

UNIVERSITE DE STRASBOURG
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse de doctorat

Discipline : Sciences du vivant
Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par

Anaïs ALTMEYER

Mort cellulaire induite par des radiations ionisantes dans des tumeurs humaines radiorésistantes : Etude, in vitro et in vivo, des mécanismes impliqués dans son induction par différents types de rayonnements et modulation pharmacologique

Directeur de thèse : **Dr. Pierre BISCHOFF**

Membres du jury

Dr. Jean-Pierre POUGET

Dr. Gérard LIZARD

Dr. Francis RAUL

Pr. Patrick DUFOUR

Dr. John GUEULETTE

Pr. Didier MUTTER

Dr. Pierre BISCHOFF

Rapporteur Externe

Rapporteur Externe

Examineur

Examineur

Examineur

Membre invité

Directeur de thèse

À mes parents

À Pépé Seppi

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements à tous les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Merci à Monsieur le Professeur Patrick DUFOUR, directeur du Centre de lutte contre le cancer Paul Strauss, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse, et à Messieurs les Docteurs Gérard LIZARD de l'Université de Bourgogne et Jean-Pierre POUGET de l'IRCM de Montpellier, d'avoir accepté d'être les rapporteurs externes de ce manuscrit.

Merci également à Monsieur le Docteur Francis RAUL de l'IRCAD de Strasbourg, et à Monsieur le Professeur John GUEULETTE de l'IMRE de Bruxelles, pour avoir accepté d'examiner mon mémoire et de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens aussi à adresser un grand merci à Monsieur le Professeur Georges NOËL, directeur de l'Equipe d'Accueil universitaire 3430 « Altérations génétiques des cancers et réponse à la radiothérapie » et chef du service de radiothérapie du Centre Paul Strauss de Strasbourg. Merci pour votre grande disponibilité tout au long de ma thèse, pour vos précieux conseils et votre soutien, y compris dans les moments les plus critiques de mon parcours. Vos grandes connaissances scientifiques et médicales ont rendu chaque réunion et discussion très enrichissantes.

Je souhaite également remercier mon directeur de thèse, le Docteur Pierre BISCHOFF, pour m'avoir acceptée au sein de son équipe. Merci à vous, pour m'avoir initiée à la recherche, et plus particulièrement à la radiobiologie - un domaine jusque là inconnu pour moi - et de m'avoir fait profiter d'expériences inoubliables. Merci pour votre gentillesse, votre patience et votre disponibilité. Je remercie également mon co-directeur de thèse, le Professeur Didier MUTTER, PU-PH aux hospices civils de l'Université de Strasbourg. Merci pour votre disponibilité - et ce malgré un emploi du temps très chargé - et pour vos mots réconfortants.

Merci à l'association alsacienne ATGC (Alsace Thérapie Génique et Cancer), la Région Alsace ainsi que le Centre Paul Strauss pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans de bonnes conditions financières.

Encore une fois, un grand merci à John GUEULETTE, notre éminent collègue belge et organiste virtuose (à quand notre prochain duo ?), mais également à Jean-Marc DENIS, notre physicien attiré et avec lequel nous avons partagé de nombreuses séances d'irradiation, au CRC de Louvain-la-Neuve et au GANIL de Caen, et ce toujours dans la bonne humeur !

Je tiens également à remercier Sami, alias Doc' Benzina, mon prédécesseur au sein du laboratoire. Merci pour avoir su me transmettre ton savoir, pour ton aide technique et tes nombreux conseils depuis mon arrivée dans l'équipe. J'ai énormément appris grâce à toi.

Merci à mes deux collègues chimistes avec lesquels j'ai eu la chance de travailler au cours de mes années de thèse, Antoine et Hélène. Antoine, alias Doc' Le Roux fraîchement diplômé, merci pour nos virées belges et « irradiantes » à Louvain-la-Neuve, tes blagues (pas toujours très légères mais souvent très drôles) et ta bonne humeur tout au long de ce parcours. Hélène, merci à toi pour ces bons moments passés ensemble, nos creusages de cervelle communs sur les sels de platine et les inhibiteurs de la PARP, mais également tes conseils, ton implication et ta profonde sympathie.

Je tiens aussi à présenter toute ma gratitude à ma chère Miha, jeune maman-chirurgienne, qui m'a initiée à l'expérimentation animale et a su me transmettre une petite partie de son grand savoir-faire. Merci pour ta patience et ta gentillesse. Je te souhaite plein de bonnes choses pour ta nouvelle carrière à Belfort.

Merci à toute l'équipe de Biologie Tumorale du Centre Paul Strauss. J'ai passé d'excellents moments en votre compagnie et ce dès mon arrivée au Centre. Vous allez me manquer.

Merci tout d'abord à Alain, mon enthousiaste et dynamique collègue de bureau, au rire inoubliable. Je te remercie pour ton aide, ton regard critique et éclairé ainsi que ta grande rigueur

scientifique mais également pour le partage de tes connaissances, tant scientifiques que touristiques (« Ah ? On est sur Broadway ?? »). Merci pour tous ces moments très « Val d'Oise »...

Merci à vous, les filles : Sylvie (notre chère et regrettée retraitée), Christine (pour ton aide et ta grande serviabilité), Sonia (merci Mlle Gestor, notamment pour la relecture du manuscrit et tes petites piques quotidiennes) et Lulu (« Sors ! Sors ! » et aussi pour tout ça, tout ça)...

Merci à Danièle et les « filles du 4^{ème} » Inès et Sarah, sans oublier notre conseiller économique et journaliste politique Michel, heureux retraité depuis quelques mois.

Merci à notre jeune radiothérapeute Sébastien, alias le fraîchement diplômé Dr Guihard, mais également aux Docteurs Joseph Abecassis, Jean-Pierre Ghnassia, Marc Wilt, tout le service d'anatomo-pathologie et de radiothérapie du Centre Paul Strauss.

Merci enfin à Bitterwolf, Cuir-man/La Crampe, Nespresso, Kansas, CÇC, Cosette, Thierry et Antonia et toutes autres sources de franche rigolade.

J'ai eu également la chance de faire de belles rencontres sur les bancs de la fac, au cours de mon parcours universitaire. Merci à mes deux « potes de galère », mes deux meilleurs amis, Sarah (rencontrée le 1^{er} jour de fac de médecine) et Joël (rencontré le 1^{er} jour de fac de bio). Comme quoi les premiers jours ont du bon.

Sarah, chère biloute, ma dentiste préférée, merci pour tous ces bons moments, ces longues soirées à discuter de tout et de rien (thèse MD vs thèse PhD), nos interrogations existentielles (ou pas), nos « pasta-parties » dignes des meilleurs restaurants italiens, nos vacances en Italie ou outre-Atlantique, nos traversées « musicales » de la Suisse (merci Muse !), ou encore nos « tours de psychopathes »... Merci pour ton amitié sincère mais également pour ta compréhension dans les moments de stress et de doute de la thèse (on se comprend ; « et le pire c'est que je le sais »).

Joël, mon cher thésard-globetrotteur, cauchemar des souriceaux outre-Rhin, roi de l'humour souple et délicat, fêru des chemins de fer et du trafic aérien ! Merci pour toutes ces années passées en ta compagnie mais également pour ton soutien sans faille dans les pires moments. Merci pour les nombreuses séances de révisions enneigées, les acides aminés (« Mét-Gly-Gly fait Leu », ça laisse des traces !), les cinés, les quiches au potiron, les parties de Trivial et de Pictionary à hurler de rire et les discussions géographiques (« la capitale de la Jamaïque ? » : « Joinville »). Merci d'être ce que tu es.

Merci à tous les deux, vous êtes la fratrie que je n'ai jamais eue. Merci également à Benoît, Laurent, Cécile et David.

Je tiens également à remercier les membres de ma famille : les Neufgrangeois, Bernard, Marion et Mémé Odette, ainsi qu'une pensée particulièrement émue pour mes proches à ce jour disparus. Mon cher Pépé Seppi, j'aurais tant voulu partager ce moment avec toi. Toi qui m'as toujours soutenue, j'espère qu'à ce jour tu seras fier de ta petite-fille « biologiste ». Merci à toi.

Maman et Papa, je vous adresse un immense merci pour tout ce que vous avez fait pour moi. Je vous dédie cette thèse, tout ce travail, qui, sans vous, n'aurait jamais vu le jour. Vous avez été ma force, mon soutien, mon courage durant toutes ces années. Merci pour vos sacrifices, pour votre fierté et pour avoir toujours cru en moi. Merci d'avoir supporté mes sautes d'humeur ces derniers temps et d'avoir subi indirectement le stress de la rédaction. Mille fois merci. Je vous aime.

(Une petite pensée également à mon compagnon poilu et ronronneur, mon fauve de canapé : Casimir, un sévère concurrent en matière d'expérimentation sur souris)

Table des matières

Table des matières

Liste des abréviations	1
Avant-propos	5
INTRODUCTION	9
Chapitre I : Radiosensibilisation	10
I. Les radiosensibilisateurs traditionnels	13
1. Les antimétabolites	14
2. Les agents alkylants : exemple du témozolomide	17
3. Les dérivés du platine	17
4. Les inhibiteurs de l'ADN topoisomérase I : analogues de la camptothécine	18
5. Les stabilisateurs de microtubules	20
II. Les agents ciblant l'hypoxie tumorale	21
III. Les radiosensibilisateurs utilisés au cours de nos expériences	24
1. Les sels de platine	24
1.1. Généralités sur les sels de platine	24
1.2. Mode d'action des sels de platine	25
1.3. Oxaliplatine	27
2. La poly(ADP-ribose)polymérase 1 (PARP-1) et ses inhibiteurs	30
2.1. PARP-1	31
2.2. PARP-1 et réparation de l'ADN	32
2.3. Inhibiteurs de la PARP et radiosensibilisation	34
3. RAD001	36
3.1. Description	36
3.2. Mode d'action : la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR	36
3.3. Effet radiosensibilisateur	39
Chapitre II : Les morts cellulaires programmées	42
I. Généralités : les différents types de mort cellulaire	41
1. L'apoptose et l'autophagie	42
2. La nécrose	42
3. La kératinisation / cornification	43
4. Les morts cellulaires atypiques	44
4.1. La catastrophe mitotique	44

4.2.	<i>L'anoïkis</i>	44
4.3.	<i>L'excitotoxicité</i>	44
4.4.	<i>La dégénérescence wallérienne</i>	45
4.5.	<i>La paraptose</i>	45
4.6.	<i>La pyroptose</i>	45
4.7.	<i>La pyronécrose</i>	45
4.8.	<i>L'entose</i>	46
II.	L'apoptose	47
III.	L'autophagie	50
1.	Généralités	50
2.	Aspects morphologiques et caractéristiques de l'autophagie	51
2.1.	<i>Les vacuoles autophagiques</i>	51
2.2.	<i>Les origines de l'autophagosome : le phagophore</i>	55
2.3.	<i>La sélectivité de l'autophagie</i>	56
2.4.	<i>Itinéraire des autophagosomes</i>	57
3.	Cancer et régulation de l'autophagie : les acteurs moléculaires	57
3.1.	<i>La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR</i>	57
3.2.	<i>Les protéines de la famille Bcl-2</i>	61
3.3.	<i>p53</i>	64
3.4.	<i>DAPk</i>	68
3.5.	<i>Les protéines Atg</i>	69
MATERIELS ET METHODES		72
I.	Expériences <i>in vitro</i>	73
1.	Lignées cellulaires	73
2.	Irradiations	73
2.1.	<i>Dosimétrie</i>	73
2.2.	<i>Irradiations par neutrons rapides</i>	74
2.3.	<i>Irradiations par rayons X</i>	74
3.	Traitement pharmacologique des cellules	74
3.1.	<i>Oxaliplatine</i>	75
3.2.	<i>Inhibiteur de la PARP : PJ-34</i>	75
3.3.	<i>RAD001</i>	75
4.	Cytométrie en flux	75
4.1.	<i>Quantification de l'apoptose</i>	76
4.2.	<i>Quantification de l'autophagie</i>	77
5.	Microscopie à fluorescence	77
5.1.	<i>Analyse de l'autophagie</i>	77
5.1.1.	<i>Marquage à l'acridine orange</i>	77
5.1.2.	<i>Transfections GFP-LC3</i>	77
5.2.	<i>Marquage des coupures double-brin de l'ADN</i>	79
6.	Microscopie électronique	79
7.	Test de survie clonogénique	80
8.	Test de cytotoxicité SRB	80
9.	Analyses statistiques	81

II. Expériences <i>in vivo</i>	82
1. Animaux et modèle orthotopique de CHC	82
2. Irradiation par neutrons rapides	83
3. Analyse histologique	83
4. Suivi de l'apoptose par pCLE	84
4.1. Agent fluorescent : FLIVOgreen™	84
4.2. Apoptose induite par Fas : contrôle positif de l'apoptose	84
4.3. Détection de l'apoptose par pCLE chez des souris irradiées	85
5. Microscopie électronique	86
 RESULTATS	 88
Chapitre I : Article 1	89
Chapitre II : Article 2	101
Chapitre III : Article 3	113
 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	 136
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 142
 Annexes	 168
Liste des publications / communications	
Publications supplémentaires	

Abréviations

Abréviations

$\Delta\Psi_m$: Potentiel transmembranaire mitochondrial

3-MA : 3-méthyladénine

5-FU : 5-fluorouracil

ADPRT : ADP-ribosyltransférase

AIF : Apoptosis Induced Factor

AO : Acridine Orange

APAF : Apoptotic Protease Activating Factor

ATG : Autophagy Related Genes

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

BER : Base Excision Repair

BH : Bcl-2 Homologous domain

BRCT : BRCA1 Carboxy-Terminus

Caspase : Cystenyl Aspartate-Specific Proteinase

CDB : Coupure Double-Brin

CHC : Carcinome Hépatocellulaire

CRC : Centre de Recherche du Cyclotron

CSB : Coupure Simple-Brin

Cyt-C : Cytochrome C

DACH : Diamino-Cyclo-Hexane

DAPI : 4,6-Diamino-2-Phenylindole

DAPk : Death Associated Protein Kinase

DBD : DNA-Binding Domain

DSB : Double Strand Break

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

FasL : Fas-Ligand

FAT : Focal Adhesion Targeting

FRB : FKBP12 Rapamycin Binding Domain

GFP : Green Fluorescent Protein

Gy : Gray

HBV : Hepatitis B Virus
HCV : Hepatitis C Virus
HIF-1 : Hypoxia-Inducible Factor 1
hPARP-1 : Human poly(ADP-ribose)polymerase
HR : Homologous Recombination
Hsp90 : Heat-Shock Protein 90
IL : Interleukine
IP : Iodure de Propidium
kDA : Kilodalton
KO : Knock-Out
MAP-LC3 : Microtubule-Associated Protein Light Chain 3
MET : Microscopie Electronique à Transmission
MMR : Mismatch Repair
MPA : Membrane Pré-Autophagosomale
mTOR : Mammalian Target of Rapamycin
NCCD : Nomenclature Committee on Cell Death
NER : Nucleotide Excision Repair
NHEJ : Non-Homologous End Joining
NLS : Nuclear Localisation Signal
Ox : Oxaliplatine
PARP : Poly(ADP-ribose)polymérase
pCLE : Probe-based Confocal Laser Endomicroscopy
PE : Phosphatidyl Ethanolamine
PFA : Paraformaldéhyde
PI3K : Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIKK : Phosphatidylinositol-Related Kinase
PS : Phosphatidylsérine
PtdIns3P : Phosphatidylinositol 3-Phosphate
PTEN : Phosphatase and Tensin Homolog
RE : Réticulum Endoplasmique
RI : Radiations Ionisantes
RILD : Radiation-Induced Liver Disease
ROS : Reactive Oxygen Species

SSB : Single Strand Break

SSBR : Single Strand Break Repair

TLE : Transfert Linéique d'Energie

TLR : Toll-Like Receptor

TRAIL : TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

TSC2 : Tuberous Sclerosis Protein 2

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

Avant-propos

A l'heure actuelle, les protocoles de chimio-radiothérapie concomitante font preuve d'une grande efficacité dans la prise en charge des tumeurs. En revanche, le traitement de certaines tumeurs reste parfois très limité en raison de leur localisation critique ou de leur faible radiosensibilité aux radiations « conventionnelles ».

Les tumeurs hépatiques représentent le sixième type de cancer le plus fréquent et la troisième cause de mortalité due au cancer à travers le monde (Parkin *et al.*, 2005, Whittaker *et al.*, 2010). Les carcinomes hépatocellulaires (CHC, **Figure 1**) sont les tumeurs primitives du foie les plus répandues chez les adultes (Pons-Renedo *et al.*, 2003). Ils résultent dans la grande majorité des cas d'une complication tardive du foie et sont souvent associés à une cirrhose.

Les principaux facteurs de risque des CHC sont les infections virales par les virus de l'hépatite B (HBV) et C (HCV). Les autres facteurs de risque sont représentés par une consommation excessive d'alcool, des stéatoses hépatiques non alcooliques, des hépatites auto-immunes, des cirrhoses biliaires primitives, une exposition à des carcinogènes environnementaux (et plus particulièrement l'aflatoxine B), ou encore la présence de diverses pathologies génétiques métaboliques (Llovet *et al.*, 1999 ; Roberts *et al.*, 2005 ; Thomas *et al.*, 2005).

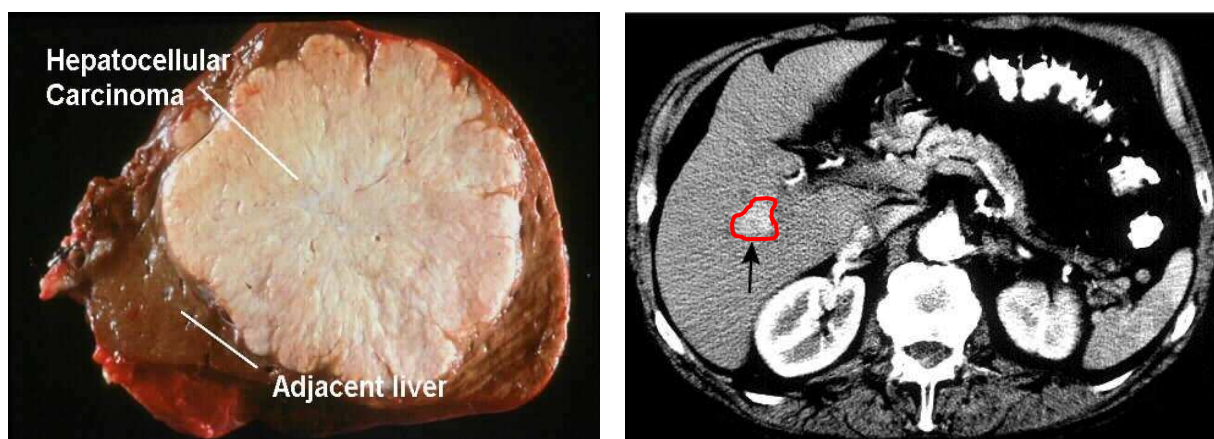


Figure 1 : Coupe au niveau d'un CHC (gauche) et image ultrasonographique (droite)

L'une des principales causes de la forte mortalité liée à ce type de tumeur est le manque d'options thérapeutiques efficaces, et plus particulièrement dans le cas des CHC avancés.

Même si la chirurgie et l'ablation percutanée par radiofréquence permettent un contrôle à long terme des patients atteints de CHC précoce, la récurrence de ce type de cancer est élevée et d'environ 50% à trois ans (Mulcahy *et al.*, 2005). De plus, en raison de la nature asymptomatique des CHC précoces, d'un manque de vigilance et de techniques de dépistage peu développées, environ 80% des patients sont diagnostiqués à un stade avancé de la maladie, souvent inopérable (Thomas *et al.*, 2005). Ces patients présentent généralement un pronostic faible, et les options thérapeutiques sont souvent palliatives.

Malgré l'administration de traitements (chimioembolisation trans-artérielle, chimiothérapie intra-artérielle ou systémique, radiothérapie, immunothérapie ou encore hormonothérapie), la survie relative à 5 ans des patients atteints de CHC est de 7%, et très peu de patients ayant déclaré une maladie symptomatique survivent au-delà d'un an (Bosch *et al.*, 2004). Le manque de traitements efficaces et bien tolérés par les patients atteints de CHC avancés met en évidence le besoin de rechercher de nouvelles approches thérapeutiques.

Le caractère fortement résistant des CHC envers les thérapies conventionnelles a été en partie attribué à son insensibilité aux agents cytotoxiques, et plus particulièrement à la difficulté de ce type de tumeur à entamer un processus de mort cellulaire (Llovet *et al.*, 2003). En outre, l'utilisation de la radiothérapie externe conventionnelle est limitée par l'apparition d'une pathologie induite par les radiations elles-mêmes (hépatite radique ou RILD : radiation-induced liver disease), un syndrome clinique pouvant conduire à la mort dans les cas les plus sévères (Dawson *et al.*, 2002). Cependant, l'efficacité de nouvelles techniques de radiothérapie, et plus particulièrement de l'hadronthérapie, a été démontrée dans le traitement des CHC (Orecchia *et al.*, 2004).

En effet, une manière de contourner le phénomène de radiorésistance de certaines tumeurs est l'utilisation de radiations à transfert linéique d'énergie (TLE) élevé ou hadronthérapie. L'hadronthérapie va permettre la destruction des cellules tumorales radiorésistantes et/ou inopérables par irradiation avec un faisceau de particules chargées (ions carbone) ou non (neutrons rapides). Ces particules, qui sont des constituants du noyau (hadrons) sont accélérées soit directement (protons, ions lourds) ou indirectement (neutrons rapides) afin

d'augmenter leur énergie, puis dirigées de manière précise au niveau des cellules tumorales cibles pour y provoquer des dommages très importants et difficilement réparables, capables de provoquer leur mort. Les hadrons sont donc doués de propriétés biologiques (neutrons et ions carbone) et balistiques (ions carbone) particulièrement avantageuses pour le traitement de certaines tumeurs.

Cependant, cette approche thérapeutique reste encore très peu utilisée en clinique et explorée en radiobiologie fondamentale en raison du faible nombre de centres et d'équipes consacrant leurs travaux de recherche à l'hadronthérapie expérimentale. Il faut toutefois noter qu'à l'heure actuelle, plusieurs centres d'hadronthérapie sont en cours de développement en Europe, dont un en France, le projet ETOILE à Lyon (Pommier et *al.*, 2002 ; Gérard et *al.*, 2010).

Dans certains cas (tumeurs très radiorésistantes), une irradiation par des particules à TLE élevé utilisées seules peut encore s'avérer insuffisante, d'où l'intérêt de leur associer des agents radiosensibilisateurs. Au cours de nos travaux, nous avons eu recours à différents types de radiosensibilisateurs. Nous avons évalué les effets cytotoxiques d'un tel cotraitement sur des lignées cellulaires radiorésistantes, et plus particulièrement sur la lignée SK-Hep1 issue d'un carcinome hépatocellulaire humain.

Le premier chapitre de cette introduction sera consacré aux principaux radiosensibilisateurs utilisés à l'heure actuelle ainsi qu'à leurs modes d'action, tandis que le deuxième chapitre abordera les deux types de morts cellulaires programmées que nous avons étudiés au cours de nos travaux : l'apoptose et l'autophagie. L'apoptose étant un processus très bien caractérisé à l'heure actuelle, nous insisterons d'avantage sur la mort cellulaire autophagique au cours de ce deuxième chapitre.

Introduction

Chapitre I : Radiosensibilisation

Chapitre I : Radiosensibilisation

La radiothérapie (RT) occupe aujourd'hui une place prépondérante dans le traitement des cancers. En effet, en France, 200 000 patients sont chaque année traités par les radiations ionisantes (RI) (Gérard *et al.*, 2010). Son efficacité est cependant limitée par un certain nombre d'inconvénients et d'effets secondaires. La RT standard implique généralement l'administration du maximum de dose de RI tolérable par le patient, administration qui est souvent associée à une morbidité due à la toxicité de ces RI au niveau des tissus normaux.

En dépit des importants progrès faits en matière de fractionnement (optimisation de la délivrance de la dose de RI ; avancées techniques permettant d'augmenter la précision de l'irradiation lors du ciblage de la tumeur : IMRT, IGRT), il existe toujours à l'heure actuelle de nombreuses limites qui conduisent à l'échec du traitement (Bernier *et al.*, 2004). En effet, ceci peut être expliqué par le fait que de nombreuses tumeurs sont caractérisées par un phénomène de résistance intrinsèque ou acquise envers les radiations ionisantes. Ce phénomène peut être dû au processus carcinogénique de la tumeur ou apparaître en cours de traitement (Seiwert *et al.*, 2007).

C'est pour cette raison que la combinaison de la RT avec des agents chimiothérapeutiques pouvant surpasser le phénomène de radiorésistance et sensibiliser les tumeurs aux effets cytotoxiques des RI est utilisée depuis de nombreuses années afin d'augmenter le contrôle local et de minimiser la toxicité des radiations envers les tissus sains, permettant ainsi une diminution de la dose. Bien que les protocoles thérapeutiques associant RT et chimiothérapie aient amélioré l'efficacité du traitement de nombreux cancers, ils sont encore insatisfaisants en raison de leur toxicité et du grand nombre d'effets secondaires qu'ils induisent (Bentzen *et al.*, 2007). Afin de parvenir à surmonter ces problèmes, un des principaux objectifs de la recherche en cancérologie fondamentale et translationnelle est l'élaboration d'agents radiosensibilisateurs plus efficaces (Wardman *et al.*, 2007 ; Oehler *et al.*, 2007).

De nombreuses approches existent à l'heure actuelle en matière de radiosensibilisation, mais nous ne nous focaliserons ici que sur les agents utilisés de manière courante ainsi que les agents ciblant les cellules tumorales hypoxiques radiorésistantes (**Figure 2**). Nous évoquerons plus longuement à la fin de ce chapitre les principaux radiosensibilisateurs utilisés au cours de nos expériences.

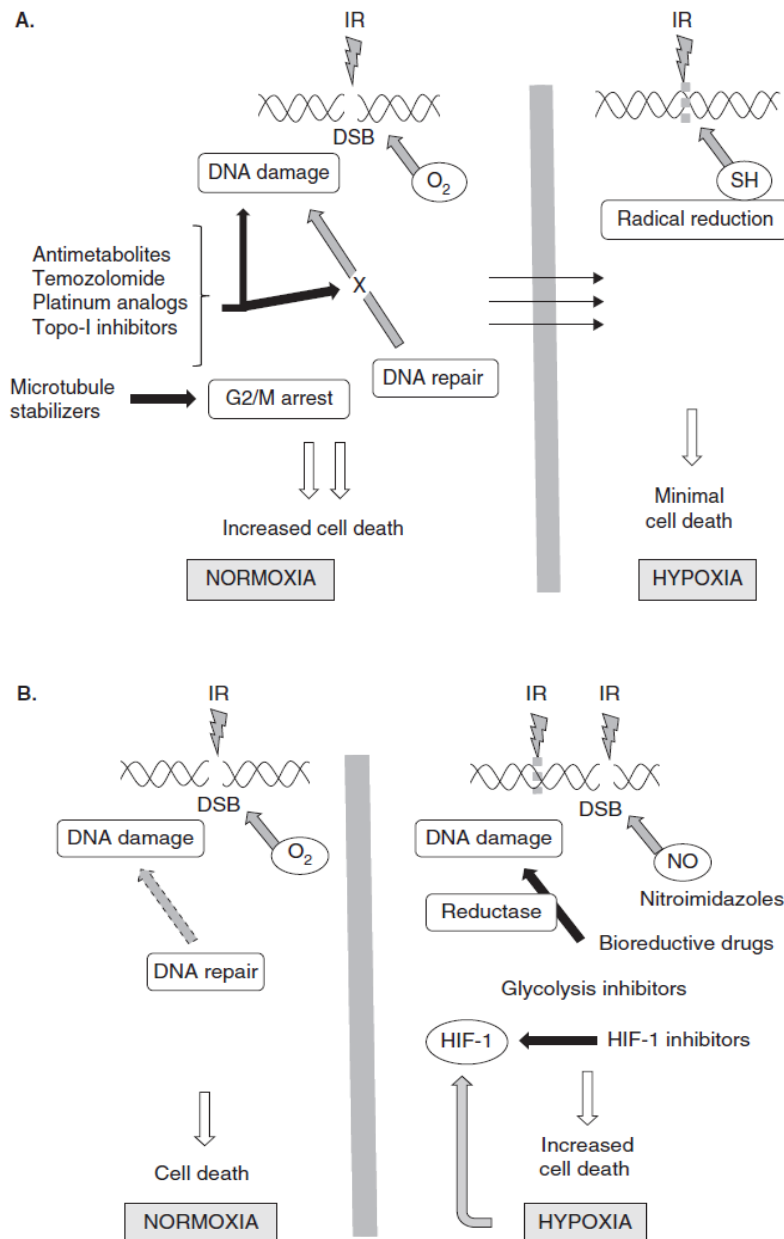


Figure 2 : Modèle simplifié de l'action cytotoxique des RI et des agents radiosensibilisateurs dans les cellules normoxiques et hypoxiques (Bischoff, 2009)

I. Les radiosensibilisateurs traditionnels

A ce jour, de nombreuses drogues antitumorales ayant des modes d'action très variés ont fait leurs preuves dans des protocoles chimio-radiothérapeutiques, les conduisant à une application clinique courante (**Tableau 1**). Cependant, en raison de leur cytotoxicité propre, ces drogues peuvent accroître les dommages occasionnés aux tissus sains ainsi que les effets secondaires des RI lorsqu'elles sont combinées à la RT. Toutefois, les efforts menés en vue de l'amélioration de leurs propriétés pharmacologiques ont permis leur utilisation en tant que radiosensibilisateurs.

