted and replication competent agents (review). *Int J Oncol.* **2002**;21(6):1161-74.

**Beltinger C**, Fulda S, Kammertoens T, Uckert W, Debatin KM. Mitochondrial amplification of death signals determines thymidine kinase/ganciclovir-triggered activation of apoptosis. *Cancer Res.* **2000**;60(12):3212-7.

**Bennett CF**, Mirejovsky D, Crooke RM, Tsai YJ, Felgner J, Sridhar CN, Wheeler CJ, Felgner PL. Structural requirements for cationic lipid mediated phosphorothioate oligonucleotides delivery to cells in culture. *J Drug Target.* **1998**;5(3):149-62.

**Bentires-Alj M**, Hellin AC, Lechanteur C, Princen F, Lopez M, Fillet G, Gielen J, Merville MP, Bours V. Cytosine deaminase suicide gene therapy for peritoneal carcinomatosis. *Cancer Gene Ther.* **2000**;7(1):20-6.

**Benveniste H**, Einstein G, Kim KR, Hulette C, Johnson GA. Detection of neuritic plaques in Alzheimer's disease by magnetic resonance microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1999**;96(24):14079-84.

**Bird D**, Gu M. Two-photon fluorescence endoscopy with a micro-optic scanning head. *Opt Lett.* **2003**;28(17):1552-4.

**Blackstone NW**, Green DR. The evolution of a mechanism of cell suicide. *Bioessays.* **1999**;21(1):84-8.

- Boehm T**, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature*. **1997**;390(6658):404-7.
- Boletta A**, Benigni A, Lutz J, Remuzzi G, Soria MR, Monaco L. Nonviral gene delivery to the rat kidney with polyethylenimine. *Hum Gene Ther*. **1997**;8(10):1243-51.
- Boschman CR**, Stryker S, Reddy JK, Rao MS. Expression of p53 protein in precursor lesions and adenocarcinoma of human pancreas. *Am J Pathol*. **1994**;145(6):1291-5.
- Bouillet P**, Strasser. Bax and Bak: back-bone of T cell death. *Nat Immunol*. **2002**;3(10):893-4.
- Boussif O**, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1995**;92(16):7297-301.
- Bouvet M**, Bold RJ, Lee J, Evans DB, Abbruzzese JL, Chiao PJ, McConkey DJ, Chandra J, Chada S, Fang B, Roth JA. Adenovirus-mediated wild-type p53 tumor suppressor gene therapy induces apoptosis and suppresses growth of human pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol*. **1998**;5(8):681-8.
- Bouvet M**, Yang M, Nardin S, Wang X, Jiang P, Baranov E, Moossa AR, Hoffman RM. Chronologically-specific metastatic targeting of human pancreatic tumors in orthotopic models. *Clin Exp Metastasis*. **2000**;18(3):213-8.
- Bradley LM**, Duncan DD, Yoshimoto K, Swain SL. Memory effectors: a potent, IL-4-secreting helper T cell population that develops in vivo after restimulation with antigen. *J Immunol*. **1993**;150(8 Pt 1):3119-30.
- Bramhall SR**, Neoptolemos JP, Stamp GW, Lemoine NR. Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma. *J Pathol*. **1997**;182(3):347-55.
- Braud AC**, Piedbois P. Place de la chimiothérapie dans le traitement des cancers du pancréas inextirpables. Journée de gastroentérologie de l'Hôpital Henri Mondor. **1999**.
- Brunda MJ**, Luistro L, Warriar RR, Wright RB, Hubbard BR, Murphy M, Wolf SF, Gately MK. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med*. **1993**;178(4):1223-30.
- Busch H**. Onc genes and other new targets for cancer chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol*. **1984**;107(1):1-14.
- Burns JC**, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1993**;90(17):8033-7.
- Burris HA 3rd**. Docetaxel in combination with fluorouracil for advanced solid tumors. *Oncology (Huntingt)*. **1997**;11(8 Suppl 8):50-2.
- Burris HA 3rd**, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff DD. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol*. **1997**;15(6):2403-13.
- Caldas C**, Kern SE. K-ras mutation and pancreatic adenocarcinoma. *Int J Pancreatol*. **1995**;18(1):1-6.
- Caldas C**, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet*. **1994**;8(1):27-32.
- Campbell RE**, Tour O, Palmer AE, Steinbach PA, Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2002**;99(12):7877-82.
- Cao X**, Huang X, Ju DW, Zhang W, Hamada H, Wang J. Enhanced antitumoral effect of adenovirus-mediated cytosine deaminase gene therapy by induction of antigen-presenting cells through stem cell factor/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer. *Cancer Gene Ther*. **2000**;7(2):177-86.
- Carter PJ**, Samulski RJ. Adeno-associated viral vectors as gene delivery vehicles. *Int J Mol Med*. **2000**;6(1):17-27.

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

**Cerny WL**, Mangold KA, Scarpelli DG. K-ras mutation is an early event in pancreatic duct carcinogenesis in the Syrian golden hamster. *Cancer Res*. **1992**;52(16):4507-13.

**Chandler NM**, Canete JJ, Callery MP. Caspase-3 drives apoptosis in pancreatic cancer cells after treatment with gemcitabine. *J Gastrointest Surg*. **2004**;8(8):1072-8.

**Chandler NM**, Canete JJ, Callery MP. Increased expression of NF-kappa B subunits in human pancreatic cancer cells. *J Surg Res*. **2004**;118(1):9-14.

**Chen B**, Shi Y, Smith JD, Choi D, Geiger JD, Mule JJ. The role of tumor necrosis factor alpha in modulating the quantity of peripheral blood-derived, cytokine-driven human dendritic cells and its role in enhancing the quality of dendritic cell function in presenting soluble antigens to CD4+ T cells in vitro. *Blood*. **1998**;91(12):4652-61.

**Cheng JQ**, Ruggeri B, Klein WM, Sonoda G, Altomare DA, Watson DK, Testa JR. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1996**;93(8):3636-41.

**Cheng L**, Ziegelhoffer PR, Yang NS. In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1993**;90(10):4455-9.

**Cheng L**, Chen D., Manome Y., Dong Y., Fine H. A., Kufe D. Breast cancer selective gene expression and therapy mediated by recombinant adenoviruses containing the DF3/MUC1 promoter. *J. Clin. Investig*. **1995**;96: 2775-2782,.

**Chen XP**, He SQ, Wang HP, Zhao YZ, Zhang WG. Expression of TNF-related apoptosis-inducing Ligand receptors and antitumor tumor effects of TNF-related apoptosis-inducing Ligand in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. **2003**;9(11):2433-40.

**Chishima T**, Miyagi Y, Li L, Tan Y, Baranov E, Yang M, Shimada H, Moossa AR, Hoffman RM. Use of histoculture and green fluorescent protein to visualize tumor cell host interaction. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. **1997**;33(10):745-7.

**Chooniedass-Kothari S**, Hamedani MK, Troup S, Hube F, Leygue E. The steroid receptor RNA activator protein is expressed in breast tumor tissues. *Int J Cancer*. **2005**.

**Chresta CM**, Arriola EL, Hickman JA. Apoptosis and cancer chemotherapy. *Behring Inst Mitt*. **1996**;97:232-40.

**Cirenei N**, Colombo BM, Mesnil M, Benedetti S, Yamasaki H, Finocchiaro G. In vitro and in vivo effects of retrovirus-mediated transfer of the connexin 43 gene in malignant gliomas: consequences for HSVtk/GCV anticancer gene therapy. *Gene Ther*. **1998**;5(9):1221-6.

**Clary BM**, Lyerly HK. Gene therapy and pancreatic cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. **1998**;7(1):217-49.

**Cody CW**, Prasher DC, Westler WM, Prendergast FG, Ward WW. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein. *Biochemistry*. **1993**;32(5):1212-8.

**Coll JL**, Mesnil M, Lefebvre MF, Lancon A, Favrot MC. Long-term survival of immunocompetent rats with intraperitoneal colon carcinoma tumors using herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir and IL-2 treatments. *Gene Ther*. **1997**;4(11):1160-6.

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

**Connors TA**. The choice of prodrug for gene directed enzyme prodrug therapy of cancer. *Gene Ther*. **1995**;2:702-709.

**Contag CH**, Jenkins D, Contag PR, Negrin RS. Use of reporter genes for optical measurements of neoplastic disease in vivo. *Neoplasia*. **2000**;2(1-2):41-52.

**Contag PR**, Olomu IN, Stevenson DK, Contag CH. Bioluminescent indicators in living mammals. *Nat Med*. **1998**;4(2):245-7.