Composé	Cytotoxicité	Radiosensibilisation
5-Fluorouracyl	Inhibition de la thymidylate synthase, incorporation dans l'ADN et inhibition de la maturation de l'ADN	Inhibition de la réparation des CDB radio-induites, dégradation des points de contrôle du cycle cellulaire
Iododésoxyuridine Bromodésoxyuridine	Inhibition de la ribonucléotide réductase et incorporation dans l'ADN	Augmentation du nombre de CDB radio-induites et inhibition de leur réparation
TAS-106	Inhibition de la thymidylate synthase et synthèse d'ARN	Suppression du point de contrôle G2-M, augmentation de l'apoptose radio-induite dans les cellules tumorales, inhibition de l'expression de HIF-1 α et de la survivine
Gemcitabine	Déplétion des désoxynucleosides triphosphates, induisant une inhibition de l'ADN polymérase et de la ribonucléotide réductase	Mauvaise incorporation de nucléotides durant la réplication de l'ADN, induisant une augmentation de la mort cellulaire radio-induite
Clorafabine	Inhibition des ADN polymérases et de la ribonucléotide réductase, incorporation dans l'ADN	Inhibition de la réparation des CDB de l'ADN induites par des faibles doses de RI et induction de CDB à des doses élevées
3-AP (Triapine)	Inhibition de la ribonucléotide réductase, induisant un blocage de la synthèse d'ADN et de la réparation	Inhibition de la réparation des CDB radio-induites
Témzolomide	Méthylation des guanines en position O6, induisant un mismatch repair au niveau de l'ADN, des coupures de brins ainsi que la mort cellulaire	Inhibition de la réparation des CDB radio-induites, conduisant à une augmentation du nombre de catastrophes mitotiques
Sels de platine	Liaison covalente aux purines de l'ADN, induisant des pontages inter et intra-brins	Inhibition de la réparation des dommages de l'ADN, induction d'apoptose et formation radio-induite d'intermédiaires toxiques du platine
Analogues de la camptothécine	Inhibition de la topoisomérase I, induisant des CDB irréversibles au niveau de l'ADN	Aggravation des lésions à l'ADN radio-induites et inhibition de leur réparation
Taxanes, épothilones	Stabilisation des microtubules, induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase G2-M et la mort cellulaire	Synchronisation des cellules en phase G2-M, au maximum de leur radiosensibilité

Tableau 1 : Cytotoxicité et radiosensibilisation des drogues antinéoplasiques utilisées en tant que radiosensibilisateurs

1. Les antimétabolites

Les antimétabolites comptent parmi les radiosensibilisateurs les plus utilisés actuellement. Ils permettent l'induction de mort cellulaire en générant des métabolites intracellulaires qui vont interférer avec les voies de synthèse des acides nucléiques ainsi que la réplication de l'ADN. Cependant ils vont différer de par leurs mécanismes d'action qui sous-tendent l'augmentation de la sensibilité des cellules aux RI (Shewach *et al.*, 2007).

Le 5-fluorouracil (5-FU), une pyrimidine halogénée, a été largement utilisée en combinaison avec la RT au cours des quarante dernières années. Même si la cytotoxicité directe du 5-FU résulte du blocage de la synthèse d'ADN à travers l'inhibition de la thymidylate synthase, son effet radiosensibilisateur à des concentrations sub-léthales reflète les altérations subies par les systèmes de réparations de l'ADN et les points de contrôle du cycle cellulaire. Un des inconvénients du 5-FU est qu'il doit être injecté de manière continue par voie intra-veineuse durant les séances de RT pour montrer une efficacité optimale de son pouvoir radiosensibilisateur. Une pro-drogue du 5-FU, la capécitabine, semble faciliter les modalités de ce traitement car, administrée par voie orale, elle permet un traitement sur plusieurs jours en continu (Ben-Joseph *et al.*, 2007). Le tegafur, une autre pro-drogue du 5-FU, a été initialement utilisé en combinaison avec de l'uracyl pour inhiber sa dégradation par la dihydropyrimidine déshydrogénase. Une firme américaine (Taiho Pharmaceuticals) a récemment synthétisé un dérivé du tegafur, le S-1, contenant de la 5-chloro-2,4 dihydroxypyridine, un inhibiteur de la dihydropyrimidine déshydrogénase, ainsi que de l'acide oxolinique, permettant de diminuer les effets secondaires gastro-intestinaux. De nombreuses études réalisées en laboratoire ont étudié les propriétés antitumorales du S-1 et montré une efficacité accrue par rapport à la capécitabine (Nukatsuka *et al.*, 2004). De plus, de nombreux protocoles expérimentaux ont permis de démontrer que le S-1 exerçait une action radiosensibilisatrice, notamment en utilisant un modèle cellulaire de tumeur du colon résistant au 5-FU (Nakata *et al.*, 2006). Ces résultats ont conduit Taiho Pharmaceuticals à promouvoir l'utilisation du S-1 pour augmenter la réponse à la radiothérapie dans le traitement de certains cancers (Taiho Pharmaceuticals Co, 2007). Poussant plus loin leurs recherches, ils ont pu démontrer que la 5-chloro-2,4 dihydroxypyridine induisait à elle seule un effet radiosensibilisateur *in vivo*. Cependant, le mécanisme de cet effet inattendu n'a pas encore été étudié à ce jour (Taiho Pharmaceuticals Co, 2007). Le « cocktail » thérapeutique

incluant le S-1 est à présent utilisé en combinaison avec la RT au Japon et des études cliniques de phase III sont actuellement entreprises en Europe et aux Etats-Unis.

L'activité radiosensibilisatrice des analogues de thymidine halogénée, tels que la 5-iododésoxyuridine (IUdR) et la 5-bromodésoxyuridine, connue pour augmenter le nombre de coupures double-brin (CDB) au niveau de l'ADN et inhiber leur réparation, a également été reconnue depuis longtemps. Cependant, l'utilisation clinique de ces agents a été sévèrement limitée par leur forte toxicité envers les tissus normaux.

Une pro-drogue de l'IUdR, administrée oralement et supposée moins toxique, le 5-iodo-2-pyrimidinone-2'-désoxyribose, est en cours d'évaluation clinique (Saif *et al.*, 2007). Cette pro-drogue est censée se convertir en IUdR préférentiellement au niveau des tumeurs plutôt qu'au niveau des tissus sains. Une méthode alternative permettant d'augmenter la spécificité tumorale de ce type de radiosensibilisation a été récemment proposée par des équipes de l'Université de Miami. Cette technique est basée sur la découverte que certains types tumoraux, notamment les cancers du pancréas, expriment des taux intracellulaires élevés de cytidine désaminase, les rendant ainsi capables de métaboliser de la 5-iodo-désoxycytidine non toxique en IUdR. Les résultats de cette étude montrent que la 5-iodo-désoxycytidine ainsi que d'autres analogues de la désoxycytidine agissent en radiosensibilisant une lignée tumorale de prostate *in vitro*, et que cet effet était supprimé par des inhibiteurs de la cytidine désaminase (University of Miami, 2008). De tels composés dérivés de la désoxycytidine pourraient ainsi permettre une radiosensibilisation très spécifique des tumeurs, mais de plus amples investigations *in vivo* sont indispensables pour conclure sur les bénéfices thérapeutiques éventuels de cette méthode.

Il a été démontré récemment qu'un autre analogue de la cytidine, le TAS-106 (3'-C-ethynylcytidine), en inhibant la thymidylate synthase et la synthèse d'ARN, pouvait renforcer l'effet antitumoral des RI en augmentant le pourcentage d'apoptose dans les cellules tumorales. Cet effet pro-apoptotique est dû à l'inhibition d'une protéine anti-apoptotique, la survivine (Kazuno *et al.*, 2007 ; Yasui *et al.*, 2007 ; Yasui *et al.*, 2008). Le TAS-106 est actuellement testé dans des études cliniques de phases I/II chez des patients atteints de cancers. Des dérivés du TAS-106 actifs après administration orale, synthétisés par Taiho Pharmaceuticals, pourraient présenter un réel bénéfice thérapeutique en tant qu'agents antitumoraux et radiosensibilisateurs.

La Gemcitabine, un analogue fluoré de la cytarabine à large spectre d'activité envers les tumeurs solides, est l'une des drogues antitumorales les plus utilisées en clinique à l'heure actuelle, notamment en raison de ses propriétés radiosensibilisatrices (Anderson *et al.*, 2008). Elle empêche la synthèse d'ADN en inhibant l'ADN polymérase et la ribonucléotide réductase. De plus, elle permet une radiosensibilisation des cellules tumorales à des concentrations faiblement cytotoxiques en induisant des erreurs au niveau de la réplication de l'ADN (Flanagan *et al.*, 2007).

L'efficacité de la Gemcitabine est limitée par la nécessité d'avoir recours à des transporteurs membranaires pour lui permettre d'entrer dans le cytoplasme des cellules tumorales. Des dérivés de cette molécule, capables d'entrer dans les cellules tumorales indépendamment de ces transporteurs ont été synthétisés (Jordheim *et al.*, 2006). C'est le cas du CP-4126, développé par Clavis Pharmaceuticals, et actuellement en étude clinique de phase I.

Un nouvel analogue de purine, la clofarabine, un inhibiteur d'ADN polymérase et de la ribonucléotide réductase, est à ce jour approuvé dans le traitement des leucémies et a été récemment proposé en tant que radiosensibilisateur dans le traitement de tumeurs solides (Southern Research Institute, 2008). Il a été démontré que la clofarabine facilitait l'induction de dommages à l'ADN radio-induits et qu'elle agissait en synergie avec la RT en inhibant la croissance de tumeurs humaines xénogreffées chez la souris (Cariveau *et al.*, 2008).

Un autre radiosensibilisateur bien caractérisé à ce jour est l'hydroxyurée. Celle-ci entre dans la cellule par diffusion passive et empêche la synthèse d'ADN ainsi que la réparation des CDB radio-induites en inhibant la ribonucléotide réductase (Shewach *et al.*, 2007). La 3-AP, un puissant inhibiteur de la ribonucléotide réductase, a été récemment approuvée en tant que radiosensibilisateur efficace dans des modèles précliniques *in vitro* et *in vivo* lorsqu'elle était délivrée avant ou juste après irradiation. Ce composé est actuellement en étude de phase I dans le cas de cancers avancés du col de l'utérus (Kunos *et al.*, 2010).

2. Les agents alkylants : exemple du témozolomide

Le témozolomide (Témodal), administré oralement, est la pro-drogue d'un agent alkylant anticancéreux causant des dommages à l'ADN en provoquant la méthylation de guanine en position O-6. Cette méthylation aura pour conséquence un mauvais appariement lors de la réplication de l'ADN, suivi par des coupures au niveau du brin d'ADN et conduisant à la mort cellulaire (Kil *et al.*, 2008). Le témozolomide exerce une puissante action radiosensibilisatrice en inhibant la réparation des CDB radio-induites et en provoquant une augmentation de la fréquence de « catastrophes mitotiques ».

Franchissant aisément la barrière hémato-encéphalique, le témozolomide s'est montré très efficace en association avec la RT dans le traitement des glioblastomes (Nieder *et al.*, 2006). Cependant, des phénomènes de résistance à cet agent apparaissent fréquemment dans des tumeurs isolées, en raison du taux élevé d'enzymes de réparation de l'ADN dans ces cellules (O6-méthylguanine-DNA méthyltransférase) ou d'une déficience au niveau du « mismatch repair ». L'expression de l'ADN polymérase β , impliquée dans le mécanisme de réparation par excision de base, a également été corrélée aux phénomènes de résistance au témozolomide (Trivedi *et al.*, 2008). Une étude, réalisée par l'Université de Pittsburgh, a montré que le blocage de cette enzyme avait pour conséquence une augmentation de l'efficacité thérapeutique du témozolomide.

3. Les dérivés du platine

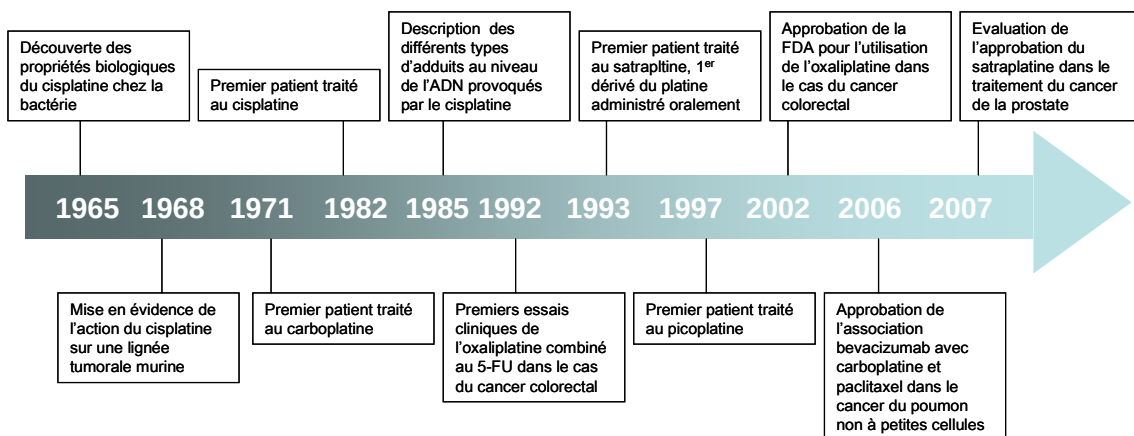


Figure 3 : Les dérivés du platine au fil du temps

Depuis la découverte des propriétés biologiques du cisplatine en 1965 (**Figure 3**), les complexes dérivés du platine sont communément utilisés dans les protocoles de chimio-radiothérapie (Seiwert *et al.*, 2007 ; Kelland *et al.*, 2007). Administrés avant ou après irradiation, ces composés provoquent une augmentation de la mort cellulaire par différents mécanismes. Ces derniers impliquent notamment la formation d'adduits au niveau de l'ADN, empêchant la réparation des dommages à l'ADN radio-induits et conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire et à la mort cellulaire par apoptose. De plus, les RI semblent augmenter la capture du platine au niveau cellulaire ainsi que la génération de composés intermédiaires toxiques pour les cellules en induisant la production de radicaux libres (Hermann *et al.*, 2008). Il est à noter que ces dérivés du platine sont capables de radiosensibiliser à la fois des cellules normoxiques (normalement oxygénées), mais également des cellules hypoxiques.

Les effets secondaires toxiques des dérivés du platine actuellement utilisés, leur activité limitée dans un certain nombre de tumeurs ainsi que leur faible spécificité envers les cellules tumorales ont motivé de récentes recherches visant à élaborer de nouveaux complexes du platine plus efficaces (Kelland *et al.*, 2007, Momekov *et al.*, 2006).

Ayant utilisé l'oxaliplatine au cours de ce travail de thèse, nous y reviendrons et en développerons les caractéristiques un peu plus loin, dans la partie III.1. de ce même chapitre.

4. Les inhibiteurs de l'ADN topoisomérase I : analogues de la camptothécine

Les dérivés de la camptothécine, tels que le topotécan et l'irinotécan, appartiennent à une autre classe de drogues antitumorales largement utilisées en clinique et à présent étudiées dans des protocoles les associant à la RT (Wardman *et al.*, 2007). Ces composés ont pour cible la topoisomérase I, une enzyme dont le rôle principal est de relâcher la torsion rotationnelle de l'ADN pendant les processus de transcription et de réplication en formant des coupures simple-brin (CSB) transitoires. Elle forme un complexe avec l'ADN grâce à une liaison covalente avec une extrémité 3'. Ce complexe, stabilisé par la présence de l'inhibiteur, entrerait en collision avec une fourche de réplication, ce qui produirait des CDB au niveau de l'ADN, à l'origine de la cytotoxicité de ces dérivés de la camptothécine (**Figure 4**). L'activité radiosensibilisatrice de ces drogues semble résulter de leur capacité à amplifier les lésions radio-induites de l'ADN et à empêcher leur réparation (Pommier *et al.*, 2006 ; Darzynkiewicz *et al.*, 2008).

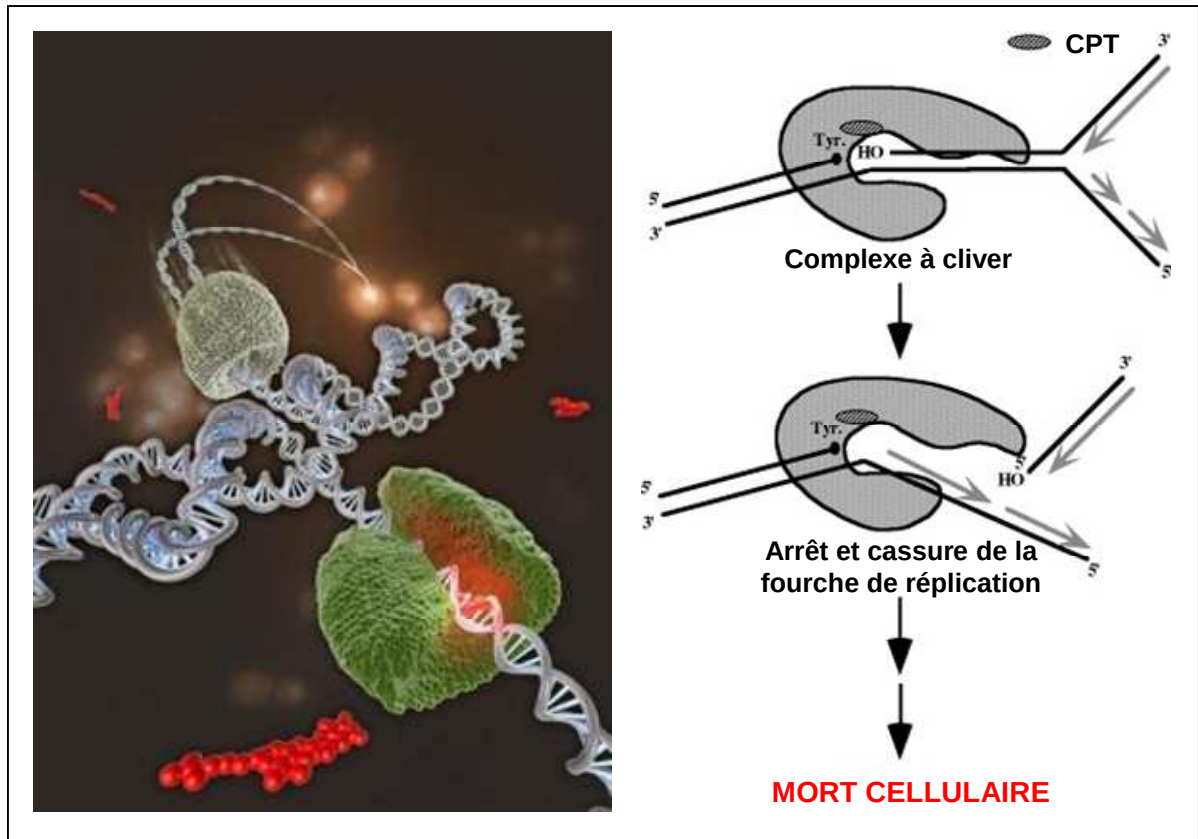


Figure 4 : Inhibition de l'ADN topoisomérase I par la camptothécine

Un brevet récemment déposé met en exergue l'intérêt d'un traitement combinant irinotecan et le dérivé S-1 du tegafur pour augmenter l'efficacité de la RT pré-opératoire dans le cas du cancer rectal (Kitasato *et al.*, 2007). De plus, il a été récemment démontré que de nouveaux dérivés de la camptothécine portant des groupements électrophiles pouvaient être utilisés comme radiosensibilisateurs dans le traitement du cancer. L'un de ces dérivés notamment, montre une toxicité moindre par rapport à la camptothécine et au topotécan chez la souris. Ce composé permet d'augmenter l'effet antiprolifératif des radiations ionisantes dans des tumeurs de la prostate et du sein *in vitro*. Administré à des doses non toxiques pour la souris 24h avant irradiation, il permet également de radiosensibiliser de manière significative un modèle murin d'adénocarcinome mammaire. Cependant, les propriétés radiosensibilisatrices de tels composés portant des groupements électrophiles n'ont pas encore été étudiées sur des tumeurs hypoxiques, et cet aspect nécessite donc de plus amples investigations.

5. Les stabilisateurs de microtubules

Les dérivés du taxane, tels que le paclitaxel et le docétaxel (**Figure 5**), sont des agents antinéoplasiques dont les propriétés radiosensibilisatrices sont bien connues à l'heure actuelle (Seiwert *et al.*, 2007). Ils se lient à la tubuline, provoquant un assemblage très stable des microtubules, empêchant ainsi leur réorganisation nécessaire au déroulement de l'interphase et de la mitose. Il en résulte un arrêt du cycle cellulaire en phase G2-M, éventuellement suivi par l'induction de mort cellulaire dans ces cellules. De plus, en synchronisant les cellules en phase G2-M, un moment du cycle cellulaire où la radiosensibilité est à son maximum (Pawlik *et al.*, 2004), les taxanes augmentent les effets délétères des RI, y compris dans des cellules p53-mutées.

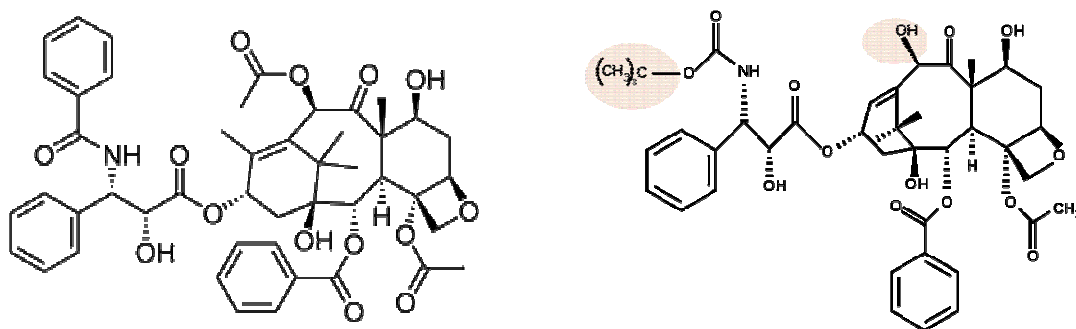


Figure 5 : Formules chimiques du paclitaxel (gauche) et du docétaxel (droite)

Un des inconvénients des taxanes est leur faible solubilité dans l'eau, nécessitant l'addition de solvants chimiques lors de leur élaboration, solvants à l'origine d'effets secondaires biologiques et pharmacologiques. Afin de contourner ce problème, Abraxis Bioscience a développé un dérivé du paclitaxel sous la forme de nanoparticule de 130 nm ne nécessitant pas de solvant, l'Abraxane (American Bioscience, 2006). Il a été démontré, dans des études pré-cliniques, que ce dernier, utilisé en combinaison avec la RT, permettait une radiosensibilisation efficace de tumeurs murines mammaires et ovariennes (Wiedenmann *et al.*, 2007).

En raison de fréquents problèmes de chimiorésistance des tumeurs envers les taxanes, de nouveaux agents stabilisateurs de microtubules ont été étudiés. C'est ainsi qu'ont été découverts les épothilones, montrant des propriétés antinéoplasiques intéressantes, à la fois sur des tumeurs sensibles mais également sur des tumeurs résistantes au taxane (Fumoleau *et*

al., 2007). L'EPO906, ou épothilone B, a été démontré comme étant l'un des épothilones les plus efficaces, permettant notamment de radiosensibiliser un adénocarcinome humain du colon p53-muté et résistant au paclitaxel (Hofstetter *et al.*, 2005). Une étude clinique de phase I a d'ores et déjà été lancée pour étudier les effets d'un traitement combinant EPO906 et RT.

II. Les agents ciblant l'hypoxie tumorale

Les tumeurs solides humaines présentent fréquemment des zones hypoxiques, c'est-à-dire mal oxygénées, et ceci en raison d'une croissance anarchique et d'une vascularisation inadéquate. Les cellules viables se trouvant dans ces zones sont deux à trois fois plus résistantes aux RI que les cellules normoxiques (**Figure 6**). Cette résistance accrue résulte essentiellement du faible nombre de radicaux libres formés, radicaux libres qui, en temps normal induisent des dommages à l'ADN. De manière générale, la faible oxygénation des tumeurs solides étant la principale cause d'échec de la RT, une des approches faisant l'objet de nombreuses recherches ces dernières années consiste à contourner la radiorésistance liée au caractère hypoxique des tumeurs (Brown *et al.*, 1999 ; Brown *et al.*, 2007 ; Bache *et al.*, 2008).

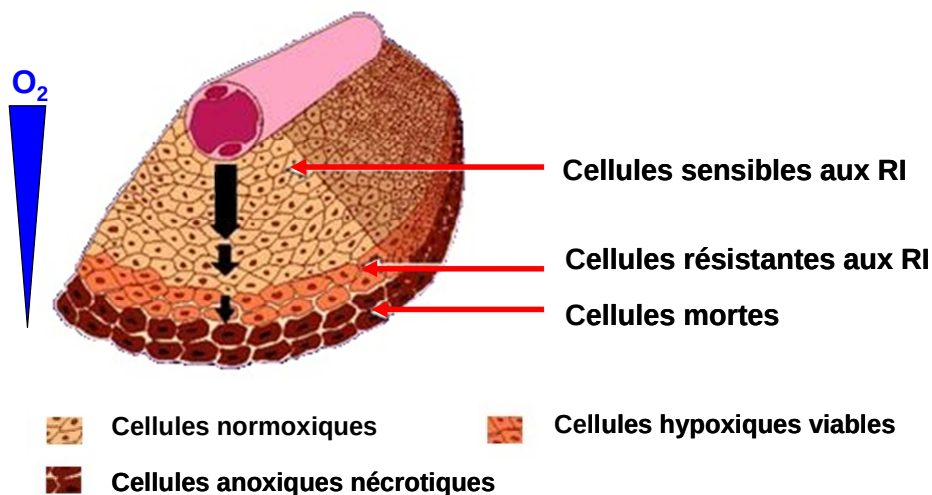


Figure 6 : Sensibilité aux RI au sein d'une tumeur solide

Au cours des dernières décennies, plusieurs stratégies ont donc été explorées afin de cibler ce problème de radiorésistance liée à l'hypoxie tumorale.

Le but de la première stratégie est d'augmenter l'oxygénation des cellules tumorales au cours de la radiothérapie. Pour cela, différentes approches thérapeutiques peuvent être envisagées, telles que : traitement à l'oxygène hyperbare, administration de nicotinamide combinée à la respiration de carbogène, administration d'efaproxiral (composé capable d'augmenter le pouvoir oxygénant de l'hémoglobine au sein des tissus), ou encore administration d'un agoniste du récepteur de l'endothéline B afin d'augmenter sélectivement l'apport sanguin au niveau des tumeurs.

Une seconde stratégie va consister à cibler directement les cellules tumorales hypoxiques avec des agents pharmacologiques. Ces derniers vont agir en tant que radiosensibilisateurs hypoxiques, de cytotoxines bioréductrices, ou encore d'inhibiteurs de la glycolyse.

Les radiosensibilisateurs hypoxiques comportent des groupements nitroaromatiques électrophiles qui vont subir un métabolisme bioréducteur au sein des cellules hypoxiques. Ces groupements, une fois réduits, vont mimer l'oxygène en réagissant avec les radicaux libres radio-induits de l'ADN, permettant ainsi une stabilisation des lésions de l'ADN en condition d'hypoxie.

Les cytotoxines bioréductrices, quant à elles, ont été synthétisées dans le but d'activer les réductases intracellulaires en condition de faible oxygénation, de manière à former des dérivés actifs sélectivement toxiques pour les cellules hypoxiques. En éliminant les cellules hypoxiques radiorésistantes, les drogues bioréductrices pourraient améliorer la létalité radio-induite des cellules tumorales normoxiques, potentialisant ainsi l'effet anti-tumoral de la RT.

La dernière stratégie va cibler HIF-1 (hypoxia-inducible factor), un facteur de transcription qui est impliqué dans la régulation de nombreux gènes activés en conditions d'hypoxie et conduisant à l'angiogénèse ainsi qu'à une augmentation de la glycolyse, de la survie et de la formation de métastases par les cellules tumorales (**Figure 7**).

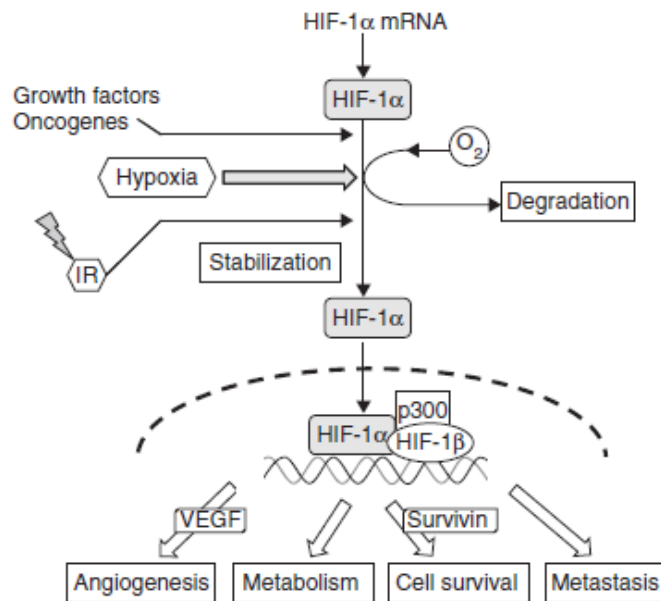


Figure 7 : Modèle simplifié des mécanismes de régulation de HIF-1 dans les cellules tumorales (Bischoff, 2009)

HIF-1 est un hétérodimère constitué de deux sous-unités : une sous-unité β qui est exprimée de manière constitutive, ainsi qu'une sous-unité α dont la stabilité est régulée par des modifications post-traductionnelles. Dans les cellules normoxiques, HIF-1 est instable en raison de phénomènes d'ubiquitination et de dégradation par le protéasome. Cependant, dans les cellules hypoxiques, il échappe à cette protéolyse et va interagir avec HIF-1 β afin de déclencher l'activité transcriptionnelle de HIF-1. L'expression de HIF-1 α peut également être modulée par de nombreux facteurs de croissance et voies de signalisation oncogéniques en conditions normoxiques.

L'activité de HIF-1 est renforcée dans un certain nombre de cancers. Ce gain d'activité peut être corrélé avec un mauvais pronostic de ces tumeurs dû à une croissance agressive et à une résistance envers la RT. De plus, l'exposition des cellules tumorales aux RI stimule l'activité de HIF-1 à travers des processus complexes résultant en la stabilisation de HIF-1 α indépendamment du caractère hypoxique du milieu. Ainsi, en bloquant les différents mécanismes contrôlant la progression tumorale et la radiorésistance, les drogues qui vont supprimer l'expression de HIF-1 α ou inhiber l'activité de HIF-1 sont susceptibles d'aboutir à un réel bénéfice thérapeutique (Semenza *et al.*, 2007 ; Dewhirst *et al.*, 2008).

Un grand nombre d'agents antinéoplasiques, y compris les composés visant Hsp90 (heat-shock protein 90), topoisomérases, microtubules, histones déacétylases et de nombreuses

kinases, vont interférer avec HIF-1. Des approches ciblant HIF-1 de manière beaucoup plus spécifique ont également été entreprises : suppression de la synthèse de HIF-1 α par la technique des ARN interférents ou encore suppression de la synthèse d'oxyde nitrique (provoquant une déstabilisation et une baisse d'expression de HIF-1).

Notons enfin, quoiqu'il ne s'agisse pas d'une radiosensibilisation par des agents exogènes, que le recours à des radiations à TLE élevé permet de s'affranchir en partie de l'hypoxie tumorale. C'est là un des principaux avantages de l'hadronthérapie (Wambersie *et al.*, 2004). La combinaison d'agents ciblant l'hypoxie tumorale à des radiations à TLE élevé pourrait donc offrir des perspectives très prometteuses dans le traitement de cancers particulièrement radiorésistants.

III. Les radiosensibilisateurs utilisés au cours de nos expériences

1. Les sels de platine

1.1. Généralités sur les sels de platine

La découverte accidentelle du cisplatine en 1965 par Rosenberg et la mise en évidence de ses propriétés antitumorales en 1968, conduisant à son application clinique dès 1978, marque un tournant important dans l'histoire des drogues antinéoplasiques.

Suite à cette découverte fondamentale, la chimie inorganique a connu un renouveau, menant à la synthèse et à l'évaluation biologique de centaines d'analogues du cisplatine. La recherche de nouveaux dérivés avait pour but de diminuer la toxicité (et en particulier la néphrotoxicité sévère) du cisplatine mais également de tenter de synthétiser des dérivés administrables oralement. Une autre raison, toujours d'actualité, motivant la découverte de nouveaux dérivés a été la volonté de contourner le phénomène de chimiorésistance de certaines tumeurs au cisplatine. Cette chimiorésistance peut apparaître en cours de traitement (dans le cas du cancer de l'ovaire, par exemple), ou être une caractéristique intrinsèque de la tumeur en question (cancer colorectal, de la prostate, du poumon, ou encore du sein) (Kelland *et al.*, 2007).

Parmi les nombreux dérivés du platine synthétisés, cinq sont couramment utilisés en chimiothérapie : le cisplatine et le carboplatine (utilisation dans le monde entier), l'oxaliplatine (Europe, Etats-Unis), le nédaplatine (Japon) et le lobaplatine (Chine). Ces composés partagent la propriété fondamentale de former des adduits au niveau de l'ADN, mais vont cependant différer tant au niveau pharmacocinétique, qu'au niveau de leur spectre tumoral. La **figure 8** représente les principales caractéristiques du cisplatine, du carboplatine et de l'oxaliplatine, les trois dérivés majeurs du platine.

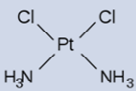
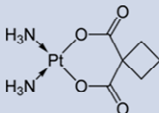
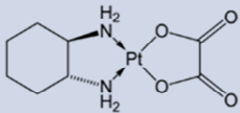
	Cisplatine	Carboplatine	Oxaliplatine
Structure chimique			
	PM = 300,0 Da	PM = 371,3 Da	PM = 397,3 Da
Fixation protéique (4 heures)	> 90%	24%	85%
Elimination	Rénale	Rénale	Rénale
Excrétion urinaire (24 heures)	23-50%	54-82%	> 50%
Toxicité	Néphrotoxicité Neurotoxicité	Myélosuppression	Neurotoxicité

Figure 8 : Caractéristiques du cisplatine, carboplatine et oxaliplatine

De manière générale, les dérivés du platine possèdent un groupement chimique leur permettant de former des liaisons covalentes, ou adduits, avec les acides nucléiques de la cellule. Ces adduits vont inhiber la réplication de l'ADN et entraîner la mort de la cellule.

1.2. Mode d'action des sels de platine

Le cisplatine, le carboplatine et l'oxaliplatine sont tous trois constitués d'un atome de platine couplé à deux ligands : un ligand transporteur, ainsi qu'un ligand hydrolysable (variable en fonction du dérivé).

Dans le cas de l'oxaliplatine, le groupement diamminocyclohexane (DACH) fait office de ligand transporteur, et l'acide oxalique, de ligand hydrolysable. La perte du groupement

oxalate, remplacé par deux ions chlorure, va permettre l'activation de l'oxaliplatine qui sera ainsi transformé en un métabolite actif, le DACH-dichloroplatine (Pendyala *et al.*, 1993).

De même que pour le cisplatine, les composés formés par hydrolyse spontanée de l'oxaliplatine vont exercer leur cytotoxicité en formant des adduits au niveau de l'ADN, et plus particulièrement au niveau de l'atome N7 des bases guanine et adénine (Thomas *et al.*, 2007). Ces adduits peuvent être liés à une seule base (monofonctionnels) ou liés à deux bases (bifonctionnels). La **figure 9** montre la réaction d'hydrolyse du cisplatine et la formation d'adduits au niveau de l'ADN. Le principe reste le même pour l'oxaliplatine.

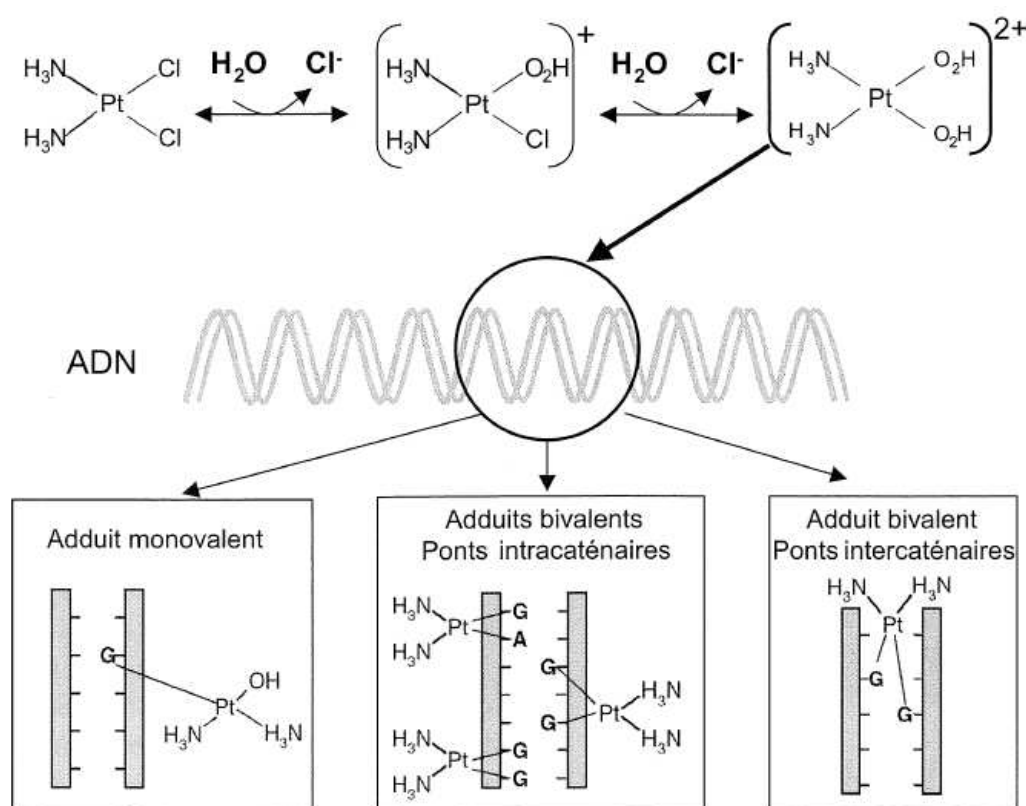


Figure 9 : Hydrolyse du cisplatine et formation d'adduits au niveau de l'ADN (Thomas, 2007)

Dans le cas du cisplatine, les adduits formés sont essentiellement des ponts intra-brins guanine-guanine (dGdG). Ce type d'adduits représente 60 à 65% du platine lié à l'ADN, contre 20 à 25% pour les ponts adénine-guanine (dAdG) et 5 à 6% pour les ponts intrabrins guanine-guanine non adjacentes. Les liaisons interbrins et les adduits monofonctionnels vont constituer les adduits restants. Le carboplatine va former des adduits identiques au cisplatine, mais la cytotoxicité de ceux-ci sera plus faible que celle du cisplatine, en raison d'une hydrolyse plus lente.

Dans le cas de l'oxaliplatine, la réactivité du métabolite actif (DACH-platine) sera inférieure à celle du cisplatine. En effet, à concentration équimolaire, le nombre d'adduits formés par l'oxaliplatine sera moindre par rapport à ceux formés par le cisplatine. Cependant, en dépit du nombre plus faible d'adduits formés, l'oxaliplatine possède un potentiel cytotoxique supérieur au cisplatine, et ce sur de nombreuses lignées tumorales. En effet, la saillie du DACH à l'extérieur du sillon majeur de l'ADN va conduire à la formation d'adduits plus encombrants que ceux formés par les autres dérivés du platine. De plus, les caractéristiques du groupement cyclohexane (position, encombrement stérique, nature apolaire) et le rétrécissement du sillon majeur qu'il induit au niveau de l'ADN, auraient pour conséquence sa non-reconnaissance par les systèmes de réparation, en particulier par le système MMR (mismatch repair) responsable de la réparation des mésappariements.

1.3. Oxaliplatine

Au cours de nos expériences, nous avons eu recours à l'utilisation de ce dérivé du platine de troisième génération.

A l'heure actuelle, l'oxaliplatine, en association avec le 5-fluoro-uracile (5-FU) et l'acide folinique, est indiqué dans le traitement adjuvant des cancers du colon de stade III (après résection chirurgicale de la tumeur initiale) et des cancers colorectaux métastatiques (Thomas *et al.*, 2007). De récentes études ont également prouvé son efficacité dans le traitement d'autres types tumoraux, tels que les carcinomes hépatocellulaires (Asnacios *et al.*, 2008), d'où le choix de ce dérivé dans notre présente étude, portant sur la lignée SK-Hep1 issue d'un CHC humain.

De plus, une autre caractéristique intéressante de l'oxaliplatine est sa capacité à induire des dommages au niveau de tumeurs ayant développé une chimiorésistance envers le cisplatine et le carboplatine. En effet, l'échec des chimiothérapies anticancéreuses repose essentiellement sur des phénomènes de résistance intrinsèque des tumeurs. Cette résistance, présente de manière constitutive ou acquise en cours de traitement, est constituée des six processus majeurs suivants :

- Une baisse de l'accumulation du dérivé platiné au sein des cellules : la **figure 10** illustre le phénomène de résistance au cisplatine et au carboplatine, dû à un taux insuffisant de platine atteignant le noyau des cellules tumorales. Le platine va entrer dans les cellules soit par l'intermédiaire de transporteurs membranaires (et plus particulièrement à travers le récepteur CTR1), soit par diffusion passive. La perte de CTR1 résulte en une diminution du platine entrant dans la cellule, et par conséquent l'apparition d'une résistance envers cette drogue. Contrairement au cisplatine et au carboplatine, l'importance de ce récepteur CTR1 semble être moins élevée pour l'oxaliplatine.

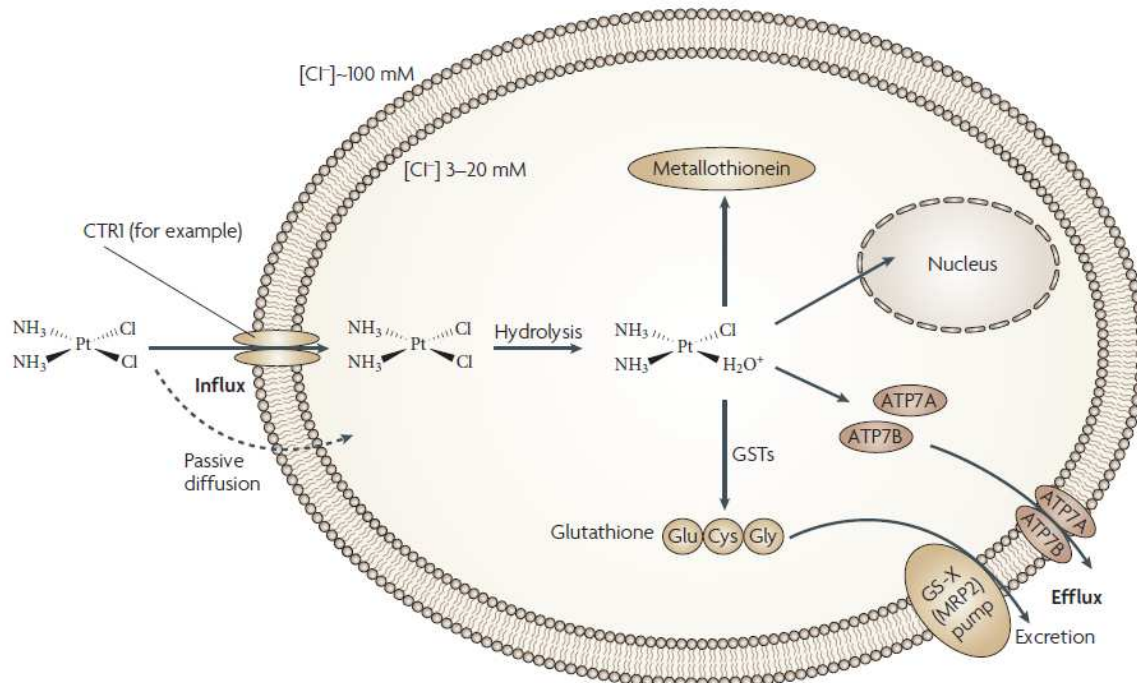


Figure 10 : Phénomène de résistance au cisplatine (Kelland, 2007)

- Une conjugaison avec des groupements thiols, conduisant à une inactivation du dérivé : le glutathion, notamment, peut contribuer à la résistance envers les composés actifs du cisplatine en les complexant avant qu'ils n'atteignent le noyau de la cellule.
- Une réparation accrue de l'ADN
- Une modification fonctionnelle de protéines régulatrices du cycle cellulaire
- Une tolérance aux lésions formées par une synthèse « translésionnelle »
- Une surexpression de protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xl) conduisant à l'inhibition partielle, ou totale, de l'induction de mort cellulaire.

La **figure 11** illustre la chimiorésistance résultant de la liaison du cisplatine à l'ADN. Après la formation des adduits au niveau de l'ADN, un processus de survie cellulaire (et par la même, de résistance à la drogue) peut survenir en raison de mécanismes tels que : réparation de l'ADN, suppression des adduits, ou encore phénomènes de tolérance.

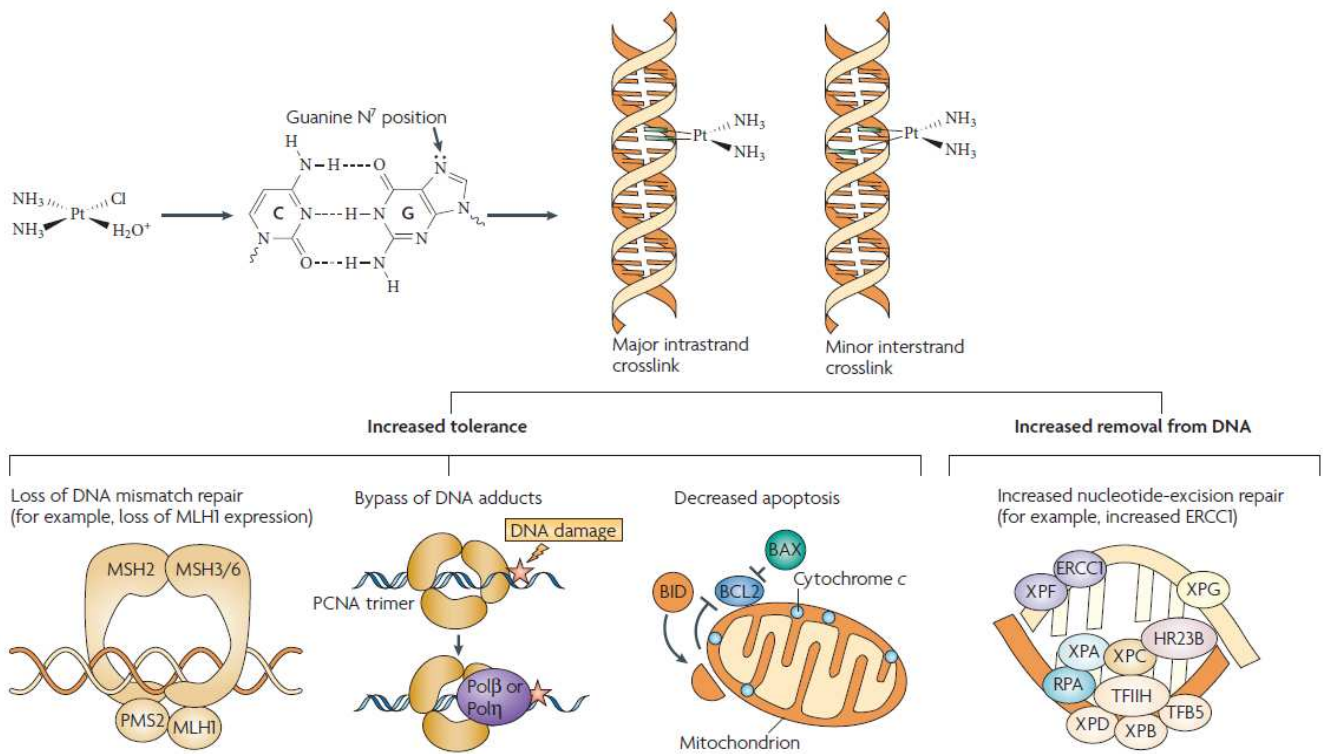


Figure 11 : Chimiorésistance résultant de la liaison du cisplatine à l'ADN (Kelland, 2007)

Il a été démontré que de nombreuses tumeurs résistantes au cisplatine présentaient une capacité de réparation de l'ADN accrue en comparaison avec d'autres tumeurs sensibles à cette drogue. Des quatre principales voies de réparation de l'ADN (NER ou réparation par excision de nucléotide ; BER ou réparation par excision de base ; MMR ou réparation d'un mésappariement de base ; réparation de cassures double-brin), le NER est la principale voie permettant la réparation des lésions provoquées par le cisplatine. Ainsi, dans de nombreux cas, les tumeurs résistantes au cisplatine possèdent un système de réparation NER surexprimé.

Une augmentation de la tolérance aux dommages de l'ADN induits par les sels de platine peut également survenir en raison d'une perte de fonction du système de réparation MMR. La perte de ce système de réparation provoque une résistance envers le cisplatine et le carboplatine, mais, de manière intéressante, n'agit pas sur l'efficacité de l'oxaliplatine.

Lors de la réparation par le système MMR, les adduits provoqués par le cisplatine sont reconnus par les protéines MSH2, MSH3 et MSH6 de ce système. On considère qu'après avoir entamé plusieurs cycles de réparation non aboutis, les cellules entament un processus apoptotique. En ce qui concerne les adduits formés par le cisplatine, la perte du système MMR résulte en une réduction de l'apoptose, et par conséquent en une résistance envers cette drogue. Dans le cas de l'oxaliplatine, les protéines de reconnaissance du système MMR ne vont pas reconnaître les adduits de l'ADN induits par l'oxaliplatine, favorisant la mort des cellules tumorales (Kelland *et al.*, 2007).

2. La poly(ADP-ribose)polymérase 1 (PARP-1) et ses inhibiteurs

La poly(ADP-ribosyl)ation est une modification protéique ubiquitaire impliquée dans la régulation de la transcription, la prolifération cellulaire, la différenciation, la méthylation de l'ADN ou encore de l'apoptose. Elle va moduler les fonctions protéiques en régulant leur activité enzymatique, ou encore leur interaction avec d'autres protéines, l'ADN ou l'ARN (Hakme *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2005 ; Schreiber *et al.*, 2006).

Cette modification protéique va être supportée par les PARP (encore connues sous le nom d'ADP-ribosyltransférases : ADPRTs, ou de poly(ADP-ribose) synthétases), une famille comprenant de nombreuses enzymes eucaryotes. Les membres de cette famille vont être activés en réponse à différents stress cellulaires, et notamment aux coupures transitoires et localisées de l'ADN. Ces coupures peuvent résulter de nombreux processus biologiques tels que la réparation de l'ADN, la recombinaison, l'arrêt des fourches de réplication, les réarrangements de gènes, aussi bien que les stress oxydatifs, les drogues se liant à l'ADN, ou encore dans certaines circonstances, les interactions protéines-protéines en l'absence de dommages à l'ADN (Méglin-Chanet *et al.*, 2010).

Lorsqu'elles sont activées, ces enzymes catalysent rapidement le clivage du NAD^+ en nicotinamide et ADP-ribose qui servira aux réactions de poly(ADP-ribosyl)ation de divers

substrats (histones, facteurs de transcription et sa propre automodification en cas de cassures de l'ADN).

2.1. PARP-1

La PARP-1 est la première protéine de la famille des PARP à avoir été découverte. Responsable de la synthèse de la majorité des polymères d'ADP-ribose (PAR) dans les cellules eucaryotes, elle est, après les histones, la protéine nucléaire la plus abondante (Virag *et al.*, 2002).

Le gène de la PARP-1 est localisé sur le chromosome 1q41-42. D'une taille de 113 kDa, la protéine humaine de la PARP-1 (hPARP-1) est organisée en 6 domaines au minimum, dont 4 possèdent des fonctions bien définies (**Figure 12**).

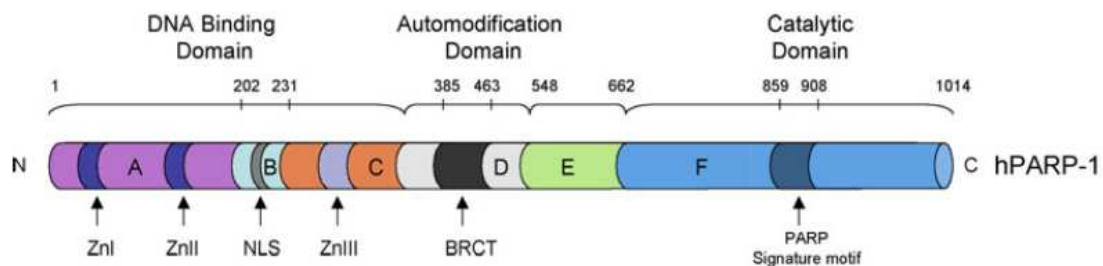


Figure 12 : organisation des différents domaines de la PARP-1 (Méglin-Chanet, 2010)

- Le domaine A de la région N-terminale correspond au domaine de liaison à l'ADN (DBD : DNA-binding domain). Son affinité pour l'ADN endommagé est régulée par deux motifs à doigts de zinc, suffisants pour diriger la protéine vers l'ADN endommagé (Gradwohl *et al.*, 1990). Les deux motifs en doigts de zinc vont reconnaître les structures altérées de l'ADN plutôt que des séquences spécifiques : il a été démontré qu'ils pouvaient reconnaître les coupures simple brin, extrémités franches et autres types de dommages de l'ADN (Gradwohl *et al.*, 1990 ; Lonskaya *et al.*, 2005 ; Petrucco *et al.*, 2008).

- Le domaine B, quant à lui, contient un signal de localisation nucléaire (NLS) ainsi qu'un site de clivage de la caspase-3.
- Le domaine de l'automodification D contient un motif BRCT (BRCA1 carboxy terminus) à travers lequel la PARP-1 va participer à différentes interactions protéines-protéines.
- Le domaine F correspond à la région catalytique C-terminale. Ce domaine peut être réduit à un polypeptide C-terminal de 40 kDa sans pour autant perdre son activité catalytique de base (Simonin *et al.*, 1993).
- Les domaines C et E sont encore mal connus à l'heure actuelle. Cependant, un troisième motif en doigt de zinc a été récemment découvert dans le domaine C de la hPARP-1. Cette région est supposée moduler la communication entre les parties N et C-terminales, conduisant à l'activation ADN-dépendante de la PARP-1 (Langelier *et al.*, 2008). S'il ne se fixe pas directement à l'ADN, ce domaine en doigt de zinc est toutefois nécessaire à l'activation de l'enzyme totale.

En conditions physiologiques, la PARP-1 est associée aux histones, à l'ADN ainsi qu'à d'autres facteurs associés à la chromatine (Tulin *et al.*, 2003).

2.2. PARP-1 et réparation de l'ADN

Un certain nombre de souris « Knock Out » (KO) pour le gène de la *parp-1* ont été générées (de Murcia *et al.*, 1997 ; Masutani *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 1997). Ces animaux sont viables et fertiles, suggérant que l'activité de la PARP-1 n'est pas essentielle à la survie cellulaire en l'absence de stress génotoxique.

Cependant, il a été démontré que les souris et les cellules qui en étaient dérivées présentaient une hypersensibilité envers les radiations ionisantes ainsi que certains agents alkylants (Shall *et al.*, 2000). N'étant pas indispensable à l'activité cellulaire normale, la PARP-1 apparaît cependant comme un élément essentiel à la survie en cas de dommage à l'ADN. Une autre caractéristique de ces souris KO est leur grande instabilité génomique.

Le premier rôle de la PARP à avoir été décrit *in vitro* concerne son implication dans la réponse aux dommages de l'ADN. En effet, la PARP-1 est un capteur des coupures double brin de l'ADN et, à travers son activité de ribosylation, va jouer un rôle clé dans l'organisation temporelle et spatiale de leur réparation (**Figure 13**).

Les principales cibles de cette activité ribosylante sont la PARP-1 elle-même, les histones H1 et H2B, les groupements protéiques à forte mobilité (les composantes de la chromatine autres que les histones), les topo-isomérases I et II, les hélicases de l'ADN, les protéines du système de réparation des coupures simple brin (SSBR) ou du système BER, ainsi que de nombreux facteurs de transcription. A travers sa propre poly(ADP-ribosyl)ation et celle des histones, la PARP-1 permet un relâchement de la chromatine, facilitant l'accès aux cassures de l'ADN. Elle est également impliquée dans le recrutement des composants des systèmes de réparation SSBR et BER (El Khamisy *et al.*, 2003).

L'automodification de la PARP-1 favorise son interaction avec XRCC1 à travers son domaine BRCT, conduisant au recrutement de l'ADN polymérase β et de l'ADN ligase III, complétant ainsi la réparation des CSB.

En plus de son rôle dans le système de réparation BER, la PARP-1 est impliquée dans de nombreux autres processus de réparation de l'ADN, y compris la réparation des CDB. Ainsi, il semblerait que le recrutement des protéines MRE11, NBS1 et ATM au niveau des CDB dépende de l'activité de la PARP-1 (Haince *et al.*, 2008). De plus, la PARP-1 apparaît comme étant une composante du système de réparation alternatif NHEJ (non-homologous end joining) (Wang *et al.*, 2006). Ainsi, lorsque les composantes essentielles du système de réparation NHEJ classique sont absentes, la PARP-1 est recrutée, de même que l'ADN ligase III et probablement l'histone H1, pour la réparation des CDB (Iliakis *et al.*, 2009). En outre, la présence de chaînes de poly(ADP-ribose) au niveau des cassures de l'ADN va empêcher la recombinaison inappropriée d'ADN homologue (Yang *et al.*, 2004).

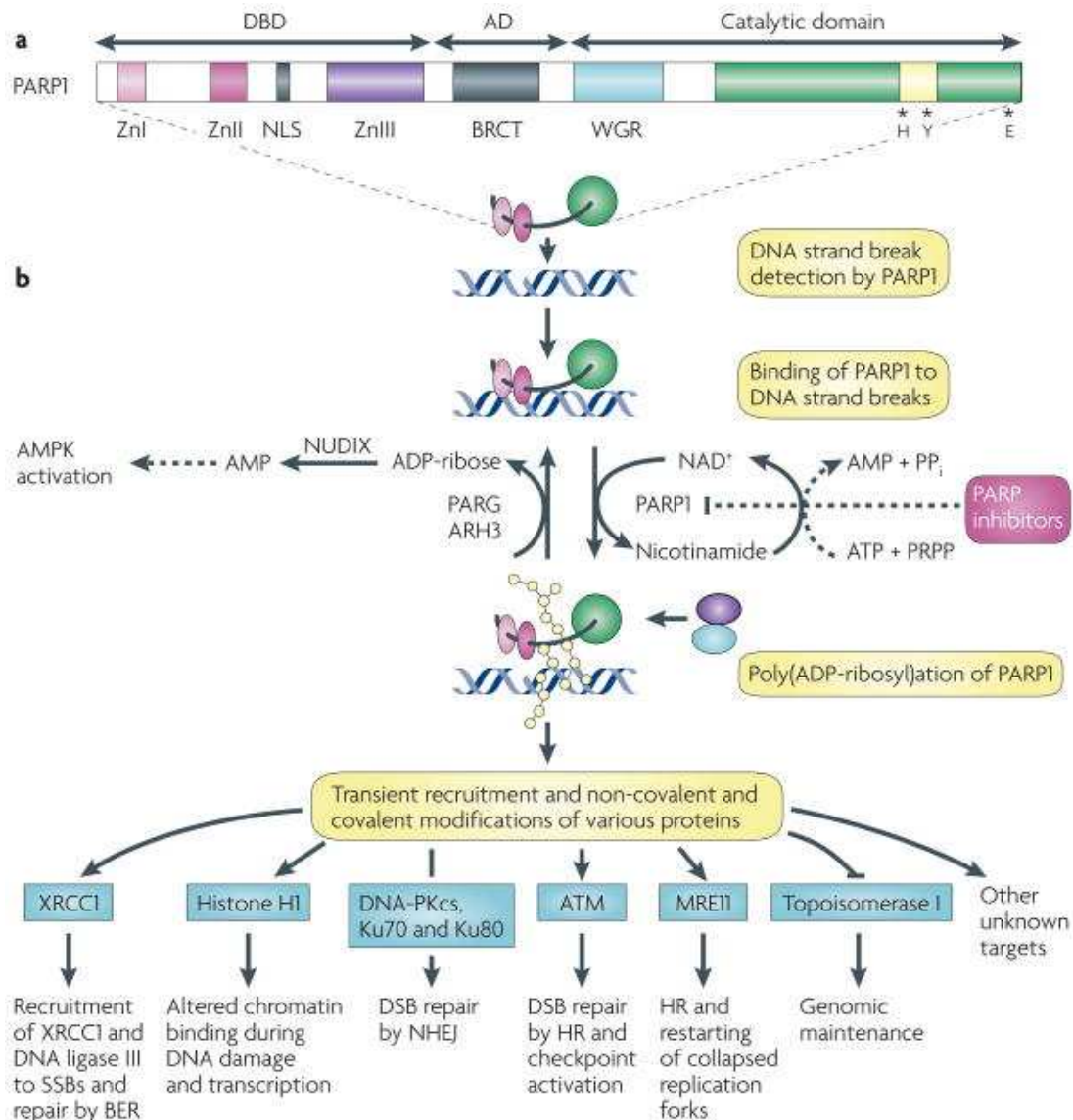


Figure 13 : Caractéristiques structurales et fonctionnelles de la PARP-1

2.3. Inhibiteurs de la PARP et radiosensibilisation

De nombreux travaux portant sur les inhibiteurs de la PARP ont permis de démontrer une augmentation de la cytotoxicité de la radiothérapie due à l'absence de PARP-1 ou de l'inhibition de l'activité PARP. Cet effet est d'autant plus marqué dans les tumeurs à division rapide.