- Cowgill SM**, Muscarella P. The genetics of pancreatic cancer. *Am J Surg*. **2003**;186(3):279-86.
- Daniel PT**, Wieder T, Sturm I, Schulze-Osthoff K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia*. **2001**;15(7):1022-32.
- Day JD**, Diguseppe JA, Yeo C, Lai-Goldman M, Anderson SM, Goodman SN, Kern SE, Hruban RH. Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms. *Hum Pathol*. **1996**;27(2):119-24.
- Deharvengt S**, Wack S, Uhring M, Aprahamian M, Hajri A. Suicide gene/prodrug therapy for pancreatic adenocarcinoma by *E. coli* purine nucleoside phosphorylase and 6-methylpurine 2'-deoxyriboside. *Pancreas*. **2004**;28(2):E54-64.
- Deharvengt S**, Wack S, Aprahamian M, Hajri A. Transcriptional tumor-selective promoter targeting of *E. coli* purine nucleoside phosphorylase for pancreatic cancer suicide gene therapy. *J Gene Med*. **2005**;7(5):672-80.
- Degterev A**, Lugovskoy A, Cardone M, Mulley B, Wagner G, Mitchison T, Yuan J. Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL. *Nat Cell Biol*. **2001**;3(2):173-82.
- Derynck R**, Feng XH. TGF-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta*. **1997**;1333(2):F105-50.
- Dilber MS**, Abedi MR, Christensson B, Bjorkstrand B, Kidder GM, Naus CC, Gahrton G, Smith CI. Gap junctions promote the bystander effect of herpes simplex virus thymidine kinase in vivo. *Cancer Res*. **1997**;57(8):1523-8.
- Dilber MS**, Smith CI. Suicide genes and bystander killing: local and distant effects. *Gene Ther*. **1997**;4(4):273-4.
- Dmitriev I**, Krasnykh V, Miller CR, Wang M, Kashentseva E, Mikheeva G, Belousova N, Curiel DT. An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J Virol*. **1998**;72(12):9706-13.
- Domin BA**, Mahony WB, Zimmerman TP. Transport of 5-fluorouracil and uracil into human erythrocytes. *Biochem Pharmacol*. **1993**;46:503-510.
- Douglas JT**, Rogers BE, Rosenfeld ME, Michael SI, Feng M, Curiel DT. Targeted gene delivery by tropism-modified adenoviral vectors. *Nat Biotechnol*. **1996**;14(11):1574-8.
- Duflot-Dancer A**, Piccoli C, Rolland A, Yamasaki H, Mesnil M. Long-term connexin-mediated bystander effect in highly tumorigenic human cells in vivo in herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy. *Gene Ther*. **1998**;5(10):1372-8.
- Eastham JA**, Hall SJ, Sehgal I, Wang J, Timme TL, Yang G, Connell-Crowley L, Elledge SJ, Zhang WW, Harper JW, et al. In vivo gene therapy with p53 or p21 adenovirus for prostate cancer. *Cancer Res*. **1995**;55(22):5151-5.
- Elion GB**. The biochemistry and mechanism of action of acyclovir. *J Antimicrob Chemother*. **1983**;12 Suppl B:9-17.
- El Bakkourri K**, Servais C, Clement N, Cheong SC, Franssen JD, Velu T, Brandenburger A. In vivo anti-tumour activity of recombinant MVM parvoviral vectors carrying the human interleukin-2 cDNA. *J Gene Med*. **2005**;7(2):189-97.
- Elshami AA**, Saavedra A, Zhang H, Kucharczuk JC, Spray DC, Fishman GI, Amin KM, Kaiser LR, Albelda SM. Gap junctions play a role in the 'bystander effect' of the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system in vitro. *Gene Ther*. **1996**;3(1):85-92.
- Erbs P**, Regulier E, Kintz J, Leroy P, Poitevin Y, Exinger F, Jund R, Mehtali M. In vivo cancer gene therapy by adenovirus-mediated transfer of a bifunctional yeast cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase fusion gene. *Cancer Res*. **2000**;60(14):3813-22.
- Fahrood H**, Serbina N, Huang L. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta*. **1995**;1235(2):289-95.
- Fang B**, Roth JA. The role of gene therapy in combined modality treatment strategies for cancer. *Curr Opin Mol Ther*. **2003**;5(5):475-82.

- Faulds D, Heel RC.** Ganciclovir. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cytomegalovirus infections. *Drugs.* **1990**;39(4):597-638.
- Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R, Ramsey P, Martin M, Felgner PL.** Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem.* **1994**;269(4):2550-61.
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M.** Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1987**;84(21):7413-7.
- Felgner PL, Ringold GM.** Cationic liposome-mediated transfection. *Nature.* **1989**;337(6205):387-8.
- Ferrari ME, Nguyen CM, Zelphati O, Tsai Y, Felgner PL.** Analytical methods for the characterization of cationic lipid-nucleic acid complexes. *Hum Gene Ther.* **1998**;9(3):341-51.
- Feng XH, Zhang Y, Wu RY, Derynck R.** The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for smad3 in TGF-beta-induced transcriptional activation. *Genes Dev.* **1998**;12(14):2153-63.
- Flatt PM, Tang LJ, Scatena CD, Szak ST, Pietenpol JA.** p53 regulation of G(2) checkpoint is retinoblastoma protein dependent. *Mol Cell Biol.* **2000**;20(12):4210-23.
- Folkman J.** Endothelial cells and angiogenic growth factors in cancer growth and metastasis. Introduction. *Cancer Metastasis Rev.* **1990**;9(3):171-4.
- Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, Kaplan DR, Tsichlis PN.** The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell.* **1995**;81(5):727-36.
- Fransen L, Van der Heyden J, Ruyschaert R, Fiers W.** Recombinant tumor necrosis factor: its effect and its synergism with interferon-gamma on a variety of normal and transformed human cell lines. *Eur J Cancer Clin Oncol.* **1986**;22(4):419-26.
- Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL, Abraham GN.** The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res.* **1993**;53(21):5274-83.
- Freeman SM, Ramesh R, Marrogi AJ.** Immune system in suicide-gene therapy. *Lancet.* **1997**;349(9044):2-3.
- Freytag SO, Rogulski KR, Paielli DL, Gilbert JD, Kim JH.** A novel three-pronged approach to kill cancer cells selectively: concomitant viral, double suicide gene, and radiotherapy. *Hum Gene Ther.* **1998**;9(9):1323-33.
- Funatomi H, Itakura J, Ishiwata T, Pastan I, Thompson SA, Johnson GR, Korc M.** Amphiregulin antisense oligonucleotide inhibits the growth of T3M4 human pancreatic cancer cells and sensitizes the cells to EGF receptor-targeted therapy. *Int J Cancer.* **1997**;72(3):512-7.
- Gandeeep S, Brew R, Green B, Christmas SE, Klatzmann D, Poston GJ, Kinsella AR.** Prodrug-activated gene therapy: involvement of an immunological component in the "bystander effect". *Cancer Gene Ther.* **1996**;3(2):83-8.
- Gandhi V, Huang P, Xu YZ, Heinemann V, Plunkett W.** Metabolism and action of 2',2'-difluorodeoxycytidine: self-potential of cytotoxicity. *Adv Exp Med Biol.* **1991**;309A:125-30.
- Gaiano N, Kohtz JD, Turnbull DH, Fishell G.** A method for rapid gain-of-function studies in the mouse embryonic nervous system. *Nat Neurosci.* **1999**;2(9):812-9.
- Gao X, Huang L.** A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **1991**;179(1):280-5.
- Ge K, Xu L, Zheng Z, Xu D, Sun L, Liu X.** Transduction of cytosine deaminase gene makes rat glioma cells highly sensitive to 5-fluorocytosine. *Int J Cancer.* **1997**;71(4):675-9.
- Gershon H, Ghirlando R, Guttman SB, Minsky A.** Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochemistry.* **1993**;32(28):7143-51.
- Ghaneh P, Greenhalf W, Humphreys M, Wilson D, Zumstein L, Lemoine NR, Neoptolemos JP.** Adenovirus-mediated transfer of p53 and p16(INK4a) results in pancreatic cancer regression in vitro and in vivo. *Gene Ther.* **2001**;8(3):199-208.

**Ghoumari** AM, Mouawad R, Zerrouqi A, Nizard C, Provost N, Khayat D, Naus CC, Soubrane C. Actions of HSVtk and connexin43 gene delivery on gap junctional communication and drug sensitization in hepatocellular carcinoma. *Gene Ther.* **1998**;5(8):1114-21.

**Godbey** WT, Wu KK, Mikos AG. Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *J Control Release.* **1999**;60(2-3):149-60.

**Godbey** WT, Wu KK, Mikos AG. Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *J Biomed Mater Res.* **1999**;45(3):268-75.

**Godbey** WT, Barry MA, Saggau P, Wu KK, Mikos AG. Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery. *J Biomed Mater Res.* **2000**;51(3):321-8.

**Goggins** M, Schutte M, Lu J, Moskaluk CA, Weinstein CL, Petersen GM, Yeo CJ, Jackson CE, Lynch HT, Hruban RH, Kern SE. Germline BRCA2 gene mutations in patients with apparently sporadic pancreatic carcinomas. *Cancer Res.* **1996**;56(23):5360-4.

**Greco** O, Dachs GU. Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future perspectives. *J Cell Physiol.* **2001**;187(1):22-36.

**Groeningen** van CJ. Intravenous and intra-arterial chemotherapeutic possibilities in biliopancreatic cancer. *Ann Oncol.* **1999**;10 Suppl 4:305-7.

**Gu** J, Andreeff M, Roth JA, Fang B. hTERT promoter induces tumor-specific Bax gene expression and cell killing in syngenic mouse tumor model and prevents systemic toxicity. *Gene Ther.* **2002**;9(1):30-7.

**Gudjonsson** B. Critical look at resection for pancreatic cancer. *Lancet.* **1996**;348(9043):1676.

**Gunji** Y, Tasaki K, Tagawa M, Matsubara H, Takenaga K, Suzuki T, Asano T, Ochiai T, Isono K, Sakiyama S. Inhibition of peritoneal dissemination of murine colon carcinoma cells by administrating retrovirus harboring IL-2 gene. *Cancer Gene Ther.* **1998**;5(6):339-43.

**Gutierrez-Puente** Y, Zapata-Benavides P, Tari AM, Lopez-Berestein G. Bcl-2-related antisense therapy. *Semin Oncol.* **2002**;29(3 Suppl 11):71-6.

**Haberkorn** U, Oberdorfer F, Gebert J, Morr I, Haack K, Weber K, Lindauer M, van Kaick G, Schackert HK. Monitoring gene therapy with cytosine deaminase: in vitro studies using tritiated-5-fluorocytosine. *J Nucl Med.* **1996**;37(1):87-94.

**Hasegawa** S, Yang M, Chishima T, Miyagi Y, Shimada H, Moossa AR, Hoffman RM. In vivo tumor delivery of the green fluorescent protein gene to report future occurrence of metastasis. *Cancer Gene Ther.* **2000**;7(10):1336-40.

**Hanahan** D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* **2000**;100(1):57-70.

**Haviv** YS, Curiel DT. Conditional gene targeting for cancer gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* **2001**;53(2):135-54.

**Heim** R, Prasher DC, Tsien RY. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1994**;91(26):12501-4.

**Heineman** V, Xu YZ, Chubb S, Sen A, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. Cellular elimination of 2',2'-difluorodeoxycytidine 5'-triphosphate: a mechanism of self-potential. *Cancer Res.* **1992**;52(3):533-9.

**Heyes** JA, Niculescu-Duvaz D, Cooper, Springer CJ. Synthesis of novel cationic lipids: effect of structural modification on the efficiency of gene transfer. *J Med Chem.* **2002**;45(1):99-114.

**Hoffman** RM. In vivo imaging of metastatic cancer with fluorescent proteins. *Cell Death Differ.* **2002**;9(8):786-9.

**Houghton** JA. Apoptosis and drug response. *Curr Opin Oncol.* **1999** Nov;11(6):475-81.

**Hruban** RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* **2000**;6(8):2969-72.

**Huang** L, Goodrow TL, Zhang SY, Klein-Szanto AJ, Chang H, Ruggeri BA. Deletion and mutation analyses of the P16/MTS-1 tumor suppressor gene in human ductal pancreatic cancer reveals a higher frequency of abnormalities in tumor-derived cell lines than in primary ductal adenocarcinomas. *Cancer Res.* **1996**;56(5):1137-41.

**Huang** P, Chubb S, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res.* **1991**;51(22):6110-7.

**Huber** BE, Austin EA, Good SS, Knick VC, Tibbels S, Richards CA. In vivo antitumor activity of 5-fluorocytosine on human colorectal carcinoma cells genetically modified to express cytosine deaminase. *Cancer Res.* **1993**;53(19):4619-26.

**Huber** BE, Austin EA, Richards CA, Davis ST, Good SS. Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1994**;91(17):8302-6.

**Hughes** BW, King SA, Allan PW, Parker WB, Sorscher EJ. Cell to cell contact is not required for bystander cell killing by *Escherichia coli* purine nucleoside phosphorylase. *J Biol Chem.* **1998**;273(4):2322-8.

**Hume** SP, Jones. Positron emission tomography (PET) methodology for small animals and its application in radiopharmaceutical preclinical investigation. *Nucl Med Biol.* **1998**;25(8):729-32.

**Humphreys** MJ, Greenhalf W, Neoptolemos JP, Ghaneh P. The potential for gene therapy in pancreatic cancer. *Int J Pancreatol.* **1999**;26(1):5-21.

**Ibrahim** SM, Ringel J, Schmidt C, Ringel B, Muller P, Koczan D, Thiesen HJ, Lohr M. Pancreatic adenocarcinoma cell lines show variable susceptibility to TRAIL-mediated cell death. *Pancreas.* **2001**;23(1):72-9.

**Ichikawa** T, Tamiya T, Adachi Y, Ono Y, Matsumoto K, Furuta T, Yoshida Y, Hamada H, Ohmoto T. In vivo efficacy and toxicity of 5-fluorocytosine/cytosine deaminase gene therapy for malignant gliomas mediated by adenovirus. *Cancer Gene Ther.* **2000**;7(1):74-82.

**Igney** FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* **2002**;2(4):277-88.

**Inouye** S, Tsuji FI. Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett.* **1994**;341(2-3):277-80.

**Jansen** B, Wacheck V, Heere-Ress E, Schlagbauer-Wadl H, Hoeller C, Lucas T, Hoermann M, Hollenstein U, Wolff K, Pehamberger H. Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy. *Lancet.* **2000**;356(9243):1728-33.

**Kagawa** S, He C, Gu J, Koch P, Rha SJ, Roth JA, Curley SA, Stephens LC, Fang B. Antitumor activity and bystander effects of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gene. *Cancer Res.* **2001**;61(8):3330-8.

**Kagawa** S, Gu J, Swisher SG, Ji L, Roth JA, Lai D, Stephens LC, Fang B. Antitumor effect of adenovirus-mediated Bax gene transfer on p53-sensitive and p53-resistant cancer lines. *Cancer Res.* **2000**;60(5):1157-61.

**Kalady** MF, Onaitis MW, Emani S, Abdul-Wahab Z, Pruitt SK, Tyler DS. Dendritic cells pulsed with pancreatic cancer total tumor RNA generate specific antipancreatic cancer T cells. *J Gastrointest Surg.* **2004**;8(2):175-81; discussion 181-2.

**Kaliberov** SA, Buchsbaum DJ, Gillespie GY, Curiel DT, Arafat WO, Carpenter M, Stackhouse MA. Adenovirus-mediated transfer of BAX driven by the vascular endothelial growth factor promoter induces apoptosis in lung cancer cells. *Mol Ther.* **2002**;6(2):190-8.

**Kalthoff** H, Schmiegel W, Roeder C, Kasche D, Schmidt A, Lauer G, Thiele HG, Honold G, Pantel K, Riethmuller G, et al. P53 and K-RAS alterations in pancreatic epithelial cell lesions. *Oncogene.* **1993**;8(2):289-98.

**Kamb** A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitigian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science.* **1994**;264(5157):436-40.

**Kanai** F, Kawakami T, Hamada H, Sadata A, Yoshida Y, Tanaka T, Ohashi M, Tateishi K, Shiratori Y, Omata M. Adenovirus-mediated transduction of *Escherichia coli* uracil phosphoribosyltransferase gene sensitizes cancer cells to low concentrations of 5-fluorouracil. *Cancer Res.* **1998**;58(9):1946-51.

**Kandasamy** K, Srinivasula SM, Alnemri ES, Thompson CB, Korsmeyer SJ, Bryant JL, Srivastava RK. Involvement of proapoptotic molecules Bax and Bak in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced mitochondrial disruption and apoptosis:

- differential regulation of cytochrome c and Smac/DIABLO release. *Cancer Res.* **2003**;63(7):1712-21.
- Kaneko Y**, Tsukamoto A. Gene therapy of hepatoma: bystander effects and non-apoptotic cell death induced by thymidine kinase and ganciclovir. *Cancer Lett.* **1995**;96(1):105-10.
- Kanerva A**, Hemminki A. Modified adenoviruses for cancer gene therapy. *Int J Cancer.* **2004**;110(4):475-80.
- Karmali PP**, Kumar VV, Chaudhuri A. Design, syntheses and in vitro gene delivery efficacies of novel mono-, di- and trilysinated cationic lipids: a structure-activity investigation. *J Med Chem.* **2004**;47(8):2123-32.
- Kasuya H**, Mizuno M, Yoshida J, Nishiyama Y, Nomoto S, Nakao A. Combined effects of adeno-associated virus vector and a herpes simplex virus mutant as neoplastic therapy. *J Surg Oncol.* **2000**;74(3):214-8.
- Kasuya H**, Takeda S, Nomoto S, Nakao A. The potential of oncolytic virus therapy for pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther.* **2005**;12(9):725-36.
- Katz MH**, Takimoto S, Spivack D, Moossa AR, Hoffman RM, Bouvet M. A novel red fluorescent protein orthotopic pancreatic cancer model for the preclinical evaluation of chemotherapeutics. *J Surg Res.* **2003**;113(1):151-60.
- Kaufmann SH**, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res.* **2000**;256(1):42-9.
- Kawashima T**, Kagawa S, Kobayashi N, Shirakiya Y, Umeoka T, Teraishi F, Taki M, Kyo S, Tanaka N, Fujiwara T. Telomerase-specific replication-selective virotherapy for human cancer. *Clin Cancer Res.* **2004**;10(1 Pt 1):285-92.
- Kawamura K**, Tasaki K, Hamada H, Takenaga K, Sakiyama S, Tagawa M. Expression of Escherichia coli uracil phosphoribosyltransferase gene in murine colon carcinoma cells augments the antitumoral effect of 5-fluorouracil and induces protective immunity. *Cancer Gene Ther.* **2000**;7(4):637-43.
- Keane MM**, Ettenberg SA, Nau MM, Russell EK, Lipkowitz S. Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Res.* **1999**;59(3):734-41.
- Kern SE**. Advances from genetic clues in pancreatic cancer. *Curr Opin Oncol.* **1998**;10(1):74-80.
- Khil MS**, Kim JH, Mullen CA, Kkim SH, Freytag SO. Radiosensitization by 5-fluorocytosine of human colorectal carcinoma cells in culture transduced cytosine deaminase gene. *Clin Cancer Res.* **1996**;2:53-57.
- Kichler A**, Leborgne C, Coeytaux E, Danos O. Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J Gene Med.* **2001**;3(2):135-44.
- Kievit E**, Bershad E, Ng E, Sethna P, Dev I, Lawrence TS, Rehemtulla A. Superiority of yeast over bacterial cytosine deaminase for enzyme/prodrug gene therapy in colon cancer xenografts. *Cancer Res.* **1999**;59(7):1417-21.
- Kijima T**, Osaki T, Nishino K, Kumagai T, Funakoshi T, Goto H, Tachibana I, Tanio Y, Kishimoto T. Application of the Cre recombinase/loxP system further enhances antitumor effects in cell type-specific gene therapy against carcinoembryonic antigen-producing cancer. *Cancer Res.* **1999**;59(19):4906-11.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 1994;266(5193):2011-5.
- Kim SH**, Kim S, Robbins PD. Retroviral vectors. *Adv Virus Res.* **2000**;55:545-63.
- Kim R**, Emi M, Tanabe K, Toge T. Therapeutic potential of antisense Bcl-2 as a chemosensitizer for cancer therapy. *Cancer.* **2004**;101(11):2491-502.
- Kim YS**, Gum J Jr, Brockhausen I. Mucin glycoproteins in neoplasia. *Glycoconj J.* **1996**;13(5):693-707.
- Kirchis R**, Kichler A, Wallner G, Kursa M, Ogris M, Felzmann T, Buchberger M, Wagner E. Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther.* **1997**;4(5):409-18.