Chalmers et son équipe ont ainsi pu mettre en évidence que l'inhibiteur de la PARP KU-0059436/AZD2281/olaprib augmentait la radiosensibilité de plusieurs lignées cellulaires issues de glioblastomes humains à travers un mécanisme dépendant de la réplication capable de générer des CDB persistantes (Dungey *et al.*, 2008).

Depuis, il a été démontré que l'inhibition simultanée de la recombinaison homologe intensifiait l'effet radiosensibilisateur des inhibiteurs de la PARP dans des cellules de gliomes humains en réplication. Un point nécessite cependant d'être éclairci, à savoir si la radiosensibilité observée, lorsqu'un inhibiteur de la PARP est combiné à des radiations, serait exclusivement due à un système de réparation SSBR défaillant et qui conduirait à l'augmentation des CDB, ou bien si le système de réparation des CDB lui-même est altéré.

L'activité radiosensibilisatrice de l'inhibiteur de la PARP E7016 a également été mise en évidence sur des tumeurs *in vitro* et *in vivo*. De plus, le retard de croissance observé dans un modèle murin de glioblastome multiforme après un traitement combinant E7016, témozolomide et radiothérapie suggère la potentielle application de cette combinaison thérapeutique dans ce type de tumeurs (Russo *et al.*, 2009). Plusieurs études cliniques de phase I ont d'ailleurs récemment débuté dans le but d'évaluer les effets d'une combinaison inhibiteur de la PARP / radiothérapie, sur des patients atteints de glioblastomes ou encore de métastases cérébrales.

Dans nos travaux, nous avons étudié les effets radiosensibilisateurs du PJ-34, un inhibiteur de la PARP-1 que nous avons utilisé en combinaison avec de l'oxaliplatine et des irradiations par neutrons rapides (**Figure 14**).

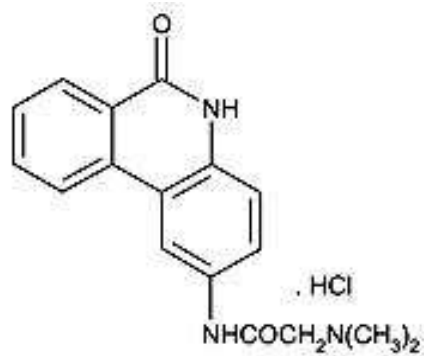


Figure 14 : Formule chimique de l'inhibiteur de la PARP-1 PJ-34

3. RAD001

3.1. Description

Le RAD001 (Novartis Pharma AG, Bâle, Suisse), encore appelé évérolimus, est un nouvel et puissant inhibiteur de la protéine kinase mTOR (mammalian target of rapamycin). C'est un dérivé hydroxyéthyl éther de la rapamycine (**Figure 15**), d'un poids moléculaire de 985,25kD et d'une demi-vie de 30 heures. Initialement développée en tant qu'immunosuppresseur (Certican®) pour prévenir les rejets de greffe chez des patients transplantés, cette molécule a récemment fait preuve d'une importante activité anti-angiogénique et anti-proliférative *in vitro*, de même que sur des modèles de xénogreffes de tumeurs humaines.

Administré oralement, RAD001 a montré son activité antitumorale (réponses tumorales et stabilisations prolongées) dans un large spectre de cancers, et en particulier chez des patients porteurs de carcinomes rénaux métastatiques (Lévy *et al.*, 2008).

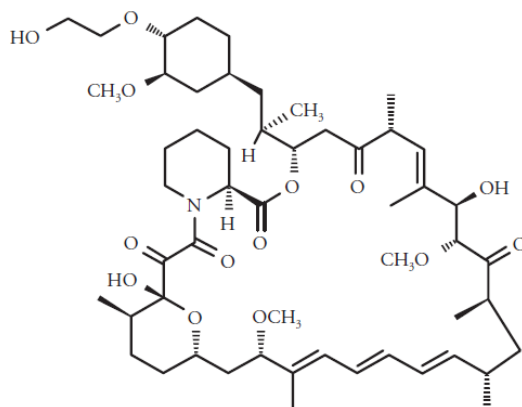


Figure 15 : Formule chimique du RAD001

3.2. Mode d'action : la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR

La rapamycine, encore appelée Sirolimus, est le chef de file des inhibiteurs de mTOR. D'autres inhibiteurs de cette sérine-thréonine kinase ubiquitaire sont actuellement en cours de développement, tels que le Temsirolimus ou encore le Deforolimus.

mTOR est une protéine clé de la voie de signalisation PI3K/AKT. Elle joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions cellulaires, telles que la régulation de la synthèse protéique, la

croissance cellulaire, l'angiogénèse, la prolifération, ou encore la survie cellulaire (Sabatini *et al.*, 2006). Cette voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR étant altérée dans de nombreux cancers (Cortot *et al.*, 2006), la protéine kinase mTOR représente ainsi une cible majeure dans le traitement du cancer et le développement de nouveaux composés antinéoplasiques (Bjornsti *et al.*, 2004 ; Dancey *et al.*, 2005 ; Lévy *et al.*, 2008).

Impliquée dans de nombreuses voies de signalisation, mTOR interagit avec de multiples facteurs de croissance et joue un rôle prépondérant en tant qu'intégrateur métabolique dans la croissance et la survie cellulaire. Elle contrôle la réponse à la stimulation induite par les facteurs de croissance, de même que la réponse cellulaire aux apports d'oxygène, d'énergie et de nutriments du micro-environnement (glucose et acides aminés, par exemple).

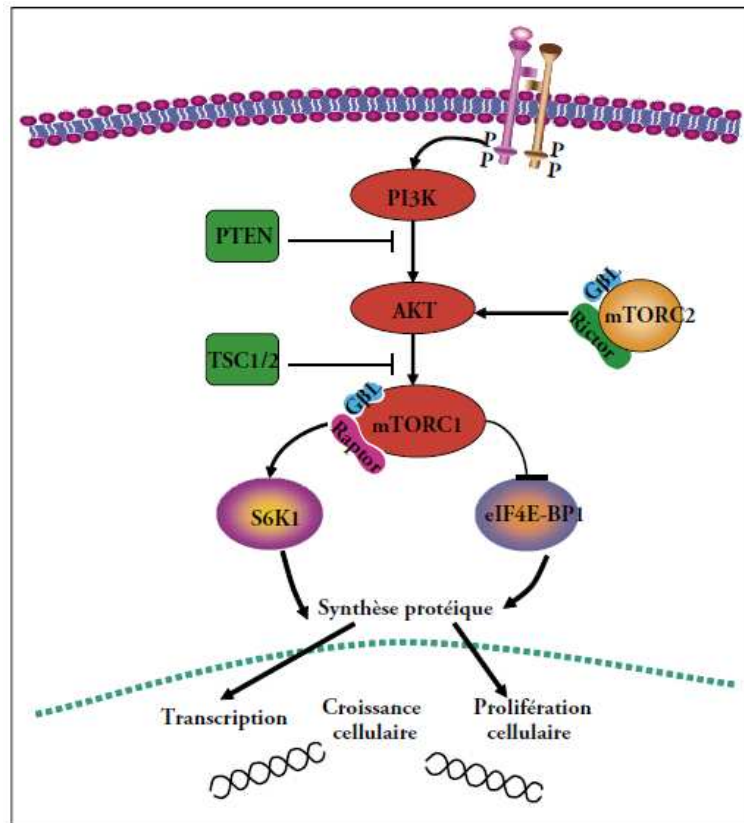


Figure 16 : La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR (Lévy, 2008)

La figure ci-dessus (**Figure 16**) représente mTOR au sein de la voie de signalisation phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/protéine kinase B (Akt). La protéine mTOR est impliquée dans deux complexes, différant de par leur composition, leur fonction et de leur sensibilité à la rapamycine.

En effet, le complexe mTORC1 est composé de mTOR associé à une protéine de régulation, Raptor, ainsi que d'une protéine apparentée à la sous-unité β du complexe protéine G/LST8 (mLST8/G β L). Ce complexe permet d'intégrer les signaux de disponibilité des nutriments et d'énergie, et contrôle la synthèse protéique.

Le complexe mTORC2, quant à lui, est composé de mTOR, associé aux protéines Rictor et G β L. Contrairement à mTORC1, il est insensible à la rapamycine, cette insensibilité étant due à la protéine Rictor. Ce complexe joue un rôle essentiel dans la régulation du cytosquelette et, à travers des mécanismes de phosphorylation, conduit à l'activation d'Akt.

Physiologiquement, c'est-à-dire dans des cellules non tumorales, mTOR agit directement sur le facteur de transcription eIF4E-BP1 et l'activation de la protéine kinase ribosomale S6K1. Ceci aura pour conséquence la régulation de nombreuses fonctions cellulaires telles que : la traduction de protéines impliquées dans la croissance cellulaire ; la progression du cycle cellulaire, et plus particulièrement le passage de la phase G1 à la phase S (Dancey *et al.*, 2005) ; la mobilité cellulaire ; la réponse à différents types de stress : survie en cas de stress cellulaire, ou angiogénèse en cas de stress hypoxique (production de facteur pro-angiogénique VEGF conduisant à la stimulation des cellules endothéliales) (Smolewski *et al.*, 2006).

Cependant, dans certains types tumoraux, les gènes codant pour des protéines impliquées dans l'activation (PI3K, Akt, récepteurs de facteurs de croissance, Ras/Raf) ou dans l'inhibition de m(TOR) (TSC1/2, PTEN) peuvent induire une inactivation de la voie de signalisation ainsi qu'une perte de la fonction de contrôle de mTOR. Ces gènes étant fréquemment mutés, ils peuvent constituer un événement oncogénique majeur dans certains types tumoraux. De plus, la modification des fonctions de mTOR peut également résulter en une modulation de l'expression des éléments situés en aval de mTOR au niveau de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR, contribuant ainsi à la physiopathologie de certains cancers (**Figure 17**).

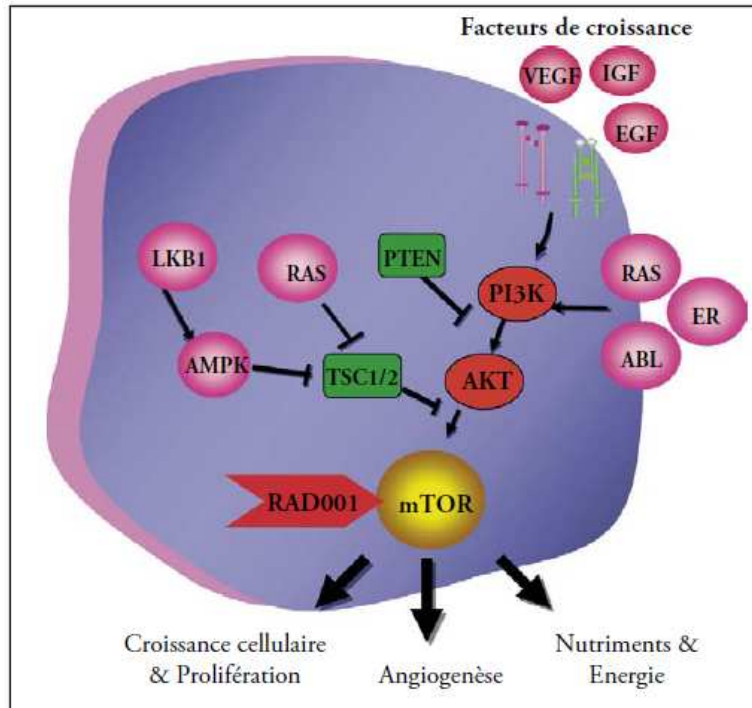


Figure 17 : Conséquences de la modification des fonctions de mTOR (Lévy, 2008)

Comme indiqué précédemment, RAD001 est un inhibiteur spécifique de mTOR. Il va donc pouvoir agir directement en inhibant la croissance cellulaire et la prolifération tumorale, mais également de manière indirecte en réduisant l'apport vasculaire et la néovascularisation des cellules tumorales (diminution de la production des facteurs de croissance pro-angiogénique). En modulant les fonctions d'une cible moléculaire aussi importante que mTOR, RAD001 représente ainsi un nouveau, et très prometteur, traitement des cancers.

3.3. Effet radiosensibilisateur

De récentes données expérimentales ont fait apparaître une potentialisation des radiations ionisantes par RAD001, et ce dans plusieurs modèles tumoraux : des lignées de glioblastome xénotransplantées de manière orthotopique (Eshleman *et al.*, 2002), des cancers bronchiques non à petites cellules (Kim *et al.*, 2008), ainsi que des lignées de cancers coliques et pancréatiques *in vitro* (Manegold *et al.*, 2008).

La résistance envers les radiations ionisantes a été attribuée à de nombreuses mutations au niveau de gènes suppresseurs de tumeurs, des mécanismes de réparation de l'ADN et

l'activation de voies de signalisation. Les voies de signalisation EGFR et PI3K/Akt en particulier, sont impliquées dans le phénomène de radiorésistance et semblent être liées dans le même temps à la régulation des mécanismes angiogéniques.

Les RI vont pouvoir induire l'activation de la famille EGFR (ErbB1-3) et de ses récepteurs tyrosine kinase, en provoquant la transduction du signal à travers les voies de signalisation PI3K et Akt. La phosphorylation de mTOR qui en découle va jouer un rôle fondamental dans la régulation de divers processus traductionnels, en favorisant notamment la synthèse de HIF-1 (**Figure 18**). Comme nous l'avons vu précédemment, HIF-1 est à présent bien caractérisé, et connu pour stimuler l'angiogénèse et la croissance tumorales en initiant l'expression de VEGF et en régulant le métabolisme tumoral ainsi que le cycle cellulaire (Majumder *et al.*, 2004 ; Moeller *et al.*, 2005).

Le phénomène de radiorésistance a été relié à une surexpression de HIF-1, que ce soit par l'intermédiaire de dérivés actifs de l'oxygène ou à travers l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR (Moeller *et al.*, 2004 ; Thomas *et al.*, 2006). Cette voie de signalisation est régulée de manière négative par deux suppresseurs de tumeurs : PTEN (**P**hosphatase and **T**ensin homolog) et TSC2 (Tuberous sclerosis protein 2). Ces derniers sont fréquemment mutés et inactifs dans les cellules tumorales, conduisant à une activation constitutive de la voie PI3K, à la phosphorylation d'Akt ainsi qu'à l'activation de mTOR dans de nombreux types tumoraux (Petroulakis *et al.*, 2006).

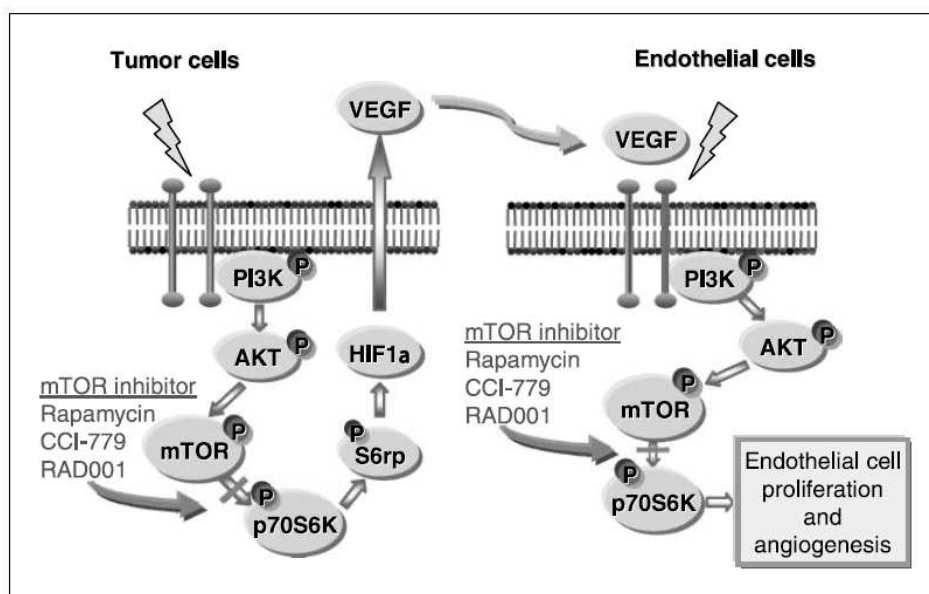


Figure 18 : Phosphorylation de mTOR et stimulation de l'angiogénèse (Manegold, 2008)

En conclusion, mTOR constitue donc une cible moléculaire majeure dans le traitement du cancer, étant donnée la fréquente activation de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR, impliquée dans les phénomènes de radiorésistance et de prolifération cellulaire.

Chapitre II : Les morts cellulaires programmées

Chapitre II : Les morts cellulaires programmées

I. Généralités : les différents types de mort cellulaire

Les différents types de mort cellulaire peuvent être classés en fonction de leur aspect morphologique (apoptotique, nécrotique, autophagique ou associé à la mitose), de critères enzymologiques (implication de nucléases ou de différents types de protéases telles que caspases, calpaïnes, cathepsines et transglutaminases), d'aspects fonctionnels (mort programmée ou accidentelle, physiologique ou pathologique) ou encore de caractéristiques immunologiques (immunogènes ou non) (Melino *et al.*, 2001 ; Kroemer *et al.*, 2009).

Les cellules subissant un processus de mort cellulaire sont engagées dans un mécanisme réversible jusqu'à ce qu'une première phase, appelée « point de non retour », soit dépassée. Une accumulation massive de caspases, une dissipation du potentiel transmembranaire mitochondrial $\Delta\Psi_m$, une perméabilisation complète de la membrane externe mitochondriale ou encore l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS) sont des exemples de ces points de non retour. Il existe cependant des exemples dans lesquels l'activation des caspases survient dans un contexte non létal, de même que la chute du $\Delta\Psi_m$ ou l'exposition de PS qui peuvent être réversibles (Kroemer *et al.*, 2009).

En l'absence d'événements biochimiques clairement identifiés comme des points de non retour, le NCCD (Nomenclature Committee on Cell Death) considère une cellule comme étant morte dès lors qu'elle présente l'un des critères moléculaires ou morphologiques suivants :

- 1) La cellule a perdu l'intégrité de sa membrane plasmique, et ceci est mis en évidence par l'incorporation de colorants vitaux (par exemple l'iodure de propidium) *in vitro*.
- 2) La cellule, de même que son noyau, a subi une fragmentation complète pour former des corps apoptotiques.
- 3) La cellule, ou des fragments de cette cellule, a été ingérée par des cellules adjacentes *in vivo*.

D'autre part, Kroemer suggère qu'il faut être très prudent quant à la dénomination « cellules mortes », qu'il convient de différencier des « cellules mourantes ». De même, les cellules ayant stoppé leur cycle cellulaire (phénomène apparaissant au cours de la sénescence) devraient être considérées comme des cellules vivantes, et l'expression « mort cellulaire répllicative », souvent utilisée par les radiobiologistes pour décrire une perte du pouvoir clonogénique, devrait être abandonnée (Kroemer *et al.*, 2009).

Voici quelques définitions, ou propositions de définitions, des morts cellulaires les plus courantes, mais également de morts cellulaires atypiques.

1. L'apoptose et l'autophagie

Nous reviendrons sur ces deux types de morts plus en détail dans la suite de ce chapitre. Il s'agit en effet des deux types de mort cellulaire principaux observés et étudiés au cours de nos travaux. Nous en aborderons notamment les aspects permettant de les appréhender comme des conséquences directes des radiations ionisantes.

2. La nécrose

La nécrose, ou mort cellulaire nécrotique, est caractérisée morphologiquement par une augmentation du volume cellulaire, une dilatation des organites, une rupture de la membrane cellulaire et une perte subséquente du matériel intracellulaire.

La nécrose a longtemps été considérée comme une forme de mort cellulaire accidentelle et non contrôlée, mais on considère de plus en plus qu'elle serait finement régulée par un ensemble de voies de signalisation et de processus cataboliques (Golstein *et al.*, 2007 ; Festjens *et al.*, 2006). En effet, il a été démontré que des récepteurs à domaine de mort (TNFR1, Fas/CD95 et TRAILR) ainsi que des récepteurs Toll-like (TLR3 et TLR4) étaient impliqués dans le phénomène nécrotique. La mort cellulaire médiée par les récepteurs TNFR1, Fas/CD95, TRAILR et TLR3 dépendrait de la kinase RIP1. Ceci a été démontré par différentes techniques de KO ou de régulation négative de cette kinase, mais également par une inhibition chimique de RIP1 par la nécrostatine-1 (Degterev *et al.*, 2008 ; Kalai *et al.*, 2002).

De nombreux médiateurs, organites et processus cellulaires ont été impliqués dans la mort cellulaire nécrotique, mais leur mode d'action est encore mal connu. Il en est de même pour les éléments déclencheurs de la nécrose. Ces phénomènes incluent des altérations mitochondriales, des changements au niveau des lysosomes et du noyau, une dégradation des lipides, une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium ainsi qu'une activation de protéases telles que les calpaïnes et les cathepsines.

Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus concernant les changements biochimiques qui permettraient de caractériser la nécrose sans équivoque. En l'absence d'un dénominateur biochimique commun, la mort cellulaire nécrotique est le plus souvent définie par l'absence de marqueurs apoptotiques ou autophagiques (Kroemer *et al.*, 2009).

3. La kératinisation / cornification

La kératinisation est un type très spécifique de mort cellulaire programmée qui apparaît au niveau de l'épiderme, et qui se distingue morphologiquement et biochimiquement de l'apoptose. Elle conduit à la formation de cornéocytes, c'est-à-dire des kératinocytes morts contenant un amalgame de protéines (notamment de la kératine) et de lipides, nécessaires aux fonctions de la couche cornée de la peau, à savoir : résistance, élasticité, imperméabilité à l'eau et stabilité structurale.

Dans les faits, la cornification est le plus souvent mentionnée en tant que « kératinisation » ou encore de « formation de l'enveloppe cornée » (Candi *et al.*, 2005 ; Lippens *et al.*, 2005). Ce type de mort cellulaire est généralement considéré comme un phénomène de différenciation terminale similaire à ceux ayant lieu dans les tissus à cellules anucléées.

Au niveau moléculaire, la cornification fait suite à un mécanisme spécifique de différenciation épithéliale au cours duquel les cellules vont exprimer la totalité des enzymes et substrats nécessaires à la formation de la barrière épithéliale, permettant l'isolation de l'organisme du milieu environnant.

4. Les morts cellulaires atypiques

4.1. *La catastrophe mitotique*

Il s'agit d'un type de mort cellulaire qui apparaît pendant ou peu de temps après un dysfonctionnement de la mitose. Elle peut être accompagnée par des altérations morphologiques, telles que des micronucléations ou des multinucléations. Les micronucléations résultent souvent d'une distribution non équitable des chromosomes ou de fragments de chromosomes entre les noyaux des cellules filles. Les multinucléations quant à elles résultent d'une séparation déficiente au moment de la cytokinèse, à l'origine de cellules possédant plusieurs noyaux. Ces noyaux peuvent être de taille identique ou hétérogène.

Il n'existe cependant pas de consensus concernant l'utilisation du terme « catastrophe mitotique » (Roninson *et al.*, 2001 ; Castedo *et al.*, 2004 ; Okada *et al.*, 2004) , et ce type de mort peut conduire à une morphologie apoptotique ou à la nécrose (Vakifahmetoglu *et al.*, 2008).

4.2. *L'anoïkis*

L'apoptose induite par le détachement de la cellule de son substrat ou des cellules avoisinantes est appelée « anoïkis » (Gilmore *et al.*, 2005). En dépit d'une induction spécifique de l'anoïkis, les mécanismes moléculaires de ce type de mort cellulaire seraient proches de ceux activés lors de l'apoptose classique.

4.3. *L'excitotoxicité*

Ce type de mort cellulaire a été observé dans les neurones stimulés par des acides aminés excitateurs, tel que le glutamate, conduisant à l'ouverture de canaux calciques, une augmentation du Ca^{2+} cytosolique et une activation des voies de signalisation de mort cellulaire (Orrenius *et al.*, 2003). Il semblerait que l'excitotoxicité apparaisse de manière concomitante avec d'autres types de mort, tels que l'apoptose et la nécrose, et que le point de non retour dans ce cas soit une perméabilisation de la membrane mitochondriale.

4.4. *La dégénérescence wallérienne*

Il ne s'agit pas d'une mort cellulaire à proprement parler, mais plutôt d'une forme de catabolisme cellulaire ayant lieu au sein du système nerveux. Au cours de ce phénomène, une partie du neurone ou de l'axone va dégénérer, sans que cela n'affecte le reste du corps cellulaire. La cellule subissant cette dégénérescence va rester en vie (Raff *et al.*, 2002).

4.5. *La paraptose*

A l'origine, ce terme a été introduit afin de décrire une forme de mort cellulaire programmée biochimiquement et morphologiquement différente de l'apoptose. Dans de nombreux types cellulaires, il semblerait que la paraptose soit déclenchée par l'expression du récepteur I du facteur de croissance insuline-like et soit associée à une vacuolisation cytoplasmique ainsi qu'une dilatation mitochondriale, mais sans autres caractéristiques morphologiques de l'apoptose. Ce type de mort serait caspases-indépendant et la surexpression de protéines anti-apoptotiques, telles que Bcl-2, n'empêcherait pas l'apparition de la paraptose. A l'heure actuelle, les voies de signalisation conduisant à ce phénomène sont encore mal connues (Sperandio *et al.*, 2000).

4.6. *La pyroptose*

Ce type de mort cellulaire a été décrit dans des macrophages infectés par différentes bactéries (telles que *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri* ou encore *Bacillus anthracis*). Ces macrophages présentaient des caractéristiques de l'apoptose, notamment l'activation de certaines caspases, mais également de la nécrose. De plus, la pyroptose, accompagnée de la libération d'interleukine (IL)-1 β et d'IL-18, jouerait un rôle dans la réaction inflammatoire locale et systémique (Labbe *et al.*, 2008).

4.7. *La pyronécrose*

Cette forme de mort cellulaire est très similaire à la pyroptose. Elle concerne également les macrophages infectés par *Salmonella flexneri*. Ces deux morts se distinguent cependant par le

fait que la pyronécrose ne requiert pas l'activation des caspases, notamment la caspase-1 (Martinon *et al.*, 2007).

4.8. L'entose

Elle a été décrite comme une forme d'auto-cannibalisme des lymphoblastes chez les patients atteints de la chorée de Huntington. Il s'agit d'un processus tout à fait particulier au cours duquel une cellule va s'engouffrer dans une cellule voisine vivante et provoquer sa mort (Overholzer *et al.*, 2007). De manière intéressante, les cellules MCF-7 (issues d'une tumeur du sein) seraient particulièrement enclines à ce type de mort, bien que déficientes en caspase-3 et Beclin-1. L'entose représenterait ainsi un type de mort alternatif, lorsque les autres voies cataboliques sont supprimées.

II. L'apoptose

L'expression « apoptose » a été introduite par Kerr *et al.* afin de décrire une mort cellulaire à l'aspect morphologique spécifique (Kerr *et al.*, 1972).

L'apoptose se caractérise par les critères morphologiques suivants :

- un arrondissement de la cellule
- une rétractation des pseudopodes
- une réduction du volume cellulaire (pycnose)
- une condensation de la chromatine
- une fragmentation nucléaire (caryorrhexis)
- peu ou pas de modification des organites intracellulaires
- un bourgeonnement de la membrane plasmique (celle-ci garde son intégrité jusqu'au stade final de l'apoptose)
- une phagocytose des cellules apoptotiques (*in vivo*).

L'apoptose est un processus physiologique normal, intervenant dans le développement des organismes pluricellulaires, l'homéostasie tissulaire chez l'adulte et la défense contre des agents pathogènes.

Elle peut être activée par des stimuli divers, tels que : la stimulation de récepteurs de mort ; la carence en facteurs trophiques ; l'action d'agents génotoxiques (les radiations ionisantes, par exemple) ; des chocs thermiques ou osmotiques ; le détachement de la matrice extracellulaire (anoïkis) ; l'exposition à des drogues cytotoxiques ; ou encore l'infection par des virus ou des bactéries.

Il existe deux voies principales à l'origine du déclenchement de la mort cellulaire apoptotique : la voie intrinsèque ou voie « mitochondrie-dépendante », ainsi que la voie extrinsèque ou voie des « récepteurs de mort » (**Figure 19**). Ces deux voies vont toutes deux conduire à l'enclenchement du processus apoptotique, et ce à travers l'activation de protéines appartenant à trois familles principales :

- la famille Bcl-2 (que nous décrirons plus en détail dans la partie III de ce chapitre, étant donnée l'implication de cette famille dans la mort cellulaire autophagique)

- les caspases : les caspases initiatrices ou régulatrices se situent en amont de la cascade de signalisation apoptotique et vont permettre l'activation des caspases effectrices ou exécutrices, conduisant au clivage de nombreuses protéines et ainsi aux étapes finales de l'apoptose
- Apaf-1 : cette protéine va participer, avec le Cyt-C issu de la mitochondrie, à la formation de l'apoptosome

Il existe également une voie de signalisation caspase-indépendante qui va mettre en jeu la protéine mitochondriale AIF (Apoptosis Inducing Factor).

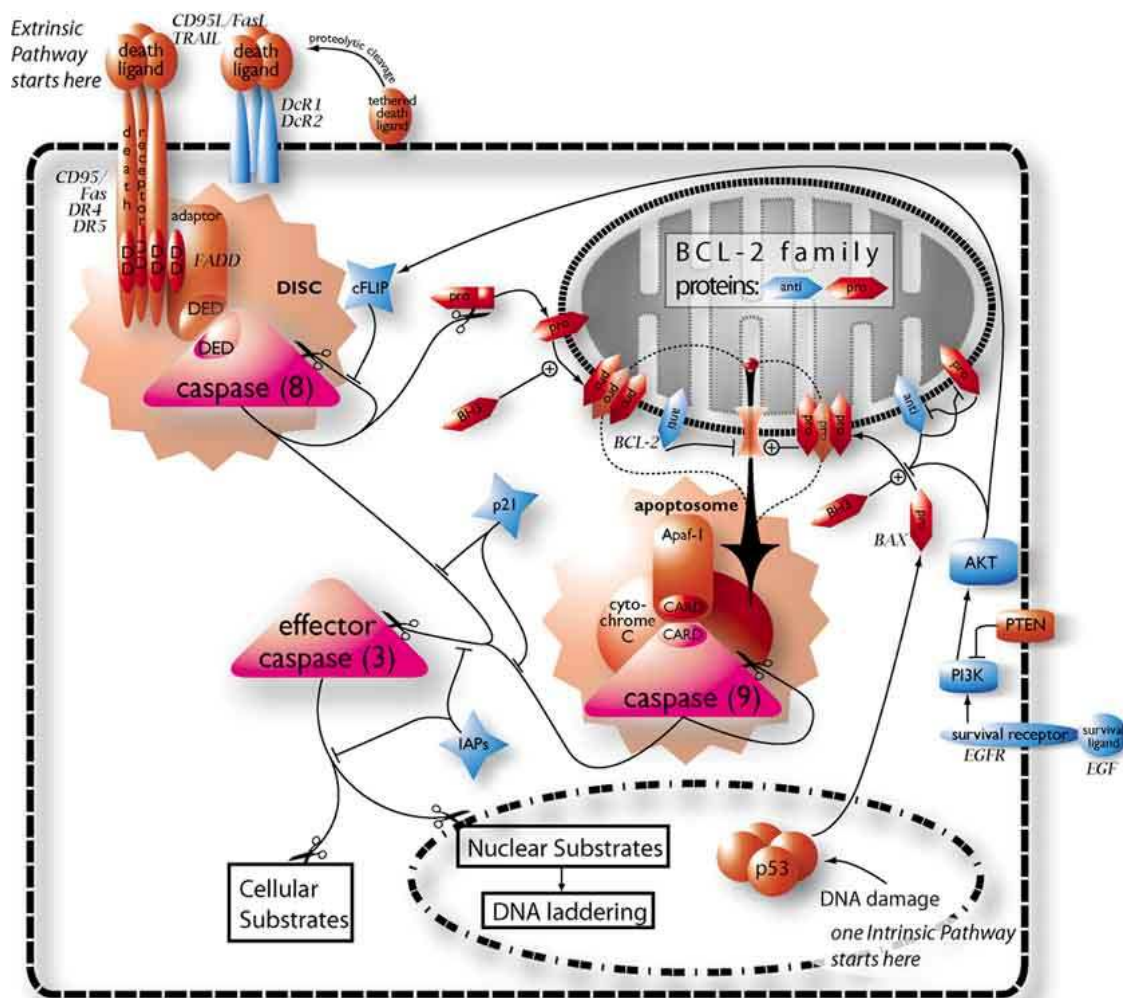


Figure 19 : Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose (Bögler, 2002)

A l'heure actuelle, les différentes voies de signalisation du processus apoptotique sont très bien caractérisées. Nous ne nous attarderons donc pas sur cette mort cellulaire programmée de type I, mais nous tenterons d'explorer plus en profondeur le processus autophagique, encore connu sous le nom de « mort cellulaire programmée de type II », et dont le rôle dans le cancer et ses traitements apparaît de plus en plus décisif, à mesure de l'avancée des connaissances dans ce domaine.

De plus, la frontière entre apoptose et autophagie semble de plus en plus confuse, ces deux processus interagissant de manière complexe l'un envers l'autre.

III. L'autophagie

1. Généralités

L'autophagie, ou mort cellulaire programmée de type II, est un processus catabolique intracellulaire indispensable à la dégradation et au recyclage de protéines, de ribosomes, mais également d'organites tels que le RE, les mitochondries ou encore l'appareil de Golgi (Klionski *et al.*, 2000).

Ce phénomène peut se déclencher en condition physiologique, dans des cellules normales privées de nutriments ou de facteurs de croissance, mais également en réponse à différents stress cellulaires, tels que l'hypoxie, l'exposition à des radiations ionisantes, ou encore à des drogues cytotoxiques (Dunn *et al.*, 1994 ; Klionsky *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2003 ; Meijer *et al.*, 2004).

Lors de l'initiation du processus autophagique, les protéines et organites devant être dégradés sont séquestrés dans des structures vacuolaires, appelées autophagosomes, et délimitées par une double membrane. Ceux-ci, en fusionnant avec les lysosomes, vont former des autolysosomes à l'intérieur desquels le matériel cytoplasmique séquestré va être dégradé par les enzymes lysosomales, assurant ainsi un recyclage de ce matériel (Eskelinen *et al.*, 2005 ; Kondo *et al.*, 2005 ; Kroemer *et al.*, 2005) (**Figure 20**).

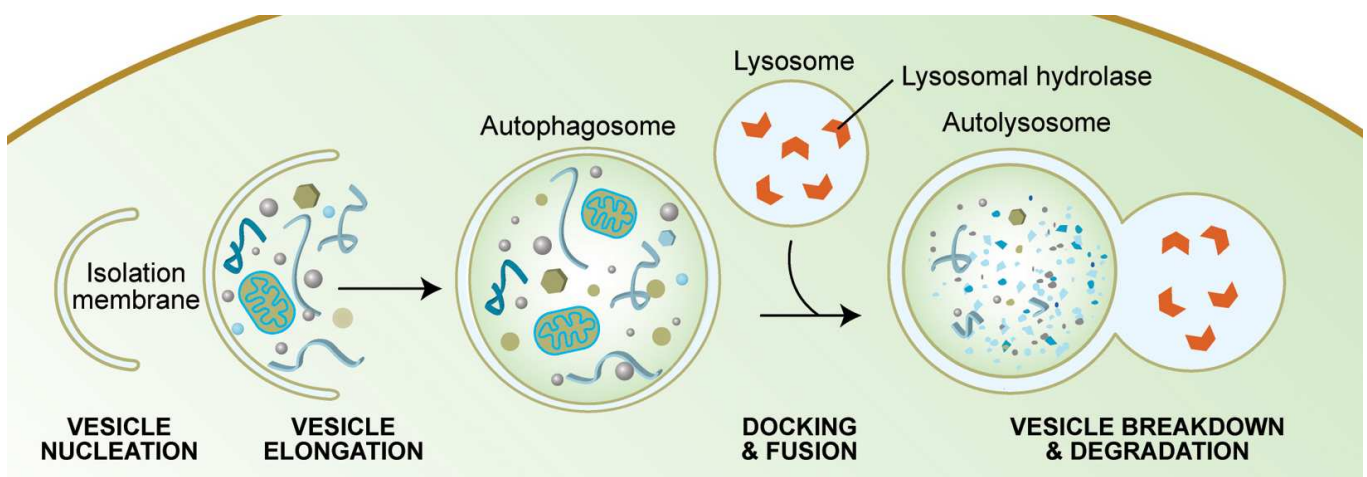


Figure 20 : Les étapes du processus autophagique (Meléndez, 2009)

Connue pour être un mécanisme de protection permettant la survie cellulaire dans des conditions de croissance ou environnementales défavorables, de récents travaux ont montré que l'autophagie pouvait, à l'inverse, conduire à la mort cellulaire.

Cependant, en dépit du nombre croissant d'études consacrées au rôle de l'autophagie dans les cellules tumorales, son importance reste encore très controversée à l'heure actuelle. En effet, tandis que certains auteurs considèrent ce processus comme un moyen d'éradication des tumeurs, d'autres avancent l'hypothèse selon laquelle il s'agirait d'un système permettant l'échappement des cellules tumorales soumises à des agents cytotoxiques, favorisant ainsi leur survie (Jin *et al.*, 2007 ; Codogno *et al.*, 2005). Cet échappement serait, entre autre, dû à un blocage des voies de signalisation apoptotiques (Gonzales-Polo *et al.*, 2005). Ainsi, le rôle joué par l'autophagie dans la progression tumorale et dans la réponse des cellules tumorales aux agents antinéoplasiques reste encore très discuté.

Quoiqu'il en soit, l'autophagie suscite un intérêt grandissant des cancérologues, car sa modulation pourrait offrir la possibilité d'améliorer l'efficacité des thérapies anticancéreuses. De nouvelles approches thérapeutiques, en cours d'étude, sont d'ailleurs basées sur l'utilisation de substances capables d'influencer les régulateurs moléculaires de l'autophagie (Kondo *et al.*, 2006 ; Ricci *et al.*, 2006 ; Hippert *et al.*, 2006 ; Amaravadi *et al.*, 2007).

2. Aspects morphologiques et caractéristiques de l'autophagie

L'autophagie a été décrite pour la première fois en 1966, dans des cellules de mammifères privées de sérum et d'acides aminés (De Duve *et al.*, 1966). Le terme « autophagie » a été adopté suite aux observations faites en microscopie électronique, montrant des vacuoles à membranes simples ou doubles et contenant des parties de cytoplasme. Les progrès techniques réalisés en matière de microscopie ont par la suite permis de déterminer les différentes étapes de ce processus.

2.1. Les vacuoles autophagiques

Les modifications ultrastructurales et morphologiques qui caractérisent la réponse autophagique induite par des agents cytotoxiques ont été étudiées à de nombreuses reprises en microscopie électronique, la méthode « gold standard » permettant l'identification des

autophagosomes et ainsi de distinguer l'autophagie des autres types de mort cellulaire, tels que l'apoptose ou la nécrose.

Tandis que les cellules apoptotiques sont caractérisées par un bourgeonnement de la membrane et un noyau pycnotique contenant de la chromatine condensée, les cellules autophagiques quant à elles se caractérisent par une membrane plasmique et un noyau intacts, une intense vacuolisation du cytoplasme, une dilatation de l'appareil de Golgi et du RE.

Les analyses faites en microscopie électronique à transmission (MET, **Figure 21**) sur des sections ultrafines ont permis de décrire les différents stades de l'autophagie.

Le premier stade consiste en la formation d'une citerne membranaire, appelée phagophore ou membrane d'isolation. Celle-ci va s'enrouler sur elle-même après une étape d'élongation, emprisonnant une partie du cytoplasme, et va former une structure appelée autophagosome. Ce dernier va ensuite fusionner avec un lysosome pour former un autophagolysosome ou autolysosome, dont le contenu va être dégradé par les enzymes lysosomales.

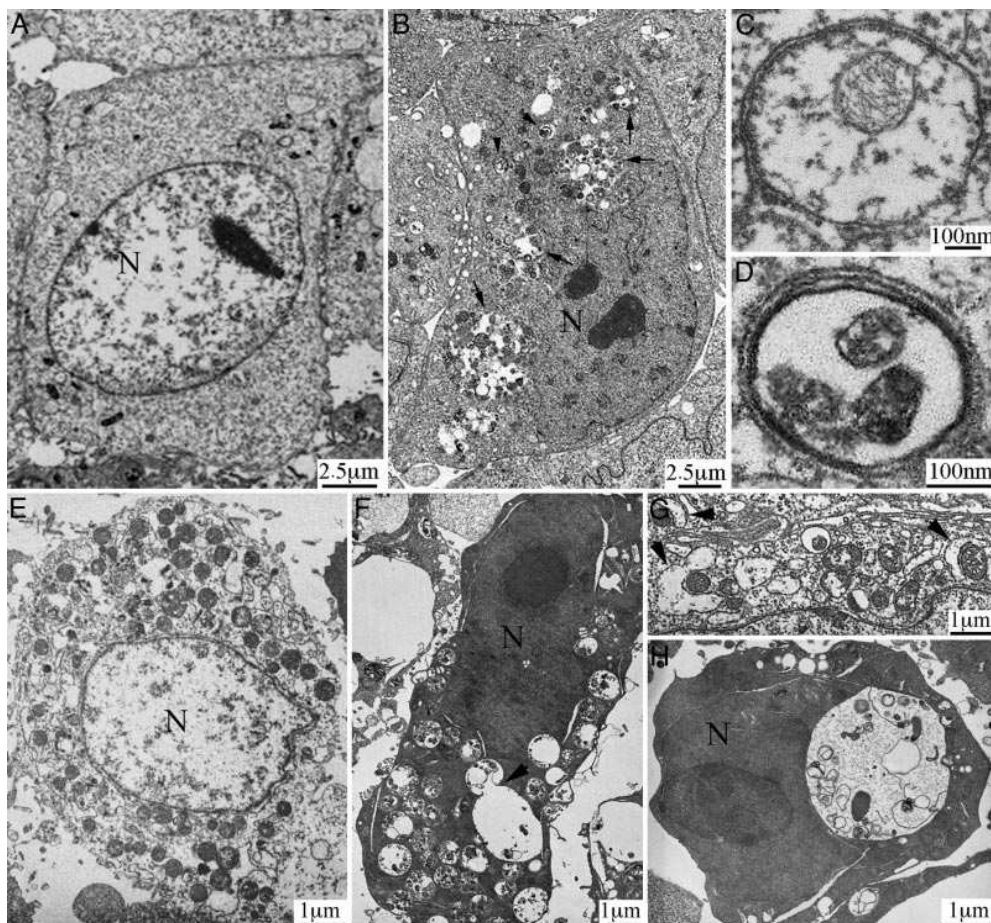


Figure 21 : observation en MET de cellules autophagiques (Shao, 2004)

L'un des critères d'identification des autophagosomes est qu'ils doivent contenir du matériel cytoplasmique ainsi que des organites, tels que RE, mitochondries, ribosomes, et leur densité aux électrons doit être similaire à celle du cytoplasme environnant (**Figure 22**). De plus, ils sont délimités par une double membrane, aisément identifiable par la lumière séparant les deux feuillets (Eskelinen *et al.*, 2008).

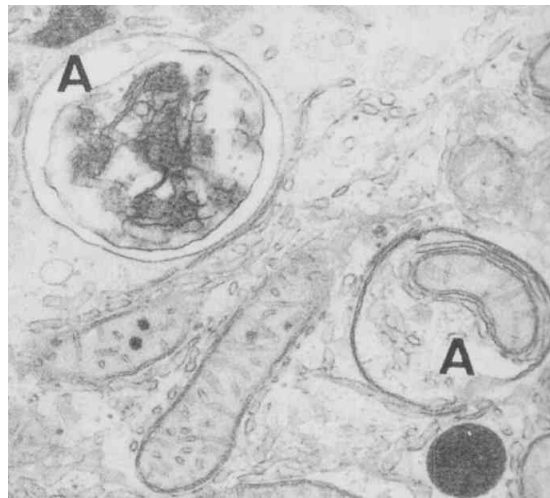


Figure 22 : Observation en MET. Dans l'autophagosome (A) de droite, il est possible d'observer une mitochondrie encore intacte, avant la fusion de l'autophagosome avec un lysosome et la dégradation de son contenu

Les autophagosomes peuvent également interagir avec la voie de l'endocytose pour former un amphisome (**Figure 23**). Même s'il a été établi que la maturation des autophagosomes était favorisée par une interaction autophagosomes - endosomes, certains autophagosomes peuvent fusionner directement avec des lysosomes, sans qu'il y ait formation d'amphisome.

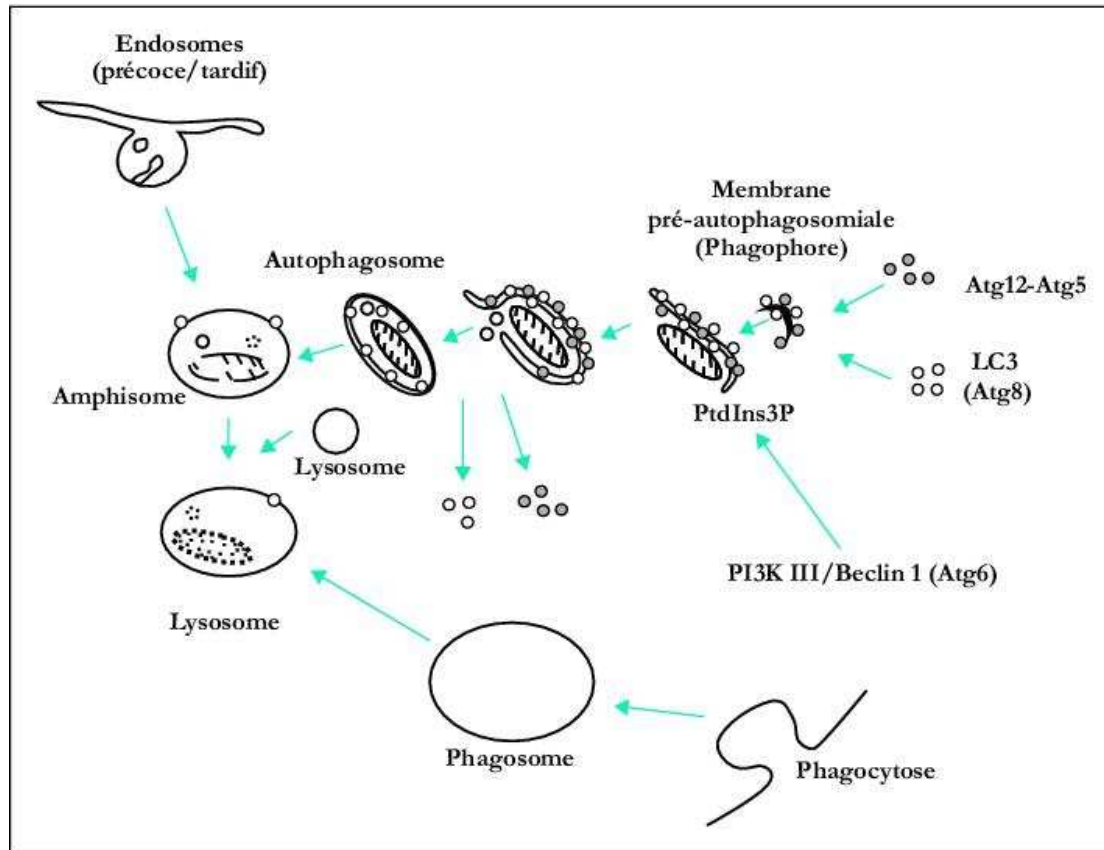


Figure 23 : Interaction entre les autophagosomes et les endosomes au cours du processus autophagique (Meley, 2006)

Lors de la dégradation du contenu des autolysosomes par les enzymes lysosomales, la densité aux électrons de ces autolysosomes augmente tandis que la membrane interne, également dégradée, tend à disparaître. Les autolysosomes tardifs apparaissent donc comme des vacuoles délimitées par une membrane unique.

Une autre technique permettant de visualiser les autophagosomes est un marquage spécifique de la protéine MAP1-LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3), constitutive de la membrane des autophagosomes (Kabeya *et al.*, 2000). Après induction d'autophagie dans les cellules, il est possible d'observer spécifiquement les autophagosomes en microscopie à fluorescence après un immunomarquage à l'aide d'un anticorps anti-LC3 ou après transfection avec un plasmide pEGFP-LC3.

Enfin, il est possible d'inhiber la formation des autophagosomes, et ce grâce à différents types d'inhibiteurs. C'est le cas de la 3-méthyladénine (3-MA) et de la wortmannine, qui vont inhiber la formation des autophagosomes à un stade précoce en ciblant la PI3K, mais également de la bafilomycine A1, qui va agir à un stade beaucoup plus tardif en inhibant la fusion des autophagosomes avec les lysosomes.

2.2. Les origines de l'autophagosome : le phagophore

Même si l'autophagie a été découverte et observée au ME depuis plus de quarante ans, l'origine de la membrane pré-autophagosomale, ou phagophore, est encore mal connue.

Le phagophore est principalement constitué de lipides et est pauvre en protéines (Eskelinen *et al.*, 2008). De nombreux organites ont été proposés comme étant à l'origine de cette membrane.

Axe et ses collègues ont notamment suggéré l'implication du réticulum endoplasmique dans la formation de ce phagophore (Axe *et al.*, 2008). Lors de l'induction d'autophagie dans les cellules, ces auteurs ont pu observer la formation de protrusions (appelées omégasomes) au niveau du RE, et que celles-ci interagissaient de manière dynamique et continue avec les autophagosomes en formation (**Figure 24**).

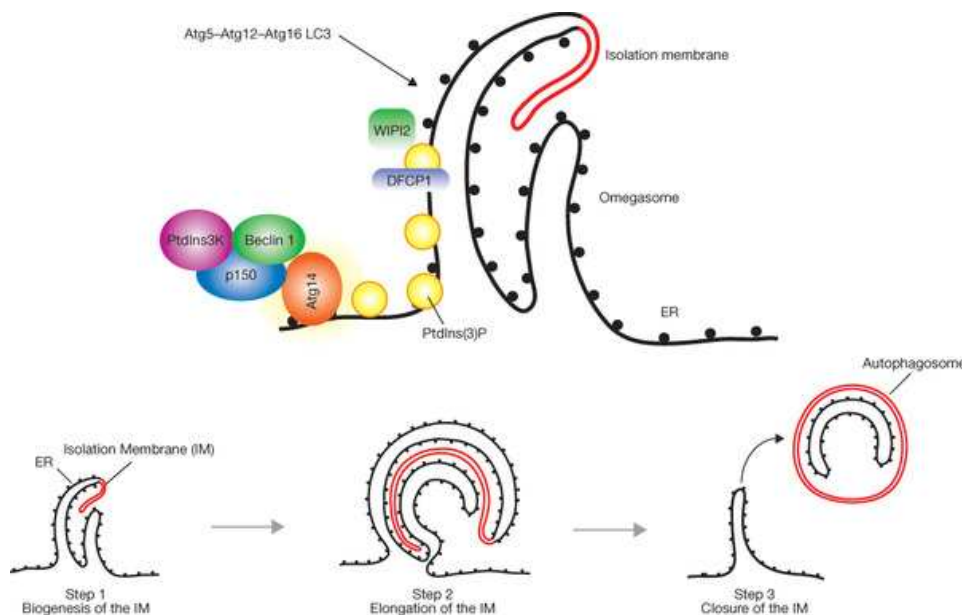


Figure 24 : Implication de l'oméga-some dans la formation de la membrane d'isolation (Tooze, 2010)

D'autre part, il a été établi que l'une des rares protéines constituant la membrane des autophagosomes était la protéine LC3. Au niveau de la membrane, LC3 est conjuguée à un phospholipide, la phosphatidyléthanolamine (PE), formant ainsi le complexe LC3-PE (Tanida *et al.*, 2004). Ce complexe étant impliqué dans la formation de la membrane d'isolation, la découverte de l'organite à l'origine de la PE pourrait permettre une meilleure compréhension concernant la provenance du phagophore. Certaines hypothèses proposent la mitochondrie comme étant à l'origine du stock de PE, tandis que d'autres auteurs suggèrent que le réticulum endoplasmique pourrait en être la source.

En dépit de nombreux modèles expérimentaux, l'origine du phagophore est toujours, à l'heure actuelle, source de nombreuses polémiques.

2.3. La sélectivité de l'autophagie

Plusieurs organites pouvant être sélectivement ciblés lors de la réponse autophagique, plusieurs formes d'autophagie ont été rapportées dans les cellules de mammifères : RE-phagie, ribophagie, mitophagie ou encore pexophagie (Beau *et al.*, 2008).

Ainsi, un stress du RE (stress réticulaire) va provoquer l'induction du processus autophagique, conduisant à la séquestration spécifique puis à la dégradation du RE. Ce processus, appelé RE-phagie ou encore réticulophagie, représente un mécanisme alternatif de clairance des protéines non attribuées et accumulées dans la lumière du RE (Yorimitsu *et al.*, 2007).

La ribophagie représente un autre type d'autophagie spécifique, au cours duquel les ribosomes vont être engloutis par les autophagosomes (Kraft *et al.*, 2008). En cas de privation de nutriments, l'élimination sélective des ribosomes limite la traduction des protéines, un processus nécessitant beaucoup d'énergie.

La mitophagie (Lemasters *et al.*, 2005), quant à elle, fait référence à la dégradation sélective des mitochondries au sein des cellules, tandis que la pexophagie permettrait une dégradation des peroxysomes accumulés au sein des cellules de mammifères (Monastyrska *et al.*, 2006).

2.4. Itinéraire des autophagosomes

Un grand nombre de travaux, portant sur des cellules vivantes et fixées, a permis de démontrer que les autophagosomes, formés de manière aléatoire au sein du cytoplasme, avaient tendance à migrer en direction des lysosomes périnucléaires, situés à proximité du centre d'organisation des microtubules. Ces autophagosomes migreraient vraisemblablement le long des microtubules. Le rôle des microtubules au sein du processus autophagique, s'il a été étudié à de nombreuses reprises, reste toutefois un sujet de controverse (Fass *et al.*, 2006 ; Kochl *et al.*, 2006).

De plus, il a été démontré qu'un traitement des cellules au nocodazole (ayant pour conséquence une rupture des microtubules) avant l'induction de l'autophagie avait pour conséquence une diminution significative du nombre d'autophagosomes matures, mais n'affectait en rien leur durée de vie ni leur fusion avec les lysosomes (Fass *et al.*, 2006). Les microtubules sembleraient donc faciliter la maturation des autophagosomes.

3. Cancer et régulation de l'autophagie : les acteurs moléculaires

Une meilleure connaissance des voies de régulation moléculaires de l'autophagie représente un grand espoir dans le domaine de la lutte contre le cancer. En effet, la suppression ou l'induction de ce type de mort cellulaire, combinée à des thérapies antinéoplasiques conventionnelles ou non, pourrait accroître l'efficacité de ces traitements.

Nous en aborderons ici les principales voies de signalisation ainsi que les principales molécules régulatrices connues actuellement.

3.1. La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR

Comme nous l'avons déjà mentionné au cours du chapitre précédent, la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR est altérée dans de nombreux types tumoraux.

La protéine mTOR va réguler le processus autophagique en fonction de la quantité de nutriments et de facteurs de croissance disponibles dans la cellule. En conditions

physiologiques, la voie PI3K/AKT/mTOR est activée, l'autophagie est inhibée, permettant une stimulation de la prolifération cellulaire.

mTOR est une protéine de taille importante (280 kDa) et appartient à la famille des phosphatidylinositol-related kinase (PIKK) (Bhaskar *et al.*, 2007). Elle est constituée de quatre domaines fonctionnels (**Figure 25**) : un domaine FAT (focal adhesion targeting), un domaine FRB (FKBP12 rapamycin binding domain), un domaine kinase ainsi qu'un domaine FATC (un second domaine FAT, situé à l'extrémité carboxy-terminale de la protéine). Le domaine FATC est indispensable à l'activité kinase de mTOR : la délétion d'un simple acide aminé de ce domaine entraîne une suppression de l'activité kinase (Takahashi *et al.*, 2000). Les domaines kinase et FATC agissent de concert afin d'exposer le domaine catalytique de la protéine.

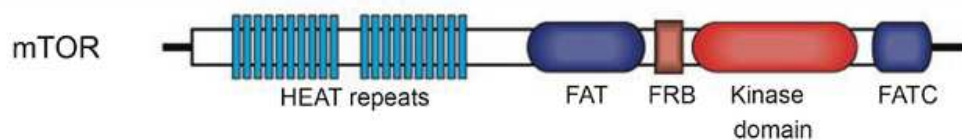


Figure 25 : Les domaines fonctionnels de la protéine mTOR, d'après Yang *et al.*, 2007

En plus de ces différents domaines, mTOR est formée de deux complexes protéiques, structurellement et fonctionnellement distincts : mTORC1 et mTORC2 (**Figure 26**).

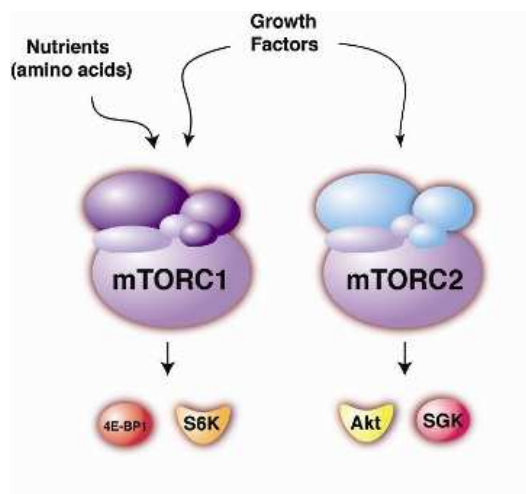


Figure 26 : Complexes protéiques mTORC1 et mTORC2 formant la kinase mTOR

mTORC1 est connu pour être sensible à la rapamycine et est constitué d'une sous-unité mLST8 (GβL) ainsi que de l'adaptateur protéique Raptor (**Figure 27**). mTORC1 contrôle la synthèse protéique, l'approvisionnement en nutriments, de même que l'autophagie.

mTORC2, quant à lui, est caractérisé par sa résistance envers la rapamycine et est constitué de mLST8 (GβL), de SIN1 et de Rictor (**Figure 27**). Ce complexe est impliqué dans la polarisation et la réorganisation de l'actine, de même que la régulation AKT/PKB.