**Kobayashi S**, Shirasawa H, Sashiyama H, Kawahira H, Kaneko K, Asano T, Ochiai T. P16INK4a expression adenovirus vector to suppress pancreas cancer cell proliferation. *Clin Cancer Res.* **1999**;5(12):4182-5.

**Koch PE**, Guo ZS, Kagawa S, Gu J, Roth JA, Fang B. Augmenting transgene expression from carcinoembryonic antigen (CEA) promoter via a GAL4 gene regulatory system. *Mol Ther.* **2001**;3(3):278-83.

**Korc M**. Role of growth factors in pancreatic cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* **1998**;7(1):25-41.

**Kouraklis G**. Progress in cancer gene therapy. *Acta Oncol.* **1999**;38(6):675-83.

**Koyama F**, Sawada H, Fuji H, Hamada H, Hirao T, Ueno M, Nakano H. Adenoviral-mediated transfer of Escherichia coli uracil phosphoribosyltransferase (UPRT) gene to modulate the sensitivity of the human colon cancer cells to 5-fluorouracil. *Eur J Cancer.* **2000**;36(18):2403-10.

**Kuhnel F**, Fritsch C, Krause S, Mundt B, Wirth T, Paul Y, Malek NP, Zender L, Manns MP, Kubicka S. Doxycycline regulation in a single retroviral vector by an autoregulatory loop facilitates controlled gene expression in liver cells. *Nucleic Acids Res.* **2004**;32(3):e30.

**Kuriyama S**, Mitoro A, Yamazaki M, Tsujinoue H, Nakatani T, Akahane T, Toyokawa Y, Kojima H, Okamoto S, Fukui H. Comparison of gene therapy with the herpes simplex virus thymidine kinase gene and the bacterial cytosine deaminase gene for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Scand J Gastroenterol.* **1999**;34(10):1033-41.

**Lang FF**, Yung WK, Raju U, Libunao F, Terry NH, Tofilon PJ. Enhancement of radiosensitivity of wild-type p53 human glioma cells by adenovirus-mediated delivery of the p53 gene. *J Neurosurg.* **1998**;89(1):125-32.

**Lawrence TS**, Rehemtulla A, Ng EY, Wilson M, Trosko JE, Stetson PL. Preferential cytotoxicity of cells transduced with cytosine deaminase compared to bystander cells after treatment with 5-fluorocytosine. *Cancer Res.* **1998**;58(12):2588-93.

**Lecocq M**, Wattiaux-De Coninck S, Laurent N, Wattiaux R, Jadot M. Uptake and intracellular fate of polyethylenimine in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* **2000**;278(2):414-8.

**Legrand C**, Rommelaere J, Caillet-Fauquet P. MVM(p) NS-2 protein expression is required with NS-1 for maximal cytotoxicity in human transformed cells. *Virology.* **1993**;195(1):149-55.

**Levine EL**, Renehan A, Gossiel R, Davidson SE, Roberts SA, Chadwick C, Wilks DP, Potten CS, Hendry JH, Hunter RD, et al. Apoptosis, intrinsic radiosensitivity and prediction of radiotherapy response in cervical carcinoma. *Radiother Oncol.* **1995**;37(1):1-9.

**Li S**, Tseng WC, Stolz DB, Wu SP, Watkins SC, Huang L. Dynamic changes in the characteristics of cationic lipidic vectors after exposure to mouse serum: implications for intravenous lipofection. *Gene Ther.* **1999**;6(4):585-94.

**Li X**, Marani M, Yu J, Nan B, Roth JA, Kagawa S, Fang B, Denner L, Marcelli M. Adenovirus-mediated Bax overexpression for the induction of therapeutic apoptosis in prostate cancer. *Cancer Res.* **2001**;61(1):186-91.

**Lienard D**, Ewalenko P, Delmotte JJ, Renard N, Lejeune FJ. High-dose recombinant tumor necrosis factor alpha in combination with interferon gamma and melphalan in isolation perfusion of the limbs for melanoma and sarcoma. *J Clin Oncol.* **1992**;10(1):52-60.

**Lin Y**, Weissleder R, Tung CH. Novel near-infrared cyanine fluorochromes: synthesis, properties, and bioconjugation. *Bioconjug Chem.* **2002**;13(3):605-10.

**Lin T**, Huang X, Gu J, Zhang L, Roth JA, Xiong M, Curley SA, Yu Y, Hunt KK, Fang B. Long-term tumor-free survival from treatment with the GFP-TRAIL fusion gene expressed from the hTERT promoter in breast cancer cells. *Oncogene.* **2002**;21(52):8020-8.

**Lin T**, Zhang L, Davis J, Gu J, Nishizaki M, Ji L, Roth JA, Xiong M, Fang B. Combination of TRAIL gene therapy and chemotherapy enhances antitumor and antimetastasis effects in chemosensitive and chemoresistant breast cancers. *Mol Ther.* **2003**;8(3):441-8.

**Liu J**, Zou WG, Lang MF, Luo J, Sun LY, Wang XN, Qian QJ, Liu XY. Cancer-specific killing by the CD suicide gene using the human telomerase reverse transcriptase promoter. *Int J Oncol.* **2002**;21(3):661-6.

**Liu Q, Yan YX, McClure M, Nakagawa H, Fujimura F, Rustgi AK.** MTS-1 (CDKN2) tumor suppressor gene deletions are a frequent event in esophagus squamous cancer and pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Oncogene*. **1995**;10(3):619-22.

**Longley DB, Johnston PG.** Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*. **2005**;205(2):275-92.

**Longnecker DS, Terhune PG.** What is the true rate of K-ras mutation in carcinoma of the pancreas? *Pancreas*. **1998**;17(4):323-4.

**Lohr M, Friess H.** Pancreatic cancer: molecular and clinical science. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. **1996**;8(1):89-91.

**Lozier JN, Metzger ME, Donahue RE, Morgan RA.** Adenovirus-mediated expression of human coagulation factor IX in the rhesus macaque is associated with dose-limiting toxicity. *Blood*. **1999**;94(12):3968-75.

**Macleod KF, Jacks T.** Insights into cancer from transgenic mouse models. *J Pathol*. **1999**;187(1):43-60.

**Makinen K, Loimas S, Wahlfors J, Alhava E, Janne J.** Evaluation of herpes simplex thymidine kinase mediated gene therapy in experimental pancreatic cancer. *J Gene Med*. **2000**;2(5):361-7.

**Makin G, Dive C.** Apoptosis and cancer chemotherapy. *Trends Cell Biol*. **2001**;11(11):S22-6.

**Markowitz D, Goff S, Bank A.** Construction of a safe and efficient retrovirus packaging cell line. *Adv Exp Med Biol*. **1988**;241:35-40.

**Martin B, Sainlos M, Aissaoui A, Oudrhiri N, Hauchecorne M, Vigneron JP, Lehn JM, Lehn P.** The design of cationic lipids for gene delivery. *Curr Pharm Des*. **2005**;11(3):375-94.

**Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML, Lukyanov SA.** Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol*. **1999**;17(10):969-73.

**McGinn CJ, Kinsella TJ.** The clinical rationale for s-phase radiosensitization in human tumors. *Curr Probl Cancer*. **1993**;17:273-321.

**McMasters RA, Saylor RL, Jones KE, Hendrix ME, Moyer MP, Drake RR.** Lack of bystander killing in herpes simplex virus thymidine kinase-transduced colon cell lines due to deficient connexin43 gap junction formation. *Hum Gene Ther*. **1998**;9(15):2253-61.

**Melcher A, Todryk S, Hardwick N, Ford M, Jacobson M, Vile RG.** Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression. *Nat Med*. **1998**;4(5):581-7.

**Mena I, Fischer C, Gebhard JR, Perry CM, Harkins S, Whitton JL.** Coxsackievirus infection of the pancreas: evaluation of receptor expression, pathogenesis, and immunopathology. *Virology*. **2000**;271(2):276-88.

**Mesnil M, Piccoli C, Tiraby G, Willecke K, Yamasaki H.** Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1996**;93(5):1831-5.

**Mesnil M, Yamasaki H.** Bystander effect in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy: role of gap-junctional intercellular communication. *Cancer Res*. **2000**;60(15):3989-99.