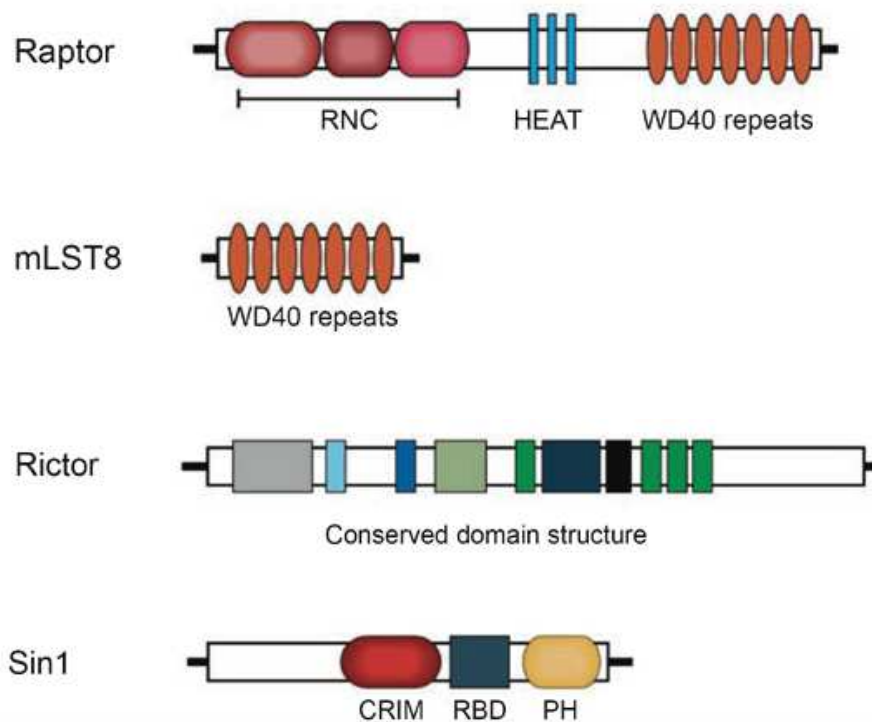


Figure 27 : Domaines protéiques constituant les deux complexes de mTOR

Un équilibre est requis entre ces deux complexes pour le bon fonctionnement de mTOR. Ainsi, dans certaines conditions, la formation d'un complexe au détriment de l'autre peut être favorisée (Hay *et al.*, 2005).

En conditions de privation de nutriments, la voie PI3K/AKT/mTOR est inactivée, l'autophagie n'est plus réprimée et les cellules entrent dans un processus alternatif permettant de générer l'énergie nécessaire à leur survie. Au contraire, lorsqu'un processus tumoral est enclenché, la voie PI3K/AKT/mTOR est souvent activée de manière atypique, et l'interaction entre cette voie et d'autres cascades de signalisation est souvent dérégulée (Steelman *et al.*, 2008).

Dans certaines conditions pathologiques, l'activation anormale de cette voie de signalisation peut conduire à une réduction ou une suppression de l'autophagie. Ce phénomène peut avoir plusieurs causes : la perte ou le « silencing » du suppresseur de tumeur PTEN, l'activation des récepteurs de facteurs de croissance, la surexpression d'AKT, l'exposition à des carcinogènes, ou encore la mutation ou l'amplification de la PI3K (phosphatidylinositol kinase) de classe I.

L'activation de la cascade de signalisation PI3K/AKT/mTOR (**Figure 28**) par des facteurs oncogènes, conduisant à une diminution de l'autophagie, peut provoquer une induction de la croissance tumorale et participer à l'augmentation du taux de nécrose, à l'inflammation locale ainsi qu'à une instabilité génétique tumorale (Degenhardt *et al.*, 2006). En outre, lorsque l'autophagie est réprimée dans certaines cellules tumorales, ces dernières peuvent adopter des mécanismes compensatoires leur permettant de survivre. C'est pourquoi, certaines tumeurs, réfractaires à l'autophagie et ne pouvant donc plus subvenir à leur besoins énergétiques, peuvent inhiber les voies de signalisation apoptotique afin d'assurer leur survie.

Au contraire, dans d'autres tumeurs, lorsque l'action de la PI3K de classe III est modifiée, l'autophagie peut être activée. Cette activation s'effectue par l'intermédiaire de la protéine Beclin-1 (Kroemer *et al.*, 2008), identifiée il y a une dizaine d'années comme étant un suppresseur de tumeur, et faisant le lien entre autophagie et cancer (Liang *et al.*, 1999).

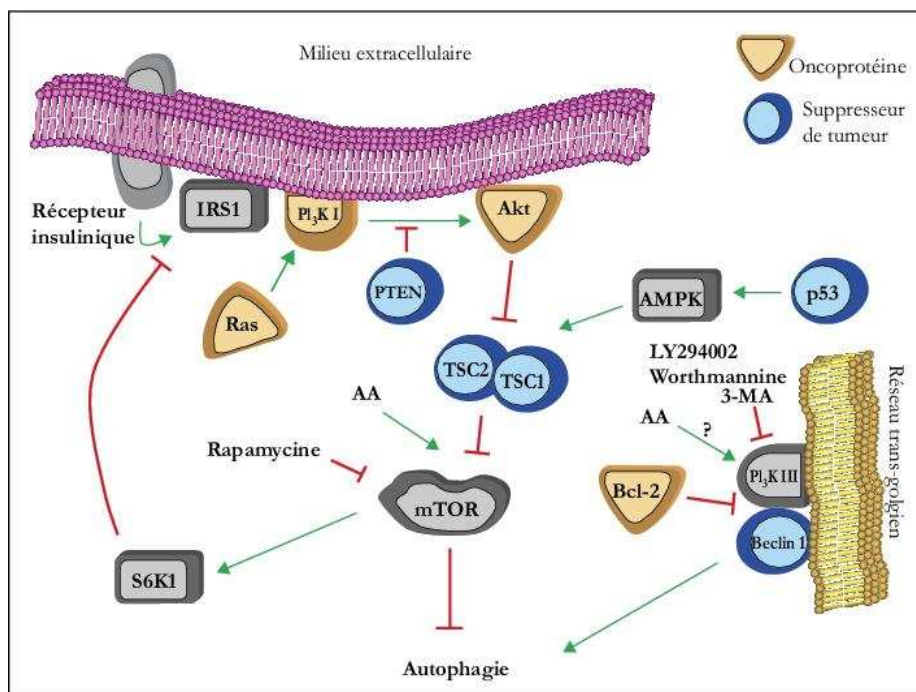


Figure 28 : La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR (Meley, 2006)

3.2. Les protéines de la famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 ont été initialement décrites comme étant des régulateurs de la mort cellulaire, jouant un rôle dans les processus apoptotiques. Elles sont maintenant également connues pour leur implication dans ceux de l'autophagie (Levine *et al.*, 2008) (**Figure 29**).

Tandis que les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w et Mcl-1, encore connues sous le nom d'oncoprotéines, sont capables d'inhiber l'autophagie, les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 telles que Bad, Bik, Puma, Noxa, Bax et Bak peuvent induire ce processus autophagique (Rashmi *et al.*, 2008).

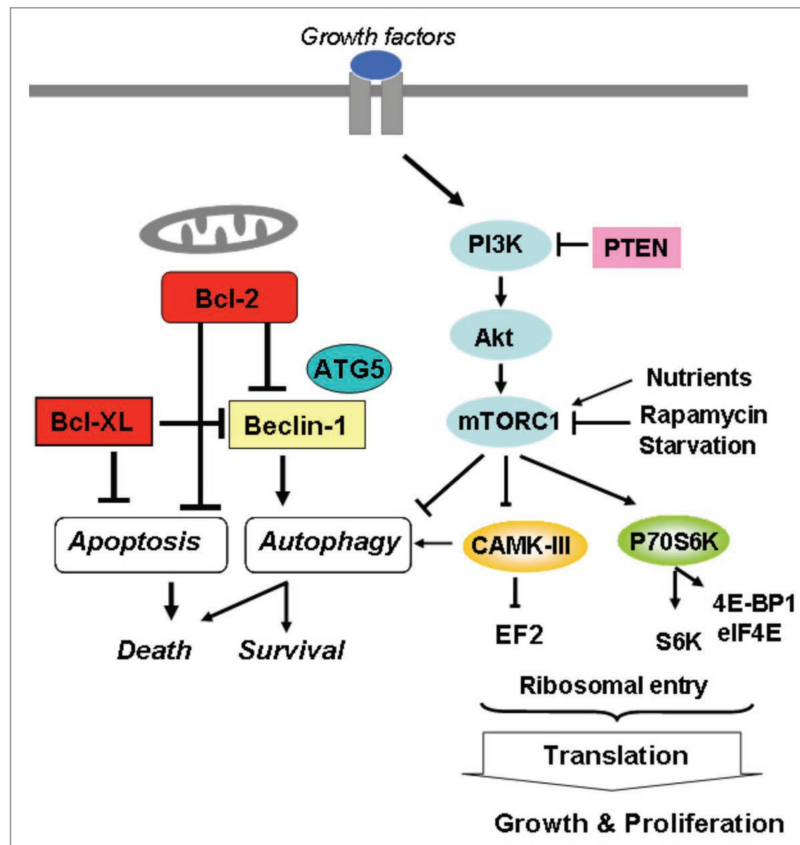


Figure 29 : Implication des protéines de la famille Bcl-2 dans la régulation de l'apoptose et de l'autophagie (Dalby, 2010)

Bcl-2 est le prototype de cette famille de protéines, caractérisée par la présence d'au moins un domaine d'homologie Bcl-2, noté BH.

Chez l'homme et la souris, la famille Bcl-2 est composée de différents types de protéines :

- Des protéines anti-apoptotiques composées de 4 domaines BH (numérotés de BH1 à BH4). C'est le cas de Bcl-2 et Bcl-xl.
- Des protéines pro-apoptotiques composées de 3 domaines BH (notés BH1, BH2 et BH3). C'est le cas de Bax et Bak.
- La sous-famille des protéines pro-apoptotiques à domaine BH3 unique (« BH3-only »). On compte actuellement plus d'une douzaine de membres dans cette catégorie de protéines.

La protéine Beclin-1 (l'équivalent mammifère de la protéine Atg6 de la levure) a initialement été découverte comme interagissant avec Bcl-2 et a été décrite comme étant la première protéine humaine indispensable à l'autophagie (Liang *et al.*, 1999).

En effet, Beclin-1 va se lier à la PI3K (phosphatidylinositol kinase de classe III) Vps34, elle-même associée à la kinase membranaire Vps15. L'activité kinase lipidique du complexe multiprotéique Beclin-1/Vps34 va convertir le phosphatidylinositol en phosphatidylinositol-3 phosphate (voir les cercles jaunes, **Figure 30**) qui est impliqué dans la formation des structures pré-autophagosomales. Beclin-1 va interagir avec plusieurs co-activateurs, tels qu'UVRAG, Ambra1 et Bif-1, de même qu'avec les inhibiteurs Bcl-2 et Bcl-xl.

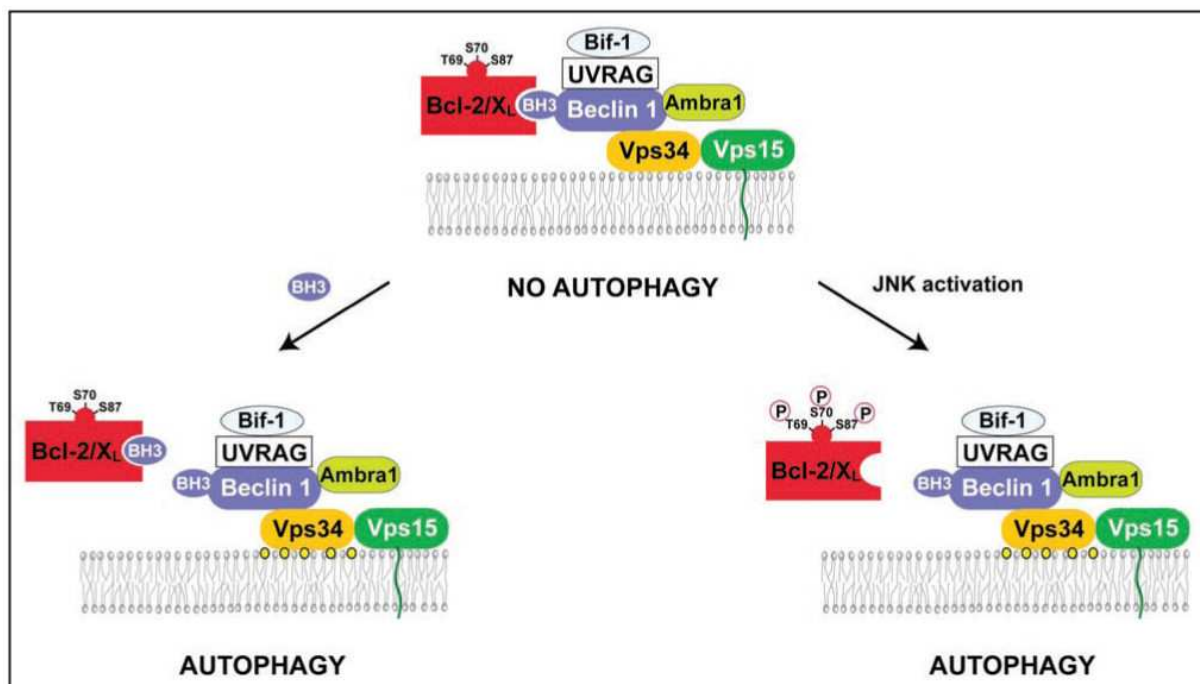


Figure 30 : Régulation de l'autophagie par le complexe Beclin-1/Bcl-2/Bcl-xl (Levine, 2008)

La **figure 30** représente les deux mécanismes conduisant à l'interruption de l'interaction Beclin-1/Bcl-2 ou Beclin-1/Bcl-xl. Dans les deux cas, cette interruption conduit à l'induction d'autophagie.

Sur la partie gauche de la figure sont représentées les protéines comportant un domaine BH3 ou les petites molécules mimant un domaine BH3. Celles-ci vont pouvoir se lier aux protéines Bcl-2 et Bcl-xl au niveau de leur sillon de fixation BH3 et, par un phénomène de compétition au niveau de ces sites de fixation, provoquer l'interruption de l'interaction entre Beclin-1 et Bcl-2 ou Bcl-xl. Il va s'en suivre une levée de l'inhibition de l'activité kinase de Vps34, et une induction d'autophagie.

Dans la partie droite de la **figure 30** est illustrée la phosphorylation de Bcl-2 par JNK-1 (C-Jun-N-terminal kinase 1) dans des conditions de privation en nutriments de la cellule. Cette phosphorylation va conduire à l'interruption de l'interaction entre Bcl-2 et Beclin-1, conduisant également à l'induction de l'autophagie.

D'autre part, Oberstein et ses collègues ont montré que Beclin-1 possédait un domaine BH3-only dictant son interaction physique et fonctionnelle avec le sillon de fixation BH3 des protéines à plusieurs domaines de la famille des protéines Bcl-2 (Oberstein *et al.*, 2007) (**Figure 31**).

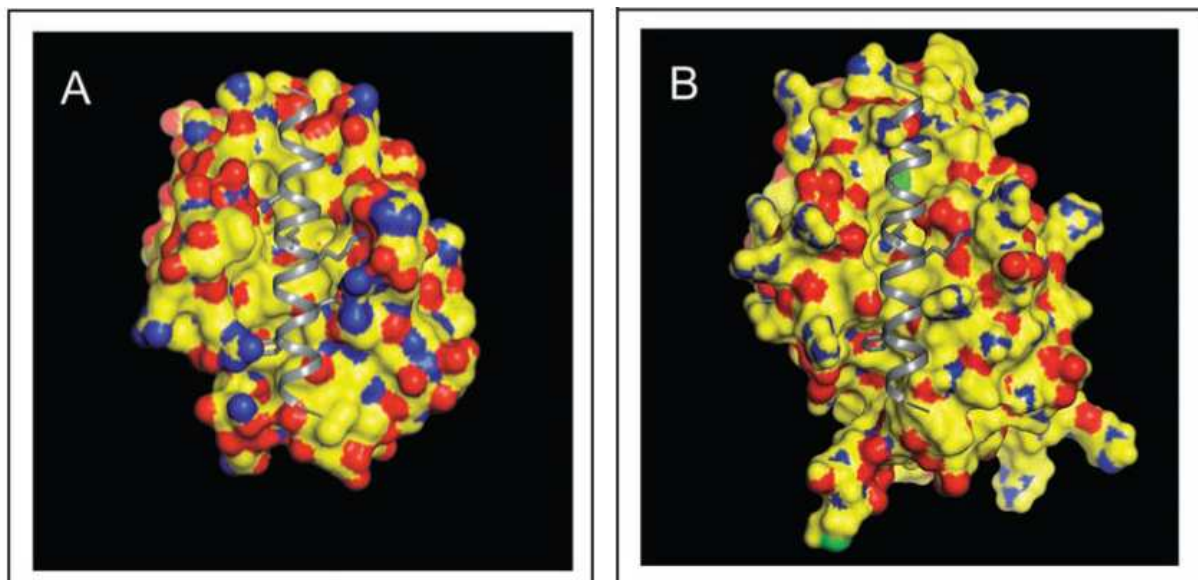


Figure 31 : Liaison du domaine BH3 de Beclin-1 (hélice grise sur le schéma) au sillon de fixation BH3 de Bcl-xl (A) ou Bcl-2 (B) (Levine, 2008)

Beclin-1 apparaît ainsi comme un activateur essentiel de la kinase Vps34, à l'origine de l'induction d'autophagie. Lorsque l'autophagie est inhibée, Beclin-1 est inactivée par son interaction avec des protéines à plusieurs domaines de la famille Bcl-2. Ainsi, le ciblage de Beclin-1 par les membres de la famille Bcl-2 représente un mécanisme essentiel de la régulation de l'autophagie (Levine *et al.*, 2008).

Cependant, le rôle des protéines de la famille Bcl-2 est mieux caractérisé dans le processus apoptotique que dans la mort cellulaire autophagique. En effet, les protéines BH3-only agissent en tant qu'inducteurs de l'apoptose. Comme mentionné précédemment, Beclin-1 a été décrite comme étant un nouveau membre du sous-groupe de protéines BH3-only de la famille Bcl-2. Or, Kroemer et Levine ont pu montrer que cette protéine, capable d'induire de l'autophagie, ne semblait pas présenter d'action apoptogène. Comment expliquer que des protéines, partageant des domaines structuraux similaires et possédant une cible moléculaire identique, puissent avoir des fonctions physiologiques différentes ?

Pour répondre à cette problématique, ces deux auteurs avancent l'hypothèse selon laquelle les protéines BH3-only induiraient de l'autophagie ou de l'apoptose en agissant au niveau d'au moins deux compartiments subcellulaires. Les protéines BH3-only induisent l'autophagie en libérant Beclin-1 de son inhibition par Bcl-2/Bcl-xl, et ce probablement au niveau du RE. Ces mêmes protéines induisent l'apoptose en stimulant - de manière directe ou indirecte - l'activité de perméabilisation mitochondriale des protéines pro-apoptotiques à plusieurs domaines BH de la famille Bcl-2, telles que Bax et Bak.

En accord apparant avec cette interprétation, Bax et Bak n'ont, jusque là, pas été impliqués dans la régulation de l'autophagie. Il faut toutefois noter que des interactions entre Beclin-1 et Bcl-2/Bcl-xl peuvent survenir au niveau des mitochondries (Levine *et al.*, 2008). Ce point nécessite ainsi d'être approfondi afin de parvenir à une meilleure compréhension de la régulation de l'apoptose et/ou de l'autophagie.

3.3. p53

Le suppresseur de tumeur p53 joue un rôle important dans le maintien de la stabilité génétique. Son activité est perdue ou mutée dans plus de 50% des tumeurs humaines.

L'altération de la fonction de p53 peut être due à sa propre mutation ou à la mutation de kinases, telles que ATM, Chk1 ou encore MDM2. La kinase ATM (Pandita *et al.*, 2000) est

activée par les dommages radio-induits de l'ADN, tandis que Chk1 est activée en conditions de stress (hypoxie, drogues antinéoplasiques) (Greenow *et al.*, 2009). MDM2 est une ligase qui va induire la destruction de p53 par le protéasome (Vousden *et al.*, 2000).

p53 est considéré comme un facteur de transcription qui va se lier spécifiquement à des séquences de l'ADN. Il est capable de réguler de nombreux gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, dans l'induction de l'apoptose ou de la sénescence cellulaire, mais également de l'autophagie.

Plusieurs travaux ont rapporté la capacité de p53 d'acclimater les cellules à des conditions de stress, telles que les radiations ionisantes ou les drogues génotoxiques, en augmentant la réparation de l'ADN après un arrêt transitoire du cycle cellulaire, ou en activant des enzymes nécessaires à la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS) (Horn *et al.*, 2007).

Dans certaines conditions cellulaires (altération du cytosquelette, modification de l'adhésion cellulaire, activation d'oncogènes), p53 va être activé et réprimer l'action des oncoprotéines en agissant au niveau du cycle cellulaire et en causant la mort cellulaire par apoptose (Murray-Zmijewski *et al.*, 2008).

La relation de p53 avec l'autophagie est complexe. Il peut induire ce type de mort cellulaire à travers deux mécanismes : l'inhibition de la voie de signalisation mTOR, mais également à travers l'activation du gène DRAM (Crighton *et al.*, 2007).

DRAM est un gène cible de p53 codant pour une protéine lysosomale qui va permettre l'induction d'autophagie. Il agit donc comme un effecteur de la mort cellulaire p53-dépendante (**Figure 32**).

p53 induit l'autophagie d'une manière DRAM-dépendante, la surexpression de DRAM seul ne cause que peu de mort cellulaire, tandis que DRAM est essentiel à l'apoptose p53-dépendante, apportant une nouvelle preuve de la relation complexe liant apoptose et autophagie.

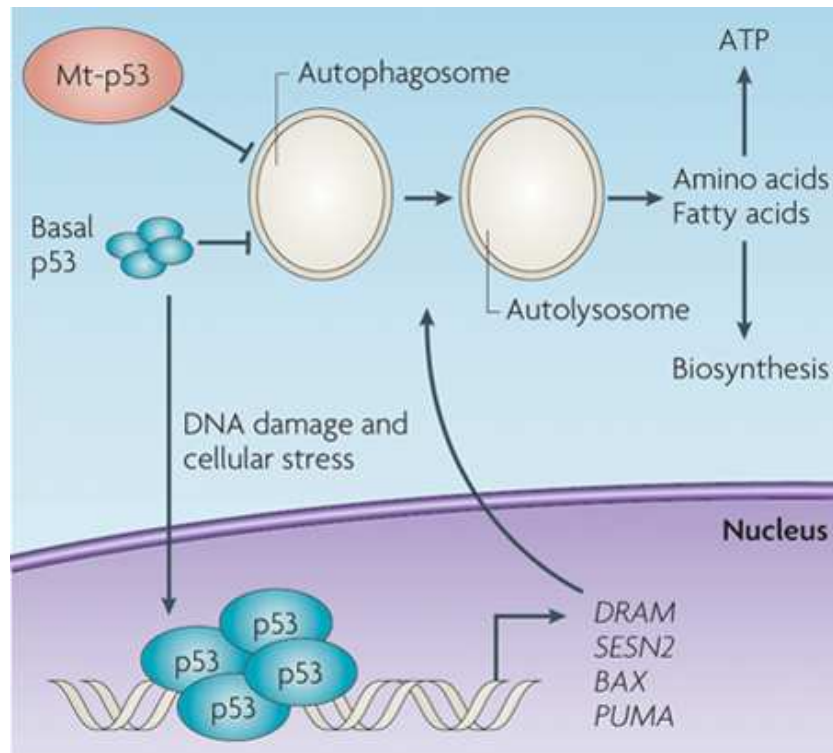


Figure 32 : Cibles transcriptionnelles de p53 impliquées dans l'induction de l'autophagie (Vousden, 2009)

D'autres composantes de la famille p53, telles que p73 (ou tp73 pour tumor protein 73) ou le facteur ARF conduisant à l'activation de p53 après une mutation oncogénique, sont capables de réguler positivement l'autophagie et ce d'une manière DRAM-indépendante (Crighton *et al.*, 2007). Le processus autophagique peut également être enclenché par l'inhibition pharmacologique ou la délétion de p53 (Tasdemir *et al.*, 2008). Il semblerait que la déficience en p53 compromette certaines fonctions cellulaires, telles que la biogénèse mitochondriale normale, créant un signal induisant de l'autophagie (Ibrahim *et al.*, 1998).

De récentes études suggèrent également que la forme transcriptionnellement active de p53, localisée au niveau du noyau, favoriserait l'autophagie, tandis que la forme cytoplasmique de cette protéine en serait plutôt un inhibiteur (Tasdemir, Chiara Mauri *et al.*, 2008). L'action équilibrée de ces deux formes de p53 peut rendre les cellules plus ou moins sensibles à l'induction d'autophagie en réponse à un signal de privation de nutriments, alors que dans les cellules p53-déficientes, le taux basal d'autophagie reste élevé de façon permanente et ne peut pas être modulé (Schwartzernberg-bar-Yoseph *et al.*, 2004).

L'inactivation de p53 étant un avantage pour la survie des cellules tumorales, il n'est donc pas aisé d'expliquer le rôle dual exercé par ce régulateur positif ou négatif de l'autophagie. Dans des conditions de stress spécifiques ou lors d'un stade particulier de la formation tumorale, il semblerait que la tumeur choisisse elle-même son destin en matière de mort cellulaire.

A un stade précoce de la tumorigénèse, lorsque des dommages génotoxiques induisent de l'autophagie à travers l'activation de p53, il semblerait que les mécanismes autophagiques soient mis en œuvre afin d'éliminer les cellules défectueuses. Au contraire, lorsque la tumeur est formée, l'inactivation de p53 (par mutation, délétion ou dégradation consécutive à une privation en nutriments au sein de la masse tumorale) pourrait vraisemblablement activer le processus autophagique afin de pourvoir aux besoins énergétiques des cellules tumorales (**Figure 33**). Il a ainsi été établi que des cellules « p53-null » mises en conditions de privation de nutriments étaient capables de maintenir un niveau normal d'ATP (Tasdemir *et al.*, 2008).

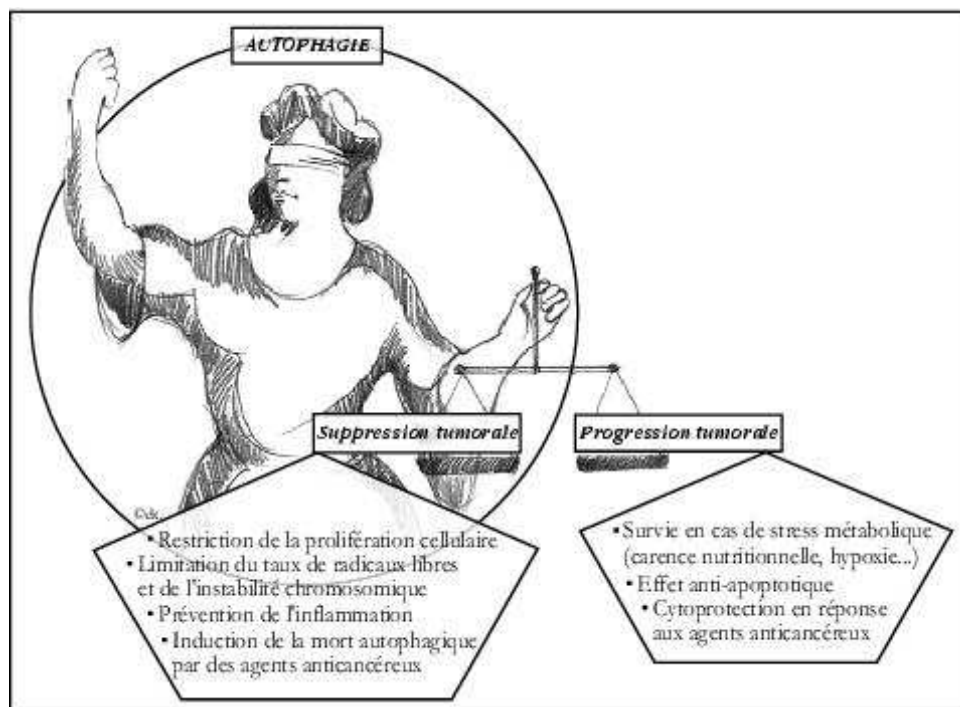


Figure 33 : Rôle de l'autophagie dans la suppression et la progression tumorale (Lorin, 2008)

3.4. DAPk

La protéine DAPk-1 (death associated protein kinase-1) agit en tant que suppresseur de tumeur et a été reliée à plusieurs voies de signalisation de mort cellulaire, y compris l'autophagie. L'expression de cette protéine est très souvent réprimée dans les tumeurs humaines, telles que les cancers de la tête et du cou, du poumon, de la prostate mais également du sein (Bialik *et al.*, 2006). La perte d'expression de cette protéine peut révéler la présence des tumeurs précitées dans des biopsies, et donc être utilisée à des fins diagnostiques.

Il semblerait que DAPk induise l'autophagie de manière indépendante, et ce à travers son interaction avec la MAP1B (microtubule-associated protein 1B), une protéine impliquée dans la croissance et la différenciation neuronale et capable d'interagir avec la protéine LC3 au niveau des autophagosomes en induisant l'autophagie (Otto *et al.*, 2004) (**Figure 34**).

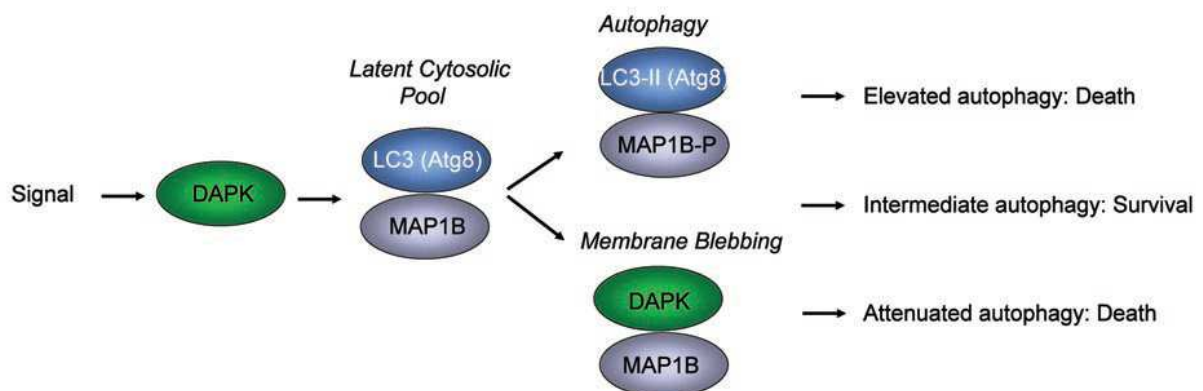


Figure 34 : Interaction DAPk-MAP1B au cours du processus autophagique (Stevens, 2008)

Il a été démontré récemment que Beclin-1, protéine essentielle à l'autophagie, est un substrat de DAPk (Zalckvar E *et al.*, 2009). Celle-ci interagit avec Beclin-1 en phosphorylant le site T119 localisé au sein de son domaine BH3, conduisant à la dissociation de Beclin-1/Bcl-xl et à l'induction d'autophagie.

De plus, il semblerait que DAPk agisse à plusieurs stades du développement tumoral : à un stade précoce, son activation augmente l'expression et l'activité transcriptionnelle de p53, conduisant à une mort cellulaire caspases-dépendante, tandis qu'à un stade plus avancé de la tumorigénèse, l'activation de DAPk inhibe la formation de métastases tumorales en induisant

de l'anoïkis (mort cellulaire induite par le détachement des cellules de la matrice) (Inbal *et al.*, 1997). En effet, la voie de signalisation des molécules d'adhésion est régulée par l'activation de DAPk qui va provoquer de l'apoptose p53-dépendante en supprimant l'activation des intégrines et leur cascade de signalisation.

En outre, DAPk va bloquer la migration et l'invasion cellulaire tumorale en interférant dans l'association de la taline avec la queue de l'intégrine beta, inhibant ainsi la polarisation cellulaire et la migration. L'effet inhibiteur de DAPk sur la migration et l'invasion cellulaire est apoptose-indépendant étant donné qu'il a également été observé dans des cellules p53-déficientes.

L'activité DAPk apparaît comme étant très flexible : cette protéine fonctionne comme un inducteur de la mort apoptotique caspase-dépendante mais également comme un inducteur de nécrose à travers la phosphorylation et l'activation de JNK (Inbal *et al.*, 1997).

Enfin, il semblerait que l'activité DAPk induise à la fois de l'apoptose et de l'autophagie dans les mêmes cellules, suggérant la possibilité pour cette protéine de sélectionner une mort cellulaire plutôt qu'une autre, et ce en fonction de la situation dans laquelle se trouve la cellule (Gozuacik *et al.*, 2008).

3.5. Les protéines Atg

Les gènes ATG (autophagy related genes) ont été découverts chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans les années 1990. La découverte de ces gènes a permis d'appréhender l'importance physiologique et physiopathologique du processus autophagique (Klionsky *et al.*, 2000, 2003).

Les protéines Atg participent à la formation de l'autophagosome, et plus d'une quinzaine de protéines sont requises à sa biogénèse. La plupart de ces protéines sont conservées de la levure à l'homme. Toutes ces protéines, hormis Atg9, sont dépourvues de domaine transmembranaire. Recrutées dans le cytoplasme, elles vont s'associer à la membrane du pré-autophagosome et de l'autophagosome de manière transitoire.

La formation de l'autophagosome se base principalement sur deux systèmes de conjugaison, très proches des phénomènes d'ubiquitinylation et de sumoylation des protéines (Ohsumi *et al.*, 2001).

Le premier système conjugué est constitué des protéines Atg5-Atg12, recrutées à partir du cytoplasme (**Figure 35**). Ce système va permettre la conjugaison d'Atg8 (MAP-LC3 chez les mammifères) et de la phosphatidyléthanolamine (PE) sur la membrane pré-autophagosomale (MPA). La formation de l'autophagosome nécessite également la production de phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns3P) par la PI3K de type III. Cette dernière serait vraisemblablement localisée sur la membrane du réseau trans-golgien (RTG) où elle interagit avec la protéine Beclin-1 (Atg6).

L'importance de la protéine Beclin-1, notamment dans son interaction avec les membres de la famille Bcl-2, a été abordée précédemment dans ce chapitre.

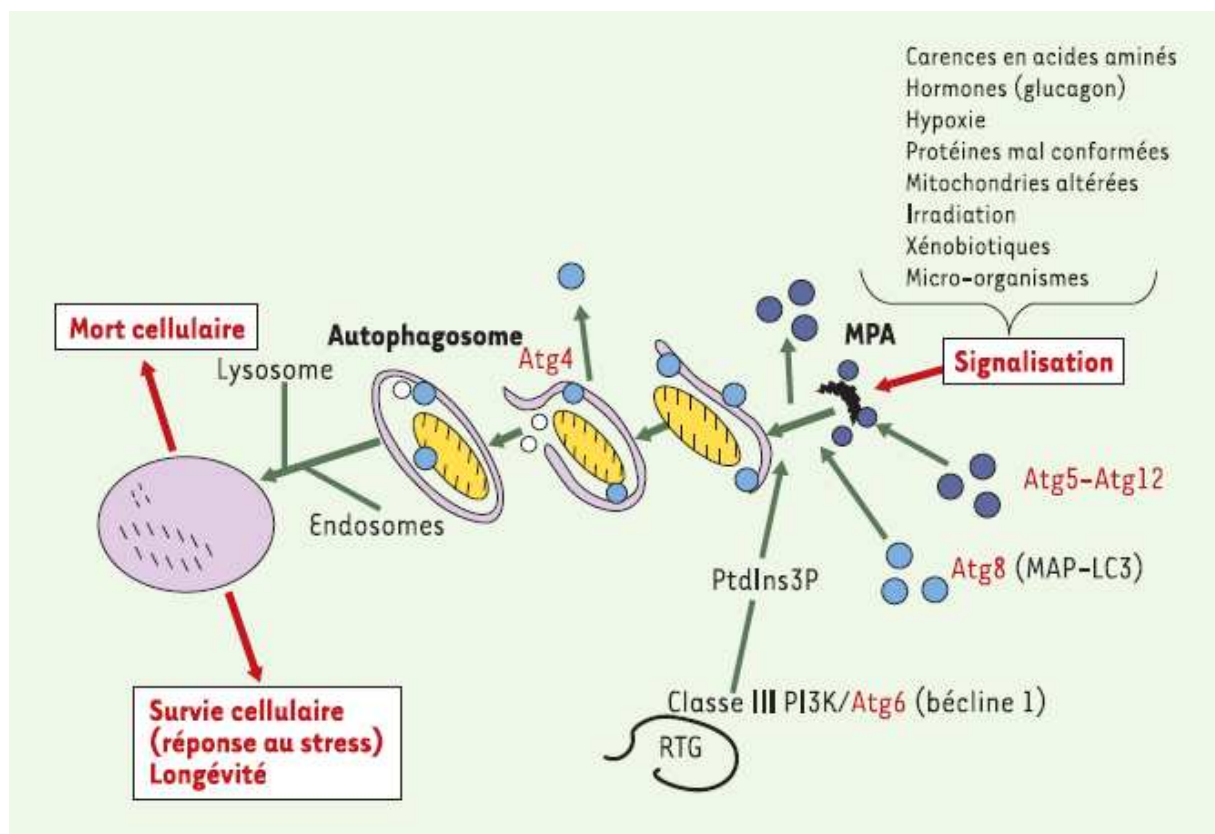


Figure 35 : Intervention des protéines Atg dans la formation de l'autophagosome (Codogno, 2004)

Après formation de l'autophagosome, la plupart des protéines Atg sont recyclées vers le cytosol, à l'exception notable d'une fraction Atg8-PE, qui est un marqueur de l'autophagosome, insensible à la déconjugaison réalisée par Atg4 du fait de sa topologie membranaire.

Une fois la fusion de l'autophagosome avec des endosomes (précoces et/ou tardifs) réalisée, le matériel cytoplasmique séquestré dans l'autophagosome est digéré par les enzymes lysosomales.

Matériels et méthodes

Partie I : Expériences *in vitro*

1. Lignées cellulaires

Lors de ce travail de thèse, deux lignées cellulaires radiorésistantes d'origine humaine ont été étudiées : la lignée SK-Hep1, issue d'un carcinome hépatocellulaire, ainsi que la lignée U-87, issue d'un glioblastome.

Ces deux lignées, provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA), étaient cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (préalablement décomplémenté par un chauffage au bain-marie de 30 minutes à 56°C), 1mM d'HEPES, 1mM de pyruvate de sodium, 1mM d'acides aminés non essentiels et 50µg de pénicilline-streptomycine/mL. Les cellules étaient maintenues en culture dans un incubateur à 37°C, sous atmosphère humide et en présence de 5% de CO₂.

La mise en suspension de ces deux types cellulaires adhérents était effectuée par incubation avec une solution de trypsine-EDTA (Sigma) pendant trois minutes. Les comptages cellulaires étaient déterminés soit à l'aide d'un Coulter Counter (Beckman Coulter), soit par un test d'exclusion au Bleu Trypan (Sigma) réalisé sur cellule de Neubauer.

2. Irradiations

2.1. Dosimétrie

Avant chaque série d'irradiation, la dosimétrie était effectuée au moyen d'une chambre d'ionisation (paroi en plastique tissu-équivalent A150, volume 0,1 mL) selon le rapport 59 de l'ICRU adapté pour les ions lourds (Vynckier, 1994). Des mesures relatives ont également été effectuées par film (Kodak X-Omat V) et par dosimètres plastiques (CR39).

2.2. Irradiations par neutrons rapides

Les irradiations par neutrons rapides ont toutes été réalisées au CRC (Centre de Recherche du Cyclotron) de l'Université Catholique de Louvain (UCL), à Louvain-la-Neuve (Belgique). En bombardant des protons de 65MeV sur une cible de béryllium, le cyclotron utilisé (CYCLONE I) permet la production de neutrons rapides qui, en fin de parcours, sont délivrés et orientés par le collimateur multi-lames déterminant les dimensions finales du champ d'irradiation. Les doses, de 1 à 10 Gy étaient délivrées en une seule fraction au débit de 0,2Gy/min et avec un TLE moyen d'environ 25KeV/ μ M.

2.3. Irradiations par rayons X

Les irradiations par rayons X étaient produites par des accélérateurs Primus ou Saturne du Centre de Lutte Contre le Cancer Paul Strauss, ainsi qu'à la Clinique Saint Pierre d'Ottignies. L'énergie de ces photons était de 15MV, et le débit de dose de 2Gy/min.



Figure 36 : Dispositif d'irradiation des échantillons biologiques

3. Traitement pharmacologique des cellules

Le traitement pharmacologique des cellules consistait en l'ajout de produits (voir ci-dessous) au milieu de culture une heure avant irradiation. Ces composés étaient laissés dans le milieu de culture pour une durée de 24 heures, puis éliminés par changement du milieu. Différents produits ont été testés aux cours de nos expériences.

3.1. Oxaliplatine

L'oxaliplatine (Eloxatine, Sanofi-Aventis, France) était ajouté aux cellules au minimum une heure avant les irradiations. La solution stock à 5mg/mL était diluée dans de l'eau bidistillée pour un traitement des cellules à une concentration finale de 3 μ M d'oxaliplatine.

3.2. Inhibiteur de la PARP : PJ-34

Le PJ-34 [N-(6-Oxo-5,6-dihydro-phenanthridin-2-yl)-N,N-dimethylacetamide.HCl] (Alexis-Biochemicals, Covalab, Villeurbanne, France) est un inhibiteur de la poly(ADP-ribose)polymérase (PARP). Il était ajouté au milieu de culture dans les mêmes conditions que l'oxaliplatine, c'est-à-dire une heure avant les irradiations, puis retiré 24h après, par changement du milieu. La concentration de PJ-34 utilisée au cours de nos expériences était de 5 μ M.

3.3. RAD001

Le RAD001, encore appelé évérolimus, nous a été gracieusement fourni par le laboratoire Novartis, suite à notre demande. Réceptionné sous forme de poudre, le RAD001 était dissout suivant les instructions du fabricant : préparation d'une solution stock à 20mM dans du DMSO ; formation d'aliquots puis congélation à -20°C. Le RAD001 était ensuite utilisé à des concentrations de 10, 20 et 40nM. Le traitement au RAD001 était effectué dans les mêmes conditions que l'oxaliplatine et le PJ-34 (ajouté au milieu de culture une heure avant irradiation, retiré 24h après).

4. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique permettant la mesure simultanée de plusieurs caractéristiques physiques d'une cellule (**Figure 37**) :

- sa taille relative (Forward Scatter, FSC)
- sa granulosité ou complexité interne relative (Side Scatter, SSC)
- son intensité relative de fluorescence.

Dans notre étude, cette technique de FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) était utilisée pour l'analyse de différents types de mort cellulaire (apoptose, autophagie). Toutes les expériences étaient réalisées à l'aide d'un cytomètre FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), et les données étaient analysées par le logiciel CellQuest (Becton Dickinson).

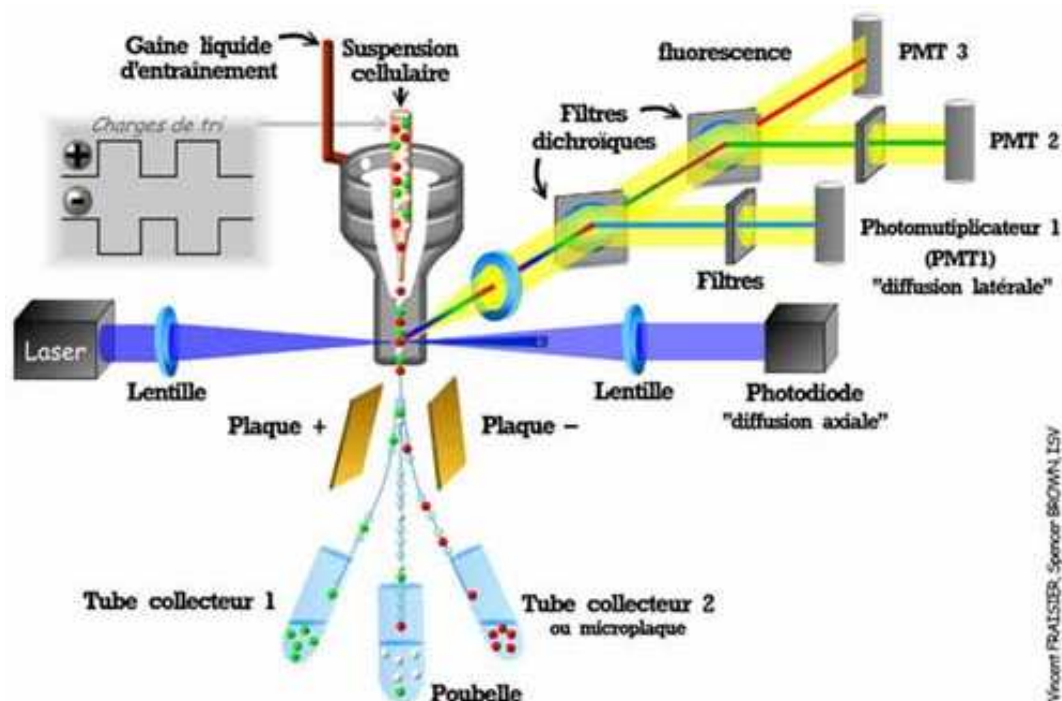


Figure 37 : Représentation schématique d'un cytomètre en flux

4.1. Quantification de l'apoptose

L'étude de l'apoptose était réalisée par marquage des cellules à l'iodure de propidium (IP). Pour cela, les cellules étaient cultivées dans des flacons ventilés de 25cm².

Après rinçage avec du PBS et détachement des cellules par trypsination (3 minutes à 37°C), 5.10⁵ cellules étaient prélevées après comptage sur cellule de Neubauer, centrifugées 7 minutes à 1700 rpm puis fixées pendant au minimum 4 heures dans 1mL d'éthanol froid à 70°. Après fixation, les cellules étaient rincées dans 2mL de PBS, centrifugées 10 minutes à 3000 rpm, puis incubées pendant 30 minutes à 37°C avec 100µL d'iodure de propidium à 100µg/mL avant acquisition au FACS.

4.2. Quantification de l'autophagie

Après irradiation et/ou traitement, les cellules (ensemencées au préalable dans des flacons 25cm²) étaient rincées avec du PBS, trypsinées puis comptées au moyen d'une cellule de Neubauer. 5.10⁵ cellules étaient ensuite récupérées dans des tubes 5mL puis incubées pendant 15 minutes à 37°C en présence de 100µL d'acridine orange à 10µg/mL. Après rinçage avec du PBS et centrifugation 7 minutes à 1700 rpm, les cellules étaient remises en suspension dans 100µL de PBS avant acquisition au FACS.

Fluorochrome	λ d'excitation (nm)	λ d'émission (nm)
Iodure de propidium (IP)	488	617
Acridine Orange (AO)	460	650

5. Microscopie à fluorescence

5.1. Analyse de l'autophagie

5.1.1. Marquage à l'acridine orange

24h avant irradiation, les cellules étaient ensemencées dans des plaques 6 puits. Après irradiation et/ou traitement pharmacologique, le milieu de culture était retiré de chaque puits et les cellules rincées avec du PBS.

Le marquage était effectué à même les puits, en incubant les cellules 15 minutes à 37°C en présence de 50µL/puits d'acridine orange à 10µg/mL. Après rinçage au PBS, une lamelle était déposée dans le fond de chaque puits avant observation au microscope à fluorescence.

5.1.2. Transfections pEGFP-LC3

24 heures avant irradiation, les cellules étaient ensemencées dans des plaques 6 puits, à raison de 300 000 cellules par puits, et ce dans un volume de 2mL de milieu DMEM sans antibiotiques. Une lamelle stérile était déposée dans le fond de chaque puits avant ensemencement des cellules. Après irradiation et/ou traitement pharmacologique, la première

étape de la transfection consistait à diluer, pour chaque puits, 4µg d'ADN plasmidique (**Figure 38**) dans 50µL d'Opti-MEM (Invitrogen). En parallèle, 10µL de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) étaient dilués dans 50µL d'Opti-MEM puis laissés à température ambiante pendant 5 minutes.

Après 5 minutes d'incubation, les deux solutions étaient mises en contact afin de permettre la formation des complexes ADN-Lipofectamine (**Figure 39**). Ce mélange était laissé à température ambiante pendant 20 minutes avant d'être ajouté au milieu de culture des plaques 6 puits contenant les cellules.

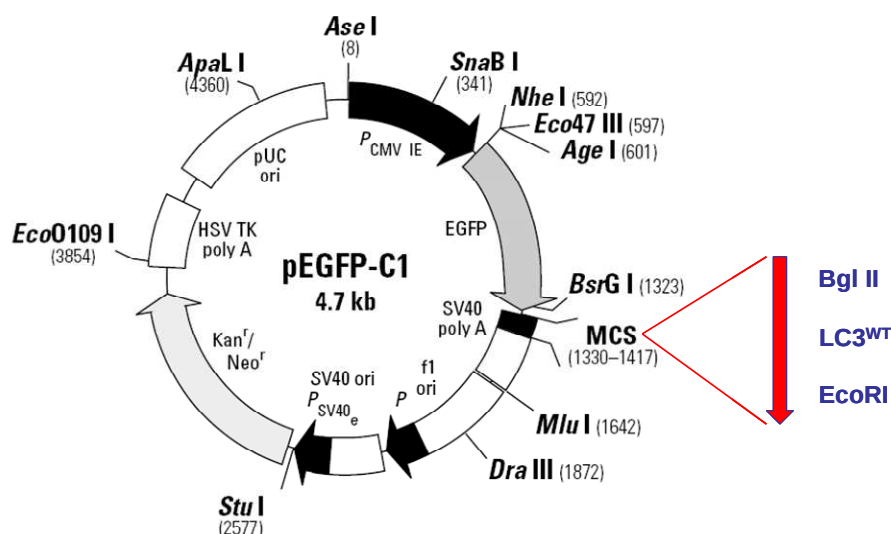


Figure 38 : Construction du plasmide pEGFP-LC3

Après incubation à 37°C pendant au minimum 18 heures, les cellules étaient lavées avec du PBS, puis les lamelles déposées sur une lame avant observation au microscope à fluorescence.

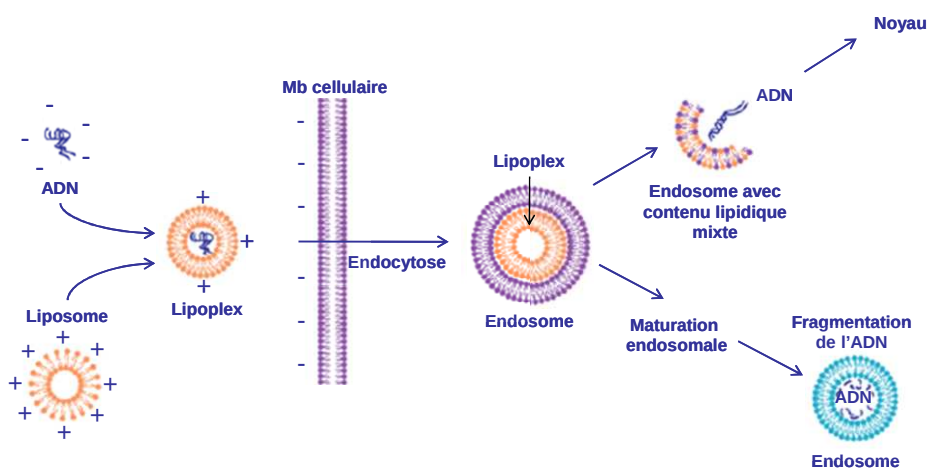


Figure 39 : Principe de la transfection

5.2. Marquage des coupures double-brin de l'ADN

Cette technique d'immunofluorescence permet de marquer les cassures doubles brins (CDB) de l'ADN résultant d'une irradiation et/ou d'un traitement pharmacologique. Pour ce faire, les cellules étaientensemencées dans des plaques 6 puits (200 000 cellules par puits), dans lesquels étaient préalablement déposées des lamelles stériles. 24h après irradiation et/ou traitement pharmacologique, le milieu de culture était retiré de chaque puits, les cellules étaient rincées au PBS, puis fixées 15 minutes à l'aide d'une solution à 4% de paraformaldéhyde et 2% de sucrose. Après rinçage au PBS, les cellules étaient ensuite lysées 3 minutes à l'aide d'un tampon de lyse (20mM HEPES pH 7,4, 50mM NaCl, 300mM sucrose, 0,5 Triton). Après deux rinçages au PBS, les cellules étaient alors incubées 40 minutes en présence d'un anticorps primaire anti-gamma-phospho-H2AX (anticorps monoclonal de souris, clone JBW301, Upstate, Lake Placid, NY, USA). Après trois rinçages au PBS, les cellules étaient ensuite incubées 20 minutes en présence de l'anticorps secondaire couplé à la FITC (FITC chèvre anti-souris, Sigma). Les anticorps étaient dilués dans une solution permettant le blocage des sites aspécifiques (2% BSA dans du PBS), au 1/100^{ème} pour l'anticorps primaire, et au 1/10^{ème} pour l'anticorps secondaire.

Pour finir, les lamelles étaient retirées de chaque puits, appliquées contre une lame contenant une goutte de Vectashield (solution de montage contenant du DAPI pour un marquage contrôle des noyaux, Vector Laboratories), puis observées au microscope à fluorescence.

6. Microscopie électronique à transmission

Les cellules étaient ensemencées dans des plaques 24 puits, puis, après irradiation et/ou traitement pharmacologique, fixées par une solution à 2,5% de paraformaldéhyde et 2,5% de glutaraldéhyde dans du tampon cacodylate.

La post-fixation était réalisée avec 1% de tétroxyde d'osmium dans du tampon cacodylate à 0,1M pendant une heure, à 4°C et dans l'obscurité. Les échantillons étaient ensuite déshydratés par des bains dans des gradients d'éthanol croissants (50, 70, 90 et 100%), puis inclus dans de l'Epon.

Des sections ultra-fines (70nm) étaient réalisées à l'aide d'un ultra-microtome, contrastées avec de l'acétate d'uranyle ainsi que du citrate de plomb, puis examinées avec un microscope électronique Morgagni 268D (Philips, Eindhoven, Pays-Bas).

7. Test de survie clonogénique

Après irradiation et/ou traitement pharmacologique, les cellules étaient rincées au PBS, trypsinées, puis comptées sur cellule de Neubauer. Afin de déterminer la survie clonogénique, les cellules étaient ensuiteensemencées dans des plaques 6 puits à des concentrations variant de 10^2 à 10^6 cellules par puits, et incubées pendant 10 jours à 37°C.

Après lavage à l'eau, les cellules étaient fixées et colorées pendant 2 minutes avec une solution à 1% de crystal violet (préalablement dissout dans de l'éthanol). Après plusieurs lavages à l'eau, les clones étaient séchés à l'air libre puis comptés. Seuls les clones de plus de 50 cellules étaient comptabilisés.

8. Test de cytotoxicité SRB

La Sulforhodamine B (SRB) est un colorant anionique se fixant de manière électrostatique aux protéines cellulaires. Ce test est fréquemment utilisé pour l'évaluation des activités cytotoxiques et cytostatiques de nouvelles drogues antitumorales.

24 heures avant traitement, les cellules étaientensemencées dans des plaques 96 puits. La première étape de ce test de cytotoxicité consistait à déposer 50µL d'acide trichloroacétique 50% froid (TCA) dans chaque puits (concentration finale : 10%), et laisser les plaques pendant une heure à 4°C. Après 5 lavages à l'eau, 100µL de Sulforhodamine B (0,4% p/v diluée dans de l'acide acétique 1%) étaient déposés dans chaque puits et laissés 30 minutes à température ambiante. Les cellules étaient ensuite rincées rapidement 5 fois avec de l'acide acétique 1% puis séchées à l'air libre. Pour finir, 200µL de Tris 10mM (pH 10,5) étaient déposés dans chaque puits, et après 10 minutes d'agitation, une lecture des plaque était faite sur lecteur de plaque à 550nm.

9. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel statistique MelCalc. La différence entre les différents sous-groupes (en termes de comptages cellulaires, du nombre de foci ainsi que la proportion de cellules apoptotiques ou autophagiques) en fonction des différentes conditions d'irradiation et de traitement pharmacologique était évaluée par un test d'analyse de variance à un critère de classification (ANOVA one-way) et comparée de manière appariée à un test de Student-Newman-Keuls. Les différences entre les différents sous-groupes étaient significatives pour $p < 0,05$.

Partie II : Expériences *in vivo*

1. Animaux et modèle orthotopique de CHC

Pour nos expériences *in vivo*, des souris mâles athymiques Swiss nude de quatre semaines ont été utilisées (Laboratoire Charles River, Les Asbresles, France). Elles étaient maintenues dans les conditions d'élevage conventionnelles (température de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, humidité relative, $55\% \pm 10\%$, cycle lumineux de 12h). La nourriture stérile ainsi que l'eau étaient disponibles *ad libitum*. Les réglementations en matière d'expérimentation animale étaient scrupuleusement respectées, et l'ensemble de nos protocoles était approuvé par le comité animalier de l'IRCAD, où ont été réalisées toutes nos expériences.

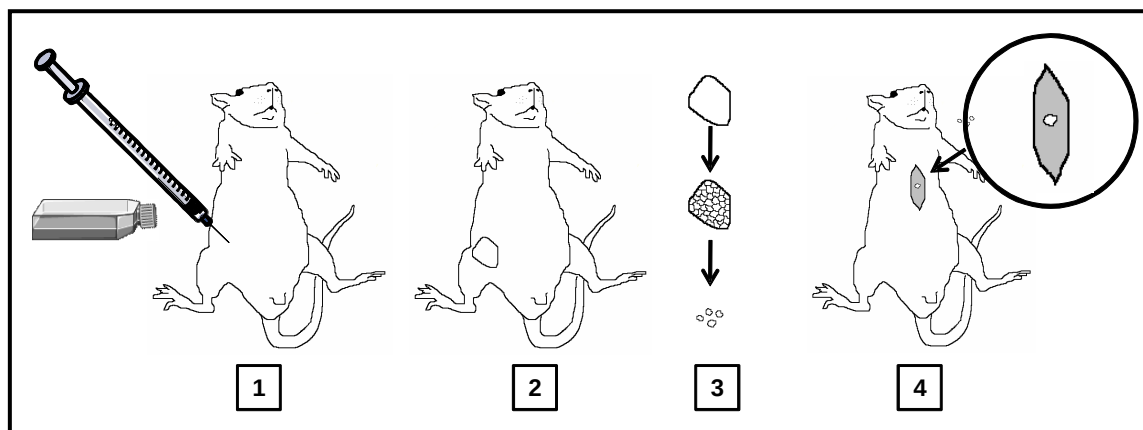


Figure 40 : Xénogreffes orthotopiques de CHC

La **figure 40** illustre la technique développée afin de réaliser des xénogreffes orthotopiques de carcinome hépatocellulaire (CHC) sur des souris nude. Dans ce but, des cellules SK-Hep1 ont été cultivées *in vitro* dans des flacons de 25cm^2 , détachées du support par trypsination, rincées avec du PBS, puis transférées dans une seringue de 1ml afin de pouvoir procéder à une injection sous-cutanée de cellules (20×10^6 cellules/ $150\mu\text{L}$) au niveau du flanc droit d'une souris nude [1]. Après deux mois de croissance [2], la tumeur était prélevée et sectionnée en

fragments d'environ 1mm^3 [3]. Une nouvelle série de souris nude était alors laparotomisée sous anesthésie générale à l'isoflurane, afin de permettre une implantation des fragments tumoraux au niveau du lobe hépatique droit des souris (un fragment par souris) [4].

2. Irradiation par neutrons rapides

Les souris étaient irradiées à température ambiante par des neutrons rapides ($p(65) + \text{Be}$) produits au Centre de Recherche du Cyclotron de Louvain-la-Neuve (CRC, Louvain-la-Neuve, Belgique).

Les souris étaient maintenues, à l'aide de pinces en bois spécialement conçues pour cet usage, sur une plaque en plexiglas permettant l'irradiation simultanée de 4 animaux. Un collimateur multi-lames permettait de délimiter le champ d'irradiation au niveau de la partie supérieure de l'abdomen. La dose délivrée était de 4Gy.



Figure 41 : Fragmentation de la tumeur sous-cutanée (photo de gauche et du milieu) et dispositif d'irradiation des souris (photo de droite)

3. Analyse histologique

Afin de pouvoir procéder à leur analyse histologique, les échantillons étaient fixés dans du PFA (Paraformaldéhyde) tamponné à 4% durant 24h, déshydratés, puis inclus en paraffine. Des coupes standard de $5\mu\text{m}$ étaient colorées à l'Hématoxyline-Eosine (HE) et observées sous un microscope optique.

Un marquage TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling) était réalisé avec le « In Situ Cell Death Detection Kit » (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne), selon le protocole du fabricant. Les cellules positives après marquage TUNEL étaient observées sous microscope à fluorescence.

4. Suivi de l'apoptose par pCLE

4.1. Agent fluorescent : FLIVOGreen™

Dans le but d'observer les cellules apoptotique *in vivo* et en temps réel par pCLE (probe-based Confocal Laser Endomicroscopy), les souris nude porteuses de tumeur étaient injectées en i.v. avec FLIVOGreen™ (Immunochemistry Technologies, Bloomington, USA), une sonde fluorescente capable de traverser les membranes cellulaires et se fixant de manière spécifique aux caspases activées, permettant ainsi la détection de mort cellulaire par apoptose.