**Mesri M, Wall NR, Li J, Kim RW, Altieri DC.** Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. *J Clin Invest*. **2001**;108(7):981-90.

**Moolten FL.** Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res*. **1986**;46(10):5276-81.

**Mullen CA.** Metabolic suicide genes in gene therapy. *Pharmacol Ther*. **1994**;63(2):199-207.

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

**Nakamura A, Horinouchi M, Goto M, Nagata K, Sakoda K, Takao S, Imai K, Kim YS, Sato E, Yonezawa S.** New classification of pancreatic intraductal papillary-mucinous tumour by mucin expression: its relationship with potential for malignancy. *Pathol*. **2002**;197(2):201-10.

- Neuman MR.** Physical and chemical sensors for medical instrumentation. *Med Prog Technol.* **1982**;9(2-3):95-104.
- Nguyen T, Zhang XD, Hersey P.** Relative resistance of fresh isolates of melanoma to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis. *Clin Cancer Res.* **2001**;3(Suppl):966s-973s.
- Nicholson, D.W.** From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* **2000**;407, 810-816.
- Niculescu-Duvaz I, Spooner R, Marais R, Springer CJ.** Gene-directed enzyme prodrug therapy. *Bioconjug Chem.* **1998**;9(1):4-22.
- Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA.** Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. : *Nature.* **1994**;368(6473):753-6.
- Nowell PC.** Diagnostic and prognostic value of chromosome studies in cancer. *Ann Clin Lab Sci.* **1974**;4(4):234-40.
- Ntziachristos V, Weissleder R.** Charge-coupled-device based scanner for tomography of fluorescent near-infrared probes in turbid media. *Med Phys.* **2002**;29(5):803-9.
- Ogura E, Senzaki H, Yamamoto D, Yoshida R, Takada H, Hioki K, Tsubura A.** Prognostic significance of Bcl-2, Bcl-xL/S, Bax and Bak expressions in colorectal carcinomas. *Oncol Rep.* **1999**;6(2):365-9.
- Okegawa T, Pong RC, Li Y, Bergelson JM, Sagalowsky AI, Hsieh JT.** The mechanism of the growth-inhibitory effect of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) on human bladder cancer: a functional analysis of car protein structure. *Cancer Res.* **2001**;61(17):6592-600.
- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE.** The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* **2000**;19(13):3159-67.
- Olijslagers S, Dege AY, Dinsart C, Voorhoeve M, Rommelaere J, Noteborn MH, Cornelis JJ.** Potentiation of a recombinant oncolytic parvovirus by expression of Apoptin. *Cancer Gene Ther.* **2001**;8(12):958-65.
- Oligino T, Poliani PL, Marconi P, Bender MA, Schmidt MC, Fink DJ, Glorioso JC.** In vivo transgene activation from an HSV-based gene therapy vector by GAL4:vp16. *Gene Ther.* **1996**;3(10):892-9.
- Oren M.** Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ.* **2003**;10(4):431-42.
- Ozawa F, Friess H, Kleeff J, Xu ZW, Zimmermann A, Sheikh MS, Buchler MW.** Effects and expression of TRAIL and its apoptosis-promoting receptors in human pancreatic cancer. *Cancer Lett.* **2001**;163(1):71-81.
- Ozcelik H, Schmocker B, Di Nicola N, Shi XH, Langer B, Moore M, Taylor BR, Narod SA, Darlington G, Andrulis IL, Gallinger S, Redston M.** Germline BRCA2 6174delT mutations in Ashkenazi Jewish pancreatic cancer patients. *Nat Genet.* **1997**;16(1):17-8.
- Palu G, Cavaggioni A, Calvi P, Franchin E, Pizzato M, Boschetto R, Parolin C, Chilosi M, Ferrini S, Zanusso A, Colombo F.** Gene therapy of glioblastoma multiforme via combined expression of suicide and cytokine genes: a pilot study in humans. *Gene Ther.* **1999**;6(3):330-7.
- Parker WB, King SA, Allan PW, Bennett LL Jr, Secrist JA 3rd, Montgomery JA, Gilbert KS, Waud WR, Wells AH, Gillespie GY, Sorscher EJ.** In vivo gene therapy of cancer with *E. coli* purine nucleoside phosphorylase. *Hum Gene Ther.* **1997**;8(14):1637-44.
- Parker WB, Allan PW, Hassan AE, Secrist JA 3rd, Sorscher EJ, Waud WR.** Antitumor activity of 2-fluoro-2'-deoxyadenosine against tumors that express *Escherichia coli* purine nucleoside phosphorylase. *Cancer Gene Ther.* **2003**;10(1):23-9.
- Pellegata NS, Sessa F, Renault B, Bonato M, Leone BE, Solcia E, Ranzani GN.** K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer Res.* **1994**;54(6):1556-60.
- Peng L, Sidner RA, Bochan MR, Burton MM, Cooper ST, Jindal RM.** Construction of recombinant adeno-associated virus vector containing the rat preproinsulin II gene. *J Surg Res.* **1997**;69(1):193-8.
- Peters GJ, Schornagel JH, Milano GA.** Clinical pharmacokinetics of anti-metabolites. *Cancer Surv.* **1993**;17:123-56.

**Peterson RS**, Andhare RA, Rousche KT, Knudson W, Wang W, Grossfield JB, Thomas RO, Hollingsworth RE, Knudson CB. CD44 modulates Smad1 activation in the BMP-7 signaling pathway. *J Cell Biol.* **2004**;166(7):1081-91.

**Pierrefite-Carle V**, Baque P, Gavelli A, Mala M, Chazal M, Gugenheim J, Bourgeon A, Milano G, Staccini P, Rossi B. Cytosine deaminase/5-fluorocytosine-based vaccination against liver tumors: evidence of distant bystander effect. *J Natl Cancer Inst.* **1999**;91(23):2014-9.

**Pirocanac EC**, Nassirpour R, Yang M, Wang J, Nardin SR, Gu J, Fang B, Moossa AR, Hoffman RM, Bouvet M. Bax-induction gene therapy of pancreatic cancer. *Surg Res.* **2002**;106(2):346-51.

**Pitts JD**, Sloboda RD, Dragnev KH, Dmitrovsky E, Mycek MA. Autofluorescence characteristics of immortalized and carcinogen-transformed human bronchial epithelial cells. *J Biomed Opt.* **2001**;6(1):31-40.

**Pizzato M**, Franchin E, Calvi P, Boschetto R, Colombo M, Ferrini S, Palu G. Production and characterization of a bicistronic Moloney-based retroviral vector expressing human interleukin 2 and herpes simplex virus thymidine kinase for gene therapy of cancer. *Gene Ther.* **1998**;5(7):1003-7.

**Ploux L**, Mastrippolito R. In vivo radiolabel quantification in small-animal models. *Nucl Med Biol.* **1998**;25(8):737-42.

**Plunkett W**, Huang P, Searcy CE, Gandhi V. Gemcitabine: preclinical pharmacology and mechanisms of action. *Semin Oncol.* **1996**;23(5 Suppl 10):3-15.

**Prasher DC**, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene.* **1992**;111(2):229-33.

**Rabitti PG**, Germano D. Pancreatic head mass: how can we treat it? Tumor: conservative treatment. *JOP.* **2000**;1(3 Suppl):162-70.

**Rancourt C**, Rogers BE, Sosnowski BA, Wang M, Piche A, Pierce GF, Alvarez RD, Siegal GP, Douglas JT, Curiel DT. Basic fibroblast growth factor enhancement of adenovirus-mediated delivery of the herpes simplex virus thymidine kinase gene results in augmented therapeutic benefit in a murine model of ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* **1998**;4(10):2455-61.

**Rehemtulla A**, Stegman LD, Cardozo SJ, Gupta S, Hall DE, Contag CH, Ross BD. Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging. *Neoplasia.* **2000**;2(6):491-5.

**Reid TR**, Freeman S, Post L, McCormick F, Sze DY. Effects of Onyx-015 among metastatic colorectal cancer patients that have failed prior treatment with 5-FU/leucovorin. *Cancer Gene Ther.* **2005**;12(8):673-81.

**Reed JC**. Mechanisms of apoptosis. *Am. J. pathol.* **2000**. 157: 1415-1430.

**Richards CA**, Austin EA, Huber BE. Transcriptional regulatory sequences of carcinoembryonic antigen: identification and use with cytosine deaminase for tumor-specific gene therapy. *Hum Gene Ther.* **1995**;6(7):881-93.

**Rogulsi KR**, Kim JH, Kim SH, Freytag SO. Glioma cells transduced with an *Escherichia coli* CD/HSV-1 TK fusion gene exhibit enhanced metabolic suicide and radiosensitivity. *Hum Gene Ther.* **1997**;8(1):73-85.

**Rols MP**, Delteil C, Golzio M, Dumond P, Cros S, Teissie J. In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat Biotechnol.* **1998**;16(2):168-71.

**Rosemurgy A**, Harris J, Langleben A, Casper E, Goode S, Rasmussen H. Marimastat in patients with advanced pancreatic cancer: a dose-finding study. *Am J Clin Oncol.* **1999**;22(3):247-52.

**Rosenfeld ME**, Vickers SM, Raben D, Wang M, Sampson L, Feng M, Jaffee E, Curiel DT. Pancreatic carcinoma cell killing via adenoviral mediated delivery of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Ann Surg.* **1997**;225(5):609-18; discussion 618-20.

**Roth JA**, Cristiano RJ. Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going? *J Natl Cancer Inst.* **1997**;89(1):21-39.

**Rougier P**, Adenis A, Ducreux M, de Forni M, Bonnetterre J, Dembak M, Clouet P, Lebecq A, Baille P, Lefresne-Soulas F, Blanc C, Armand JP. A phase II study: docetaxel as first-line chemotherapy for advanced pancreatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer.* **2000**;36(8):1016-25.

**Rozenblum E**, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* **1997**;57(9):1731-4.

**Rubin J**, Galanis E, Pitot HC, Richardson RL, Burch PA, Charboneau JW, Reading CC, Lewis BD, Stahl S, Akporiaye ET, Harris DT. Phase I study of immunotherapy of hepatic metastases of colorectal carcinoma by direct gene transfer of an allogeneic histocompatibility antigen, HLA-B7. *Gene Ther.* **1997**;4(5):419-25.

**Ruff J**, Wiesmann F, Hiller KH, Voll S, von Kienlin M, Bauer WR, Rommel E, Neubauer S, Haase A. Magnetic resonance microimaging for noninvasive quantification of myocardial function and mass in the mouse. *Magn Reson Med.* **1998**;40(1):43-8.

**Ruggeri BA**, Huang L, Wood M, Cheng JQ, Testa JR. Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Mol Carcinog.* **1998**;21(2):81-6.

**Russell SJ**, Brandenburger A, Flemming CL, Collins MK, Rommelaere J. Transformation-dependent expression of interleukin genes delivered by a recombinant parvovirus. *J Virol.* **1992**;66(5):2821-8.

**Sahmoun AE**, D'Agostino RA Jr, Bell RA, Schwenke DC. International variation in pancreatic cancer mortality for the period 1955-1998. *Eur J Epidemiol.* **2003**;18(8):801-16.

**Sakakura C**, Sweeney EA, Shirahama T, Igarashi Y, Hakomori S, Tsujimoto H, Imanishi T, Ohgaki M, Yamazaki J, Hagiwara A, Sawai, Yamaguchi T, Takahashi T. Overexpression of bax enhances the radiation sensitivity in human breast cancer cells. *Surg Today.* **1997**;27(1):90-3.

**Salvesen GS**, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2002**;3(6):401-10.

**Saravolac EG**, Ludkovski O, Skirrow R, Ossanlou M, Zhang YP, Giesbrecht C, Thompson J, Thomas S, Stark H, Cullis PR, Scherrer P. Encapsulation of plasmid DNA in stabilized plasmid-lipid particles composed of different cationic lipid concentration for optimal transfection activity. *J Drug Target.* **2000**;7(6):423-37.

**Scarpa A**, Capelli P, Mukai K, Zamboni G, Oda T, Iacono C, Hirohashi S. Pancreatic adenocarcinomas frequently show p53 gene mutations. *Am J Pathol.* **1993**;142(5):1534-43.

**Schmid RM**, Weidenbach H, Yamagushi H, Luhrs H, Liptay S, Adler G. Direct gene transfer into the rat pancreas using DNA-liposomes. *J Clin Invest.* **1998**;3(3):220-6.

**Schneider G**, Schmid RM. Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Mol Cancer.* **2003**;2(1):15.

**Schutte M**, Hruban RH, Geradts J, Maynard R, Hilgers W, Rabindran SK, Moskaluk CA, Hahn SA, Schwarte-Waldhoff I, Schmiegel W, Baylin SB, Kern SE, Herman JG. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res.* **1997**;57(15):3126-30.

**Schwartz-Waldhoff I**, Klein S, Blass-Kampmann S, Hintelmann A, Eilert, Dreschers S, Kalthoff, Hahn, Schmiegel W. DPC4/SMAD4 mediated tumor suppression of colon carcinoma cells is associated with reduced urokinase expression. *Oncogene.* **1999**;18(20):3152-8.

**Secrist JA**, Parker WB, Allan PW, Bennett LL Jr, Waud WR, Truss JW, Fowler AT, Montgomery JA, Ealick SE, Wells AH, Gillespie GY, Gadi VK, Sorscher EJ. Gene therapy of cancer: activation of nucleoside prodrugs with E. coli purine nucleoside phosphorylase. *Nucleosides Nucleotides.* **1999**;18(4-5):745-57.

**Shah K**, Tang Y, Breakefield X, Weissleder R. Real-time imaging of TRAIL-induced apoptosis of glioma tumors in vivo. *Oncogene.* **2003**;22(44):6865-72.

**Shay JW**, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer.* **1997**;33(5):787-91.

**Shangary S**, Johnson DE. Peptides derived from BH3 domains of Bcl-2 family members: a comparative analysis of inhibition of Bcl-2, Bcl-x(L) and Bax oligomerization, induction of cytochrome c release, and activation of cell death. *Biochemistry.* **2002**;41(30):9485-95.

**Shields JM**, Pruitt K, McFall A, Shaub A, Der CJ. Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol.* **2000**;10(4):147-54.

- Sherr** CJ. Cancer cell cycles. *Science*. **1996**;274(5293):1672-7.
- Singhal** S, Kaiser LR. Cancer chemotherapy using suicide genes. *Surg Oncol Clin N Am*. **1998**;7(3):505-36.
- Sklar** MD, Thompson E, Welsh MJ, Liebert M, Harney J, Grossman HB, Smith M, Prochownik EV. Depletion of c-myc with specific antisense sequences reverses the transformed phenotype in ras oncogene-transformed NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol*. **1991**;11(7):3699-710.
- Slawson** SE, Roman BB, Williams DS, Koretsky AP. Cardiac MRI of the normal and hypertrophied mouse heart. *Magn Reson Med*. **1998**;39(6):980-7.
- Smith** JP, Verderame MF, Zagon IS. Antisense oligonucleotides to gastrin inhibit growth of human pancreatic cancer. *Cancer Lett*. **1999**;135(1):107-12.
- Smisterova** J, Wagenaar A, Stuart MC, Polushkin E, ten Brinke G, Hulst R, Engberts JB, Hoekstra D. Molecular shape of the cationic lipid controls the structure of cationic lipid/dioleoylphosphatidylethanolamine-DNA complexes and the efficiency of gene delivery. *J Biol Chem*. **2001**;276(50):47615-22.
- Smyth** MJ, Takeda K, Hayakawa Y, Peschon JJ, van den Brink MR, Yagita H. Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy. *Immunity*. **2003**;18(1):1-6.2003
- Spibey** CA, Jackson P, Herick K. A unique charge-coupled device/xenon arc lamp based imaging system for the accurate detection and quantitation of multicolour fluorescence. *Electrophoresis*. **2001**;22(5):829-36.
- Spitz** FR, Abbruzzese JL, Lee JE, Pisters PW, Lowy AM, Fenoglio CJ, Cleary KR, Janjan NA, Goswitz MS, Rich TA, Evans DB. Preoperative and postoperative chemoradiation strategies in patients treated with pancreaticoduodenectomy for adenocarcinoma of the pancreas. *J Clin Oncol*. **1997**;15(3):928-37.
- Springer** CJ, Niculescu-Duvaz I. Prodrug-activating systems in suicide gene therapy. *J Clin Invest*. **2000** May;105(9):1161-7.
- Stackhouse** MA, Pederson LC, Grizzle WE, Curiel DT, Gebert J, Haack K, Vickers SM, Mayo MS, Buchsbaum DJ. Fractionated radiation therapy in combination with adenoviral delivery of the cytosine deaminase gene and 5-fluorocytosine enhances cytotoxic and antitumor effects in human colorectal and cholangiocarcinoma models. *Gene Ther*. **2000**;7(12):1019-26.
- Stopeck** AT, , Jones A, Hersh EM, Thompson JA, Finucane DM Gutheil JC, Gonzalez R. Phase II study of direct intralesional gene transfer of allovectin-7, an HLA-B7/beta2-microglobulin DNA-liposome complex, in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. **2001**;7(8):2285-91.
- Stribbling** SM, Friedlos, Martin J, Davies L, Spooner RA, Marais R, Springer CJ. Regressions of established breast carcinoma xenografts by carboxypeptidase G2 suicide gene therapy and the prodrug CMDA are due to a bystander effect. *Hum Gene Ther*. **2000**;11(2):285-92.
- Sweeney** TJ, Mailander V, Tucker AA, Olomu AB, Zhang W, Cao Y, Negrin RS, Contag CH. Visualizing the kinetics of tumor-cell clearance in living animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1999**;96(21):12044-9.
- Tai** YT, Strobel T, Kufe D, Cannistra SA. In vivo cytotoxicity of ovarian cancer cells through tumor-selective expression of the BAX gene. *Cancer Res*. **1999**;59(9):2121-6.
- Takimoto** CH, , Lu ZH, Zhang R, Liang MD, Larson LV, Cantilena LR Jr, Grem JL, Allegra CJ, Diasio RB, Chu E. Severe neurotoxicity following 5-fluorouracil-based chemotherapy in a patient with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Clin Cancer Res*. **1996**;2(3):477-81.
- Tanaka** M, Fraizer GC, De La Cerda J, Cristiano RJ, Liebert M, Grossman HB. Connexin 26 enhances the bystander effect in HSVtk/GCV gene therapy for human bladder cancer by adenovirus/PLL/DNA gene delivery. *Gene Ther*. **2001**;8(2):139-48.
- Taubes** G. Play of light opens a new window into the body. *Science*. **1997**;276(5321):1991-3.
- Taylor** JK, Zhang QQ, Wyatt JR, Dean NM. Induction of endogenous Bcl-xS through the control of Bcl-x pre-mRNA splicing by antisense oligonucleotides. *Nat Biotechnol*. **1999**;17(11):1097-100.
- Tepper** RI, Mule JJ. Experimental and clinical studies of cytokine gene-modified tumor cells. *Hum Gene Ther*. **1994**;5(2):153-64.

**Themis M**, Forbes SJ, Chan L, Cooper RG, Etheridge CJ, Miller AD, Hodgson HJ, Coutelle C. Enhanced in vitro and in vivo gene delivery using cationic agent complexed retrovirus vectors. *Gene Ther.* **1998**;5(9):1180-6.

**Topf N**, Worgall NR, Hachette NR, Crystal RG. Regional "pro-drug" gene therapy: intravenous administration of an adenoviral vector expressing the E.Coli cytosine deaminase gene and systemic administration of 5-fluorocytosine suppresses growth of hepatic metastasis of colon carcinoma. *Gene Ther.* **1998**;5(4):507-13.

**Trinchieri G**. Interleukin-12 and interferon-gamma. Do they always go together? *Am J Pathol.* **1995**;147(6):1534-8.

**Tsien RY**. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem.* **1998**;67:509-44.

**Tsong TY**. Electroporation of cell membranes. *Biophys J.* **1991**;60(2):297-306.

**Tsuruo T**. Drug resistant gene, resistant protein and their implication for therapy. *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi.* **1988**;51(8):1327-31.

**Tsuruo T**, Naito M, Tomida A, Fujita N, Mashima T, Sakamoto H, Haga N. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Sci.* **2003**;94(1):15-21.

**Turnbull JM**. The rational clinical examination. Is listening for abdominal bruits useful in the evaluation of hypertension? *JAMA.* **1995**;274(16):1299-301.

**Uckert W**, Kammertons T, Haack K, Qin Z, Gebert J, Schendel DJ, Blankenstein T. Double suicide gene (cytosine deaminase and herpes simplex virus thymidine kinase) but not single gene transfer allows reliable elimination of tumor cells in vivo. *Hum Gene Ther.* **1998**;9(6):855-65.

**Van der Eb MM**, Cramer SJ, Vergouwe Y, Schagen FH, van Krieken JH, van der Eb AJ, Borel Rinkes IH, van de Velde CJ, Hoeben RC. Severe hepatic dysfunction after adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir administration. *Gene Ther.* **1998**;5(4):451-8.

**Van Dyke T**, Jacks T. Cancer modeling in the modern era: progress and challenges. *Cell.* **2002**;108(2):135-44.

**Van Riel JM**, van Groeningen CJ, Pinedo HM, Giaccone G. Current chemotherapeutic possibilities in pancreaticobiliary cancer. *Ann Oncol.* **1999**;10 Suppl 4:157-61.

**Venkitaraman AR**. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell.* **2002**;108(2):171-82.

**Verhagen AM**, Vaux DL. Molecular mechanisms of apoptosis: an overview. *Results Probl Cell Differ.* **1999**;23:11-24.

**Verma IM**, Somia N. Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature.* **1997**;389(6648):239-42.

**Vile RG**, Hart IR. In vitro and in vivo targeting of gene expression to melanoma cells. *Cancer Res.* **1993**;53(5):962-7.

**Vile RG**, Castleden S, Marshall J, Camplejohn R, Upton C, Chong H. Generation of an anti-tumour immune response in a non-immunogenic tumour: HSVtk killing in vivo stimulates a mononuclear cell infiltrate and a Th1-like profile of intratumoural cytokine expression. *Int J Cancer.* **1997**;71(2):267-74.

**Voelkel-Johnson C**, King DL, Norris JS. Resistance of prostate cancer cells to soluble TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo2L) can be overcome by doxorubicin or adenoviral delivery of full-length TRAIL. *Cancer Gene Ther.* **2002**;9(2):164-72.

**Walczak H**, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med.* **1999**;5(2):157-63.

**Warsham AL**, Fernandez-del Castillo C. Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med.* **1992**;326(7):455-65.

**Waters J.S.** Phase clinical and pharmacokinetic study of BCL-2 antisense oligonucleotide therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin.Oncol.* **2000**;18. 1812-1823.

**Wei MX**, Tamiya T, Rhee RJ, Breakefield XO, Chiocca EA. Diffusible cytotoxic metabolites contribute to the in vitro bystander effect associated with the cyclophosphamide/cytochrome P450 2B1 cancer gene therapy paradigm. *Clin Cancer Res.* **1995**;1(10):1171-7.

**Wei SJ**, Chao Y, Shih YL, Yang DM, Hung YM, Yang WK. Involvement of Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand in apoptosis induced by ganciclovir treatment of tumor cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase. *Gene Ther.* **1999**;6(3):420-31.

**Weinberg RA**. Oncogenes and the molecular basis of cancer. *Harvey Lect.* **1984-85**;80:129-36.

**Weissleder R**, Ntziachristos V. Shedding light onto live molecular targets. *Nat Med.* **2003**;9(1):123-8.

**Weissleder R**, Tung CH, Mahmood U, Bogdanov A Jr. In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes. *Nat Biotechnol.* **1999**;17(4):375-8.

**Wesseling JG**, Yamamoto M, Adachi Y, Bosma PJ, van Wijland M, Blackwell JL, Li H, Reynolds PN, Dmitriev I, Vickers SM, Huibregtse K, Curiel DT. Midkine and cyclooxygenase-2 promoters are promising for adenoviral vector gene delivery of pancreatic carcinoma. *Cancer Gene Ther.* **2001**;8(12):990-6.

**Whittington R**, Bryer MP, Haller DG, Solin LJ, Rosato EF. Adjuvant therapy of resected adenocarcinoma of the pancreas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **1991**;21(5):1137-43.

**Wickham TJ**, Tzeng E, Shears LL 2nd, Roelvink PW, Li Y, Lee GM, Brough DE, Lizonova A, Kovesdi I. Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J Virol.* **1997**;71(11):8221-9.

**Wightman L**, Kircheis R, Rossler V, Carotta S, Ruzicka R, Kursa M, Wagner E. Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *Gene Med.* **2001**;3(4):362-72.

**Wilentz RE**, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res.* **2000**;60(7):2002-6.

**Wood K.V.**, Marker proteins for gene expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1995**;6, pp. 50-58.

**Xia J**, Xia K, Feng Y, Tang A, Tang Y, Wu L, Liang D, Cai F, Pan Q, Long Z, Dai H, Zhang Y, Zhao S, Chen Z. The combination of suicide gene therapy and radiation enhances the killing of nasopharyngeal carcinoma xenographs. *J Radiat Res (Tokyo).* **2004**;45(2):281-9.

**Xu ZW**, Friess H, Buchler MW, Solioz M. Overexpression of Bax sensitizes human pancreatic cancer cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Chemother Pharmacol.* **2002**;49(6):504-10.

**Yamaguchi Y**, Ohshita A, Kawabuchi Y, Ohta K, Shimizu K, Minami K, Hihara J, Miyahara E, Toge T. Adoptive immunotherapy of cancer using activated autologous lymphocytes--current status and new strategies. *Hum Cell.* **2003**;16(4):183-9.

**Yamamoto S**, Suzuki S, Hoshino A, Akimoto M, Shimada T. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated killing of tumor cell induces tumor-specific cytotoxic T cells in mice. *Cancer Gene Ther.* **1997**;4(2):91-6.

**Yamanaka Y**, Friess H, Kobrin MS, Buchler M, Kunz J, Beger HG, Korc M. Overexpression of HER2/neu oncogene in human pancreatic carcinoma. *Hum Pathol.* **1993** Oct;24(10):1127-34.

**Yang L**, Hwang R, Pandit L, Gordon EM, Anderson WF, Parekh D. Gene therapy of metastatic pancreas cancer with intraperitoneal injections of concentrated retroviral herpes simplex thymidine kinase vector supernatant and ganciclovir. *Ann Surg.* **1996** Sep;224(3):405-14; discussion 414-7.

**Yang M**, Baranov E, Li XM, Wang JW, Jiang P, Li L, Moossa AR, Penman S, Hoffman RM. Whole-body and intravital optical imaging of angiogenesis in orthotopically implanted tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2001**;98(5):2616-21.

**Yang M**, Baranov E, Wang JW, Jiang P, Wang X, Sun FX, Bouvet M, Moossa AR, Penman S, Hoffman RM. Direct external imaging of nascent cancer, tumor progression, angiogenesis, and metastasis on internal organs in the fluorescent orthotopic model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2002**;99(6):3824-9.

**Yang M, Li L, Jiang P, Moossa AR, Penman S, Hoffman RM.** Dual-color fluorescence imaging distinguishes tumor cells from induced host angiogenic vessels and stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2003**;100(24):14259-62.

**Yee D, McGuire SE, Brunner N, Kozelsky TW, Allred DC, Chen SH, Woo SL.** Adenovirus-mediated gene transfer of herpes simplex virus thymidine kinase in an ascites model of human breast cancer. *Hum Gene Ther.* **1996**;7(10):1251-7.

**Yeo CJ.** Pancreatic cancer: 1998 update. *J Am Coll Surg.* **1998**;187(4):429-42.

**Zerbi A, Fossati V, Parolini D, Carlucci M, Balzano G, Bordogna G, Staudacher C, Di Carlo V.** Intraoperative radiation therapy adjuvant to resection in the treatment of pancreatic cancer. *Cancer.* **1994**;73(12):2930-5.

**Zhang YQ, Rodesch CK, Broadie K.** Living synaptic vesicle marker: synaptotagmin-GFP. *Genesis.* **2002**;34(1-2):142-5.

**Zhao L, Gu J, Dong A, Zhang Y, Zhong L, He L, Wang Y, Zhang J, Zhang Z, Huiwang J, Qian Q, Qian C, Liu X.** Potent Antitumor Activity of Oncolytic Adenovirus Expressing mda-7/IL-24 for Colorectal Cancer. *Hum Gene Ther.* **2005**;16(7):845-58.

**Zhou S, Buckhaults P, Zawel L, Bunz F, Riggins G, Dai JL, Kern SE, Kinzler KW, Vogelstein B.** Targeted deletion of Smad4 shows it is required for transforming growth factor beta and activin signaling in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1998**;95(5):2412-6.

**Zhu H, Zhang L, Huang X, Davis JJ, Jacob DA, Teraishi F, Chiao P, Fang B.** Overcoming acquired resistance to TRAIL by chemotherapeutic agents and calpain inhibitor I through distinct mechanisms. *Mol Ther.* **2004**;9(5):666-73.

**Zuber G, Dauty E, Nothisen M, Belguise P, Behr JP.** Towards synthetic viruses. *Adv Drug Deliv Rev.* **2001**;52(3):245-53.

**Zuidam NJ, Barenholz Y.** Electrostatic and structural properties of complexes involving plasmid DNA and cationic lipids commonly used for gene delivery. *Biochim Biophys Acta.* **1998**;1368(1):115-28.

*Liste des Publications et  
Communications*

## **Publications**

### **Au 8 novembre 2005**

#### **2005**

- Combination of TRAIL-Bax gene therapy and chemotherapy for treatment of pancreatic cancer. S. Wack, M. Aprahamian, A. Hajri. (en préparation).
- Suicide gene therapy of pancreatic adenocarcinoma in combination with chemotherapy using HSV-TK/GCV and E.Coli CD/5-FC with chemotherapeutic agents Tomudex and Gemcitabine. S. Wack, M. Aprahamian, A. Hajri. (en préparation).
- Transcriptional tumor-selective promoter targeting of E. coli purine nucleoside phosphorylase for pancreatic cancer suicide gene therapy. Deharvengt S, Wack S, Aprahamian M, Hajri A. J Gene Med. 2005;7(5):672-80.

#### **2004**

- Suicide gene prodrug therapy for pancreatic adenocarcinoma by *E.Coli* purine nucleoside phosphorylase and 6-methylpurine 2'-deoxyriboside. Deharvengt S., S.Wack, Uhring M., M.Aprahamian, A.Hajri. Pancreas. 2004;28(2):E54-64.
- Combined suicide gene therapy for pancreatic peritoneal carcinomatosis using BGTC liposomes. A.Hajri, S.Wack, P.Lehn, JP.Vigneron, JM.Lehn; M.Aprahamian. Cancer Gene Ther. 2004;11(1):16-27.

#### **2003**

- Feasability, sensitivity and reliability of laser-induced fluorescence imaging of green fluorescent protein expressing tumors *in vivo*. S.Wack, A.Hajri, F.Heisel, J.Marescaux, M.Aprahamian. Mol Ther. 2003;7(6):765-73.

#### **2002**

- *In vivo* and *in vitro* efficacy of photofrin and pheophorbide A, a bacteriochlorin in photodynamic therapy of colonic cancer cells. A.Hajri, S.Wack, C.Meyer, M.K.Smith, C.Leberquier, M.Kedinger, M.Aprahamian. Photochemistry and Photobiology, 2002, 75 (2):140-148.

#### **2000**

- Dual effect of laparoscopy on cell-mediated immunity. A.Hajri, S.Wack, D.Mutter, C.Bastien, J.F.Gury, J.Marescaux, M.Aprahamian. Eur Surg Res. 2000;32(5):261-6.

#### **1999**

- Comparaison des effets de l'expression de deux gènes suicides, la cytosine déaminase et la thymidine kinase sur la croissance des cellules tumorales pancréatiques. A.Hajri, S.Wack, D.Mutter, J.Marescaux, M.Aprahamian. Gastro-Entérologie Clinique Biologie, 1999.
- Incidence d'une transfection de cellules cancéreuses pancréatiques par le gène de la cytosine déaminase sur la survie actuarielle : étude expérimentale chez le rat. A.Hajri, S.Wack, D.Mutter, J.Marescaux, M.Aprahamian. Gastro-Entérologie Clinique Biologie, 1999.

#### **1998**

- Photodynamic therapy of human pancreatic cancer: mechanisms of cellular damage. A.Hajri, S.Wack, J.Marescaux, M.Aprahamian. *Digestion*, 1998, 3, p: 222, 60a.

## Communications & Posters

### 2004

- Efficacité de gènes pro-apoptotiques Bax & TRAIL sur des modèles de cancer du pancréas. Visualisation par imagerie moléculaire. Club français du Pancréas 14-15 octobre 2004 Toulouse, France.

### 2003

- Etude du phénomène d'hypoxie sur des modèles de cancers du pancréas. A.Hajri, S.Wack, M.Aprahamian. Présentation au Club Français du Pancréas, 4-5 décembre 2003, Strasbourg.
- Combination of TRAIL and Bax gene therapy and chemotherapy for the treatment of pancreatic cancer. Présentation à l'European Pancreatic Club, 21-26 juin 2003, Padova, Italie.
  - Faisabilité, sensibilité et fiabilité d'un système d'imagerie de fluorescence induite par laser sur des tumeurs exprimant la green fluorescent protéin. Poster présenté au congrès de Biophotonique, 22 octobre 2003, Paris, France.

### 2002

- Autonomous parvovirusH1-mediated combination suicide and cytokine gene therapy for pancreatic adenocarcinome. *Pancreatology*, 2002, 2(3):217-361. Présentation à l'European Pancreatic Club, 19-22 juin 2002, Heidelberg, Allemagne.
- Gene therapy of experimental pancreatic adenocarcinoma models using transcriptional selective-promoter targeting of E.Coli Purine nucleoside phosphorylase suicide gene. S.Deharvengt, S.Wack, M.Aprahamian A.Hajri. *Pancreatology*, 2002, 2(3):217-361. Présentation à l'European Pancreatic Club, 19-22 juin 2002, Heidelberg, Allemagne.

### 2001

- La green fluorescent protein : une lumière pour le cancer du pancréas. A.Hajri, S.Wack, S.Deharvengt, M.Aprahamian. Présentation au Prix Jeune Chercheur de la Société Française des Lasers Médicaux, 12-14 janvier 2001, Arcs 1800, France.
- Efficient transfer of double suicide gene HSV-TK and *E.Coli* Cytosine deaminase into peritoneal pancreatic tumor cells by the cationic lipid "BGTC". A.Hajri, S.Wack, P.Lehn, JP.Vigneron, JM.Lehn; M.Aprahamian. *Molecular therapy* 3, A299, 2001 Poster pour le congrès de Thérapie génique, 5-8 juin 2001, Denver, Etats-Unis.
- Delivery of IL-12 by *in vivo* electroporation enhances suicide gene *E.Coli* Cytosine deaminase antitumor immune response. A.Hajri, S.Wack, S.Deharvengt, C.Nicolau, M.Aprahamian. *Molecular therapy* 3, A298, 2001. Poster présenté au congrès de Thérapie génique, 5-8 juin 2001, Denver (Etats-Unis) et à European Pancreatic Club, 13-16 juin 2001, Toulouse, France.
- Suicide gene therapy of pancreatic cancer with *E.Coli* purine nucleoside phosphorylase. A.Hajri, S.Wack, S.Deharvengt, M.Aprahamian. *Molecular therapy* 3, A297, 2001 & *Pancreatology*, 2001, 1:129-199. Présentation au Congrès de Thérapie génique, 5-8 juin 2001, Denver, Etats-Unis et à European Pancreatic Club, 13-16 juin 2001, Toulouse, France.

## 1999

- Incidence d'une transfection de cellules cancéreuses pancréatiques par le gène de la cytosine déaminase sur la survie actuarielle : étude expérimentale chez le rat. A.Hajri, S.Wack, D.Mutter, J.Marescaux, M.Aprahamian. *Clin. Biol.*,1999, 23, 1082. Présentation au Club Français du Pancréas, 21-22 octobre 1999, Opio, France.
- Comparaison des effets de l'expression de deux gènes suicides, la cytosine déaminase et la thymidine kinase sur la croissance des cellules tumorales pancréatiques. A.Hajri, S.Wack, D.Mutter, J.Marescaux, M.Aprahamian. *Clin. Biol.*,1999, 23, 1082. Présentation au Club Français du Pancréas, 21-22 octobre 1999, Opio, France.

## 1998

- Photodynamic therapy (PDT) of pancreatic cancer using pheophorbide A (Ph-a) and its mechanisms of cellular damage.A.Hajri, S.Wack, P.Schmitt, J.Marescaux, M.Aprahamian. Poster au 7<sup>e</sup> Biennal du congrès d'Association Internationale de Photodynamique, 7-9 juillet 1998, Nantes, France.
- Répercussions de la laparoscopie sur la dissémination du cancer pancréatique : étude expérimentale chez le rat. D.Mutter, A.Hajri, S.Wack, J.Marescaux, M.Aprahamian.gastroenterol. *Clin. Biol.*,1998, 22, 879. Présentation au Club Français du Pancréas, 15-17 octobre 1998, Saint-Malo, France.