La solution à injecter était préparée en ajoutant 200µl de tampon d'injection (dilué 10 fois et filtré stérilement) au réactif dissout dans du DMSO. 40µl de cette solution étaient alors injectés en i.v. dans la veine de la queue des souris. La détection de la fluorescence par pCLE était réalisée 30 minutes après injection pour permettre un marquage optimal.

4.2. Apoptose induite par Fas : contrôle positif de l'apoptose

Le récepteur de Fas ou FasR (CD95) contrôle la voie de signalisation de l'apoptose après activation par le Fas-ligand ou FasL (CD95L) exprimé à la surface des cellules. Exprimant FasR de manière importante, les hépatocytes sont connus pour être très sensibles à l'apoptose déclenchée par Fas (Song *et al.*, 2003 ; Kondo *et al.*, 1997).

Afin d'induire de l'apoptose dans un foie sain, l'anticorps anti-Fas (CD95/APO, BD Biosciences, San Jose, USA) était injecté dans la veine de la queue de souris BALB/C

(Laboratoire Charles River). Avec une dose optimale de 4µg / 30g de souris, co-injectée avec l'agent fluorescent FLIVOGreen™ pour un marquage de l'apoptose, il était possible de réaliser un suivi en temps réel de l'apoptose au niveau du foie.

Ainsi, le suivi de l'apoptose 2h, 4h, 6h et 8h après injection de l'anticorps anti-Fas a pu être réalisé sur la même souris, laparotomisée et suturée à plusieurs reprises sous anesthésie à l'isoflurane, et ce avec une très bonne tolérance. L'un des avantages de cette technique est de permettre de réduire de manière significative le nombre d'animaux expérimentés au cours de ce protocole. Cette démarche est conforme aux nouvelles exigences en matière d'éthique dans l'expérimentation animale.

4.3. Détection de l'apoptose par pCLE chez des souris irradiées

Trente minutes après injection intraveineuse de FLIVOGreen™, les souris nude étaient laparotomisées sous anesthésie générale à l'isoflurane, de manière à ne dégager que la partie tumorale du foie pour en réaliser une analyse par pCLE.

Les analyses de microscopie confocale à fibres optiques, encore appelée pCLE (probe-based Confocal Laser Endomicroscopy), étaient réalisées à l'aide du système CellviZio™ (Mauna Kea Technologies, Paris, France). Ce système a été développé en deux variantes, qui diffèrent de par la longueur d'onde d'excitation du laser : 488nm ou 660nm. Au cours de nos expérimentations, nous avons utilisé le système CellviZio 488™.

Ce système (**Figure 42**) combine une unité optoélectronique basée sur un laser (Laser Scanning Unit, 488nm, Mauna Kea Technologies) une mini-sonde flexible composée de milliers de fibres optiques (ProFlex, Mauna Kea Technologies) ainsi que d'un logiciel d'analyse d'image spécifique (ImageCell, Mauna Kea Technologies). Le système CellviZio est basé sur le principe de la microscopie confocale, où les fibres optiques jouent le rôle d'objectif.

Avant chaque expérimentation, une phase de calibration de la sonde est nécessaire, au moyen d'échantillons fluorescents standard fournis avec le système. L'image détectée en temps réel

est reconstruite grâce à un algorithme propre au logiciel, la fluorescence étant traduite en unités digitales arbitraires (ADU = arbitrary digital units) sur une échelle allant de -400 à 8191 ADU (Laemmel *et al.*, 2004). Les analyses étaient réalisées à une fréquence de 12Hz, c'est-à-dire quasiment en temps réel. La sonde doit être au contact direct du tissu durant l'acquisition.

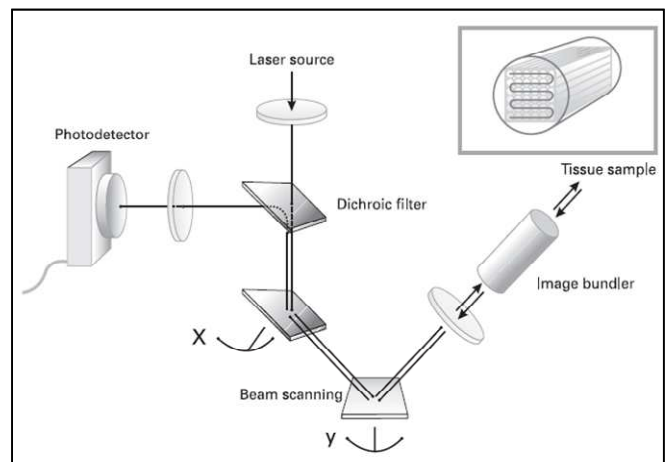
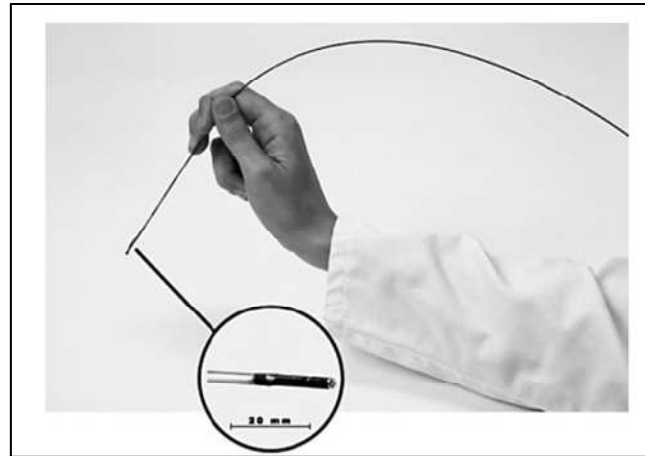


Figure 42 : Technique de pCLE (probe-based Confocal Laser Endomicroscopy)

5. Microscopie électronique à transmission

Le tissu hépatique normal ainsi que les tumeurs orthotopiques étaient découpés en petits fragments d'environ 1mm^3 , puis fixés par immersion dans une solution à 2,5% de paraformaldéhyde et 2,5% de glutaraldéhyde dans du tampon cacodylate.

La post-fixation était réalisée avec 1% de tétroxyde d'osmium dans du tampon cacodylate à 0,1M pendant une heure, à 4°C et dans l'obscurité. Les échantillons étaient ensuite déshydratés par des bains dans des gradients d'éthanol croissants (50, 70, 90 et 100%), puis inclus dans de l'Epon.

Des sections ultra-fines (70nm) étaient réalisées à l'aide d'un ultra-microtome, contrastées avec de l'acétate d'uranyle ainsi que du citrate de plomb, puis examinées avec un microscope électronique Morgagni 268D (Philips, Eindhoven, Pays-Bas).

Résultats

Article 1

Cancer Letters, 2008

Article 1 :

Induction d'autophagie dans une lignée de glioblastome humain par un traitement combinant radiations à TEL élevé et oxaliplatine.

Résumé

A l'heure actuelle, les protocoles de chimio-radiothérapie concomitante font preuve d'une grande efficacité dans le traitement de certaines tumeurs. De plus, les radiations à transfert linéique d'énergie (TLE) élevé ont fait leurs preuves dans le cas de tumeurs se caractérisant par une faible radiosensibilité et/ou une localisation critique. Les travaux effectués précédemment au laboratoire avaient démontré que l'oxaliplatine, un sel de platine de troisième génération, était capable de renforcer la cytotoxicité d'une irradiation par des neutrons rapides dans la lignée U-87, issue d'un glioblastome d'origine humaine, *in vitro*.

Dans cet article, nous démontrons la capacité d'une telle combinaison à augmenter le nombre de cassures double brin de l'ADN et induire de la mort cellulaire par autophagie dans ce modèle cellulaire.

La partie *in vivo* de ce travail consistait, quant à elle, à évaluer les effets d'une irradiation par neutrons rapides combinée à de l'oxaliplatine sur la croissance de tumeurs sous-cutanées chez la souris *nude*. Une importante diminution de la croissance tumorale a été observée chez les souris ayant été injectées à l'oxaliplatine avant irradiation, suggérant l'intérêt d'un tel cotraitement dans la prise en charge de tumeurs radiorésistantes.

Introduction

Au cours de précédents travaux effectués au sein du laboratoire, il avait été démontré que l'oxaliplatine, un dérivé du platine de troisième génération, était capable de renforcer la cytotoxicité d'une irradiation à TLE élevé par neutrons rapides dans des cellules U-87 *in vitro*, issues d'un glioblastome humain et connues pour leur radiorésistance élevée. Jusqu'alors, les analyses de mort cellulaire consistaient principalement en l'étude de l'apoptose, ou mort cellulaire programmée de type I.

Ma première contribution au sein de l'équipe de radiobiologie du laboratoire EA-3430 a été de participer à l'approfondissement de cette étude, mais également à l'étude d'un autre type de mort cellulaire : l'autophagie ou mort cellulaire programmée de type II.

En effet, ce type de mort a fait l'objet d'un intérêt croissant de la part des cancérologues ces dernières années. Il semblerait que ce phénomène puisse, au même titre que l'apoptose, participer à l'éradication des cellules tumorales.

Dans cette étude, nous avons voulu vérifier si un traitement associant neutrons rapides et oxaliplatine était capable d'induire de la mort cellulaire autophagique dans les cellules U-87, *in vitro*, mais également *in vivo* dans des tumeurs sous-cutanées issues du même modèle tumoral.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

High-LET radiation combined with oxaliplatin induce autophagy in U-87 glioblastoma cells

SAMI BENZINA, ANAÏS ALTMAYER, FATEN MALEK, PATRICK DUFOUR, JEAN-MARC DENIS, JOHN GUEULETTE and PIERRE BISCHOFF

Cancer Letters, 2008, vol. 264, n° 1, pages 63-70

Pages 92-99 :

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

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2008.01.02>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://scd.unistra.fr/services/peb/>

Conclusion

Dans cette publication, nous avons pu confirmer notre hypothèse de départ, à savoir qu'un traitement associant neutrons rapides et oxaliplatine avait pour conséquence l'apparition de mort cellulaire autophagique dans nos cellules U-87.

Les analyses de cytométrie en flux après un marquage à l'acridine orange, un marqueur des compartiments acides de la cellule (et donc des autophagolysosomes), ont mis en évidence une augmentation de la fluorescence rouge dans les cellules, correspondant à une augmentation du taux d'autophagie dans les cellules après cotraitement. Cette observation a été confirmée par western-blot de la protéine LC3.

Il faut également noter qu'un tel cotraitement a la capacité d'augmenter considérablement le nombre de coupures double-brin (CDB) de l'ADN. Ceci a pu être démontré après identification de ces CDB par un immunomarquage à l'aide d'un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée (active) de H2AX, une histone impliquée dans la réparation des CDB.

Enfin, les résultats obtenus lors des expériences *in vivo* confirment les propriétés radiosensibilisatrices de l'oxaliplatine, qui, combiné à des neutrons rapides, permet une nette diminution du volume tumoral.

Article 2

Anticancer Research, 2010

Article 2 :

Renforcement pharmacologique de l'autophagie induite par des radiations à TLE élevé dans une lignée de carcinome hépatocellulaire humain.

Résumé

Le but de cette étude a été de déterminer les conséquences cytotoxiques d'un traitement combinant neutrons rapides et oxaliplatine dans des cellules de carcinome hépatocellulaire (CHC) humain *in vitro*. De plus, nous avons tenté de corrélérer l'induction des morts cellulaires apoptotiques et autophagiques avec la formation de coupures double-brin (CDB) de l'ADN.

Les cellules SK-Hep1 ont été irradiées par des neutrons de 65MeV en présence d'oxaliplatine et/ou de PJ-34, un inhibiteur de la poly(ADP-ribose)polymérase.

Les CDB ont été comptabilisées après marquage des foci γ H2AX.

Les résultats montrent une augmentation du nombre et une persistance dans le temps des CDB chez les cellules irradiées et traitées à l'oxaliplatine. Alors que le taux d'apoptose reste faible dans les cellules cotraitées, le pourcentage de cellules autophagiques augmente considérablement dans le cas d'un traitement combinant neutrons rapides et oxaliplatine.

Ainsi, la mort cellulaire par autophagie semble jouer un rôle prédominant dans la cytotoxicité du cotraitement et pourrait être liée à la génération de graves dommages à l'ADN.

Introduction

La suite de mes travaux a essentiellement porté sur l'étude de l'autophagie induite par les radiations ionisantes seules, ou combinées à des agents radiosensibilisateurs.

Après avoir travaillé sur la lignée U-87, notre choix s'est porté sur les cellules SK-Hep1, issues d'un carcinome hépatocellulaire humain (CHC).

En effet, les CHC sont des tumeurs chimio et radiorésistantes dont le traitement à l'heure actuelle reste encore très problématique. La première partie de cette étude a consisté à déterminer les conséquences cytotoxiques des radiations à TLE élevé (neutrons rapides de 65 MeV, doses variant de 1 à 8 Gy) en présence d'oxaliplatine sur les cellules SK-Hep1.

L'une des principales hypothèses de ces travaux était notamment d'établir s'il existait une corrélation entre l'induction d'apoptose et d'autophagie, et la formation de coupures double-brin (CDB) au niveau de l'ADN des cellules irradiées. Différents tests de prolifération, ainsi qu'un suivi de la survie clonogénique ont été réalisés après traitement. L'autophagie et l'apoptose ont été quantifiées par cytométrie en flux, tandis qu'une visualisation spécifique des cellules autophagiques a été rendue possible par transfection avec un plasmide GFP-LC3. Le comptage des CDB de l'ADN a été réalisé par immunomarquage de la forme phosphorylée de l'histone γ -H2AX.

Nous avons également analysé le rôle de la poly(ADP-ribose)polymérase (PARP), et sa capacité à amplifier les effets du cotraitement, en utilisant un inhibiteur de cette enzyme nucléaire, le PJ34.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

Pharmacological Enhancement of Autophagy Induced in a Hepatocellular Carcinoma Cell Line by High-LET Radiation

ANAÏS ALTMAYER, ALAIN C. JUNG, MIHAELA IGNAT, SAMI BENZINA, JEAN-MARC DENIS, JOHN GUEULETTE, GEORDES NOËL, DIDIER MUTTER, and PIERRE BISCHOFF

Anticancer research, 2010, vol. 30, Pages 303-310

Pages 104-111 :

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

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://scd.unistra.fr/services/peb/>

Conclusion

Dans cet article, nous avons pu mettre en évidence le fait qu'un traitement combinant oxaliplatine et radiation à TLE élevé avait pour conséquence une forte diminution de la croissance des cellules SK-Hep1. L'autophagie semble être la principale cause de cette baisse de croissance.

De plus, la cytotoxicité globale du traitement apparaît comme étant liée à l'induction et à la persistance de CDB au niveau de l'ADN, suggérant que l'autophagie pourrait être impliquée dans un blocage de la réparation de l'ADN.

En ce qui concerne le rôle de la PARP dans l'induction de l'autophagie, nous avons pu remarquer que l'inhibition de cette enzyme par le PJ-34 ne jouait qu'un rôle mineur dans ce phénomène, dans nos conditions expérimentales du moins.

Ces résultats indiquent que l'autophagie pourrait, dans certains types tumoraux du moins, et en particulier les CHC, contribuer de façon importante à la destruction des cellules tumorales induite par des agents génotoxiques puissants tels que ceux utilisés dans ce travail.

Article 3

In Vivo (Accepté pour publication)

Article 3 :

Détection de la mort cellulaire après irradiation par neutrons rapides dans un carcinome hépatocellulaire humain *in vivo*.

Résumé

Les carcinomes hépatocellulaires (CHC) représentent le sixième type de cancer le plus fréquent au monde et un problème majeur de santé publique. En effet, les phénomènes de radio et chimiorésistance dont ils font preuve limitent le choix du traitement.

Nous avons précédemment démontré que des radiations à transfert linéique d'énergie (TLE) élevé induisaient de la mort cellulaire autophagique dans des cellules SK-Hep1 *in vitro*, et ce de manière massive.

Dans cet article, nous rapportons les effets d'une irradiation à TLE élevé sur le même modèle tumoral, cette fois-ci implanté de manière orthotopique chez des souris nude. Dans ce but, après avoir réalisé des xénogreffes au niveau du foie, les animaux ont été irradiés par des neutrons rapides et la mort cellulaire radio-induite a été mesurée par différentes techniques, telles que la microscopie électronique à transmission ou encore la microscopie confocale à fibres optiques.

Les résultats montrent qu'un processus autophagique considérable est déclenché dans les tumeurs orthotopiques peu de temps après irradiation, contrairement au taux d'apoptose qui reste très faible dans ces cellules. Ces résultats confirment donc les observations faites *in vitro*, à savoir que l'autophagie pourrait jouer un rôle prédominant dans l'efficacité des radiations à TLE élevé.

Introduction

Après avoir démontré l'importance de l'autophagie induite par des radiations à TLE élevé dans les cellules SK-Hep1, le but était de valider ces résultats *in vivo*.

Pour cela, nous avons étudié les effets d'une irradiation par neutrons rapides sur le même modèle tumoral, cette fois-ci implanté de manière orthotopique chez des souris nude. La pratique de ces xénogreffes au niveau du foie a nécessité une première étape consistant en l'injection sous-cutanée de cellules SK-Hep1 afin d'obtenir une première tumeur sous-cutanée. Après trois semaines de croissance, cette tumeur a été prélevée, puis sectionnée en fragments de 1mm³. Enfin, après implantation chirurgicale de ces fragments tumoraux au niveau du foie des souris, celles-ci ont été irradiées par des neutrons de 65MeV.

Différentes techniques ont été mises en œuvre dans le but d'étudier la mort cellulaire au niveau des tumeurs post-irradiation (microscopie électronique, probe-based Confocal Laser Endomicroscopy).

Les fragments de CHC, implantés de manière orthotopique au niveau du foie, ont l'avantage d'être localisé dans leur environnement naturel, représentant ainsi un modèle moins artificiel que ceux exploités précédemment (Benzina *et al.*, 2008).

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

Cell death after high-LET irradiation in orthotopic human hepatocellular carcinoma in vivo

ALTMAYER A., IGNAT M., DENIS JM, MESSADDEQ N., GUEULETTE J., MUTTER D., BISCHOFF P.

In Vivo, 2011, vol. 25, n° 1, pages 1-9.

Pages 116-134 :

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

Les utilisateurs peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://iv.iijournals.org/content/25/1/1.full.pdf+html>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://scd.unistra.fr/services/peb/>

Conclusion

Comme rapporté dans cet article, nous avons étudié les événements précoces et tardifs induits par des irradiations à TLE élevé dans des cellules de CHC *in vivo*, et ce par différentes techniques.

Les résultats montrent qu'une irradiation par neutrons rapides induit de la mort cellulaire par autophagie de manière massive au niveau des tumeurs *in vivo*, tandis que le taux d'apoptose dans ces cellules reste très faible. Ces résultats confirment nos observations faites *in vitro*, à savoir que l'autophagie pourrait jouer un rôle prépondérant dans l'efficacité des radiations à transfert d'énergie linéique élevé, telles que les neutrons rapides.

Les xénogreffes de CHC sont fréquemment utilisées pour étudier les effets cytotoxiques de nouvelles drogues. Comme nous avons pu le démontrer au cours de cette étude, ces xénogreffes représentent également un bon modèle pour l'évaluation des dommages induits par des radiations à TLE élevé *in vivo*.

Conclusions et perspectives

Parmi les cancers dont l'incidence est en constante augmentation dans notre pays, les carcinomes hépatocellulaires (CHC) posent de préoccupants problèmes en termes de santé publique et de traitement. En effet, ce type de tumeurs a développé un caractère chimio- et radiorésistant, faisant de la chirurgie une des seules approches thérapeutiques.

Dans le traitement du cancer, et plus particulièrement des tumeurs radiorésistantes, les recherches concernant la mort cellulaire induite par chimio- et radiothérapie sont déterminantes dans la mise au point de nouveaux protocoles thérapeutiques. Ainsi, une meilleure compréhension de ce phénomène de mort cellulaire est l'un des défis majeurs en cancérologie.

Les progrès techniques effectués en radiothérapie (Connel et *al.*, 2009) ces dernières années permettent à présent de délivrer la dose d'irradiation directement au sein de la tumeur avec une grande précision balistique, offrant ainsi une protection accrue des organes se situant à proximité de la tumeur.

Cette précision balistique est l'une des caractéristiques de l'hadronthérapie, qui, contrairement à la radiothérapie « conventionnelle » utilisant principalement des rayons X, fait appel à des rayonnements à transfert linéique d'énergie (TLE) élevé (Amaldi et *al.*, 2007). L'hadronthérapie constitue ainsi un des aspects les plus novateurs et les plus riches en promesses pour le traitement de certaines formes de cancers pour les années à venir.

En effet, outre la précision balistique, les rayonnements à TLE élevé ont des propriétés biologiques très avantageuses par rapport aux rayons X. Il y a toutefois peu d'informations à l'heure actuelle sur les effets d'associations entre un traitement combinant ces radiations à une chimiothérapie. De tels protocoles pourraient accroître encore davantage l'efficacité de l'hadronthérapie.

La thématique de recherche de cette thèse reposait ainsi sur l'utilisation des radiations à TLE élevé (irradiations par neutrons rapides), combinées à des molécules utilisées en chimiothérapie (oxaliplatine, inhibiteur de la poly(ADP-ribose)polymérase), dans le but d'augmenter la sensibilité de tumeurs radiorésistantes à différents types de mort cellulaire.

Le modèle tumoral étudié au cours de ces travaux était essentiellement la lignée cellulaire SK-Hep1, issue d'un carcinome hépatocellulaire d'origine humaine et connue pour sa résistance envers les radiations conventionnelles.

Ce modèle tumoral, étudié à la fois *in vitro* et *in vivo* à l'aide de greffes orthotopiques sur souris nude, a été soumis à un traitement se rapprochant des conditions d'une chimio-radiothérapie concomitante.

Dans le cas des radiations à TLE élevé, les phénomènes de mort cellulaire ont été très peu explorés à ce jour. L'apoptose correspond à programmation génétique mettant en œuvre de nombreux gènes et conduisant à la mort cellulaire. Mais il existe des alternatives à l'apoptose, notamment l'autophagie qui peut également contribuer à la destruction des cellules cancéreuses et qui suscite aujourd'hui un intérêt croissant (Levine et *al.*, 2007).

Ainsi, la principale hypothèse de travail sous-jacente à nos recherches était que l'autophagie joue un rôle déterminant dans l'efficacité des radiations ionisantes en radiothérapie, en particulier avec les radiations à TLE élevé, et notamment lorsque ces dernières sont utilisées en combinaison avec certains agents anticancéreux.

Depuis le début de ma thèse, en octobre 2007, les résultats *in vitro*, obtenus sur la lignée de carcinome hépatocellulaire humain SK-Hep1, ont été repris dans la publication intitulée « *Pharmacological enhancement of autophagy induced in Hepatocellular Carcinoma cell line by high-LET radiation* », parue dans le journal Anticancer Research.

Auparavant, j'ai pu apporter ma contribution à une étude réalisée sur un modèle cellulaire connu pour sa grande radiorésistance, la lignée U-87, issue d'un glioblastome d'origine humaine. Nous avons montré, pour la première fois, qu'une irradiation par neutrons rapides pouvait induire l'autophagie de ces cellules (Benzina, Altmeyer et *al.*, Cancer Letters, 2008). Ces résultats nous ont incités à poursuivre ce travail, à l'approfondir et à l'étendre à d'autres tumeurs radiorésistantes, et notamment aux cellules SK-Hep1.

Nous avons ainsi démontré qu'un traitement combinant oxaliplatine et radiations à TEL élevé avait pour conséquence une nette diminution de la croissance des cellules tumorales et que la mort cellulaire par autophagie était principalement impliquée dans ce phénomène.

De plus, il apparaissait que la cytotoxicité de ce traitement était liée à l'induction et à la persistance des coupures double brin au niveau de l'ADN, indiquant que l'autophagie pourrait être liée à un défaut de réparation de l'ADN. Le pourcentage de cellules apoptotiques n'étant pas renforcé par le cotraitement, nous pouvons même faire l'hypothèse que ces coupures double brin seraient à l'origine du processus autophagique. Cette étude a aussi démontré une possibilité de renforcer les effets cytotoxiques du cotraitement en inhibant la poly(ADP-ribose)polymérase (PARP) à l'aide d'un dérivé de la 6(5H)-phénantridinone doué de propriétés radiosensibilisatrices, le PJ34.

Après avoir démontré l'importance de l'autophagie dans les cellules SK-Hep1 *in vitro* après irradiation, le but était de valider ces résultats *in vivo*. Pour cela, nous avons étudié les effets d'une irradiation par neutrons rapides sur le même modèle tumoral, cette fois-ci implanté de manière orthotopique chez des souris nude. Les résultats montrent qu'une irradiation par neutrons rapides induit de la mort cellulaire par autophagie de manière massive au niveau des tumeurs *in vivo*, tandis que le taux d'apoptose dans ces cellules reste très faible. Ces résultats confirment nos observations faites *in vitro*, à savoir que l'autophagie pourrait jouer un rôle prépondérant dans l'efficacité des radiations à transfert d'énergie linéique élevé, telles que les neutrons rapides (Altmeyer et *al.*, In Vivo, 2010, article accepté pour publication).

Il faut cependant préciser, comme l'indique le titre de cette thèse, que des rayonnements autres que les neutrons rapides ont été étudiés au cours de mes travaux. En effet, outre les irradiations effectuées auprès du Cyclotron de Louvain-la-Neuve, j'ai pu participer à une expérience réalisée avec des irradiations par ions carbone, au Grand Accélérateur National d'Ions Lourds (GANIL) à Caen. Il est ressorti de cette expérience que les ions carbone sont capables d'induire des dommages encore plus sévères que les neutrons rapides, confirmant des résultats antérieurs obtenus avec d'autres lignées cancéreuses. Cependant, ces résultats n'ayant été obtenus qu'une seule fois et n'ayant pas eu l'occasion de retourner au GANIL, j'ai préféré ne pas les rapporter dans le présent manuscrit. Les conclusions définitives quant aux effets de telles irradiations au niveau de notre lignée de carcinome hépatocellulaire, en

présence ou non d'agent radiosensibilisateur, ne pourront être tirées qu'après confirmation de ces résultats par des expériences ultérieures menées au GANIL.

La dernière thématique abordée au cours de mon travail de thèse a été l'étude des propriétés radiosensibilisatrices du RAD001 après irradiation par neutrons rapides vs rayons X.

Inhibiteur très puissant de mTOR, RAD001 permet une modulation de l'autophagie radio-induite. Nous avons voulu nous baser sur cette modulation de l'autophagie pour tenter d'étudier la relation liant cette mort cellulaire autophagique à l'apoptose, mais également pour essayer d'éclaircir le rôle que ces deux morts semblent jouer conjointement dans la destruction de cellules tumorales radiorésistantes dans certaines conditions de traitement.

Cette étude, toujours menée sur le modèle cellulaire SK-Hep1, est d'ores et déjà à l'origine de nombreux résultats qui vont faire l'objet d'une nouvelle publication dans un futur proche. Certaines expériences restant à confirmer, il a été préférable de ne pas inclure ces résultats dans ce manuscrit.

Plusieurs perspectives de poursuite de ce travail sont envisageables, dans l'état actuel des choses :

- Il faudra, tout d'abord, confirmer les résultats obtenus à l'aide du RAD001 avec d'autres lignées présentant des radiosensibilités différents. Cette étude, plus mécanistique que celles menées auparavant, permettra de conclure quant à notre hypothèse selon laquelle la modulation pharmacologique de la mort cellulaire autophagique, couplée aux effets cytotoxiques des rayonnements, permet d'augmenter encore l'efficacité du traitement.
- Notre collaboration avec le laboratoire de chimie bio-organique d'Alain Wagner (Faculté de Pharmacie, Illkirch) a permis la synthèse très récemment d'une molécule hybride, combinant un sel de platine à un inhibiteur de la PARP, molécule qui est actuellement testée au laboratoire sur des lignées tumorales humaines connues pour leur grande radiorésistance (lignées SK-Hep1 et U-87) et toutes autres lignées qui pourront être introduites en fonction de nos résultats.

- Enfin, plusieurs expériences vont faire l'objet d'une étude visant à comparer les effets d'une irradiation par fractionnement de dose vs une irradiation délivrée en une dose unique. L'avantage de ce type d'expériences est de se rapprocher des protocoles radiothérapeutiques utilisés de manière standard en clinique actuellement. Ces expériences débuteront en février prochain, dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire iThemba LABS (Cape Town, Afrique du Sud). Plusieurs types de rayonnements y seront étudiés. L'étude du fractionnement de dose pourra, par la suite, se poursuivre au sein du Centre Paul Strauss de Strasbourg, qui va se doter d'un irradiateur BioBeam 8000, au Césium 137. Cet irradiateur autoprotégé sera entièrement dédié à la recherche, et servira aussi bien à l'irradiation des cellules qu'à celle de petits animaux.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abedin MJ, Wang D and McDonnell MA: Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. *Cell Death Diff* 14: 500-510, 2007.

Altmeyer A, Jung AC, Ignat M, Benzina S, Denis JM, Gueulette J, Noël G, Mutter D and Bischoff P: Pharmacological enhancement of autophagy in a hepatocellular carcinoma cell line by high-LET radiation. *Anticancer Res* 30: 303-310, 2010.

Amaldi U and Kraft G: European developments in radiotherapy with beams of large radiobiological effectiveness. *J Radiat Res* 48: 27-41, 2007.

Amaravadi RK and Thompson CG: The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clin Cancer Res* 13: 7271-7279, 2007.

American Biosciences, Inc: Combinations and modes of administration of therapeutic agents and combination therapy. WO1006089290, 2006.

Anderson P, Aguilera D, Pearson M *et al.* : Outpatient chemotherapy plus radiotherapy in sarcomas: improving cancer control with radiosensitizing agents. *Cancer Control* 15: 38-46, 2008.

Asnacios A, Fartoux L, Romano O, Tesmoingt C, Louafi SS, Mansoubakht T, Artru P, Poynard T, Rosmorduc O, Hebbar M and Taieb J : Gemcitabine plus oxaliplatin (GEMOX) combined with cetuximab in patients with progressive advanced stage hepatocellular carcinoma : results of a multicenter phase 2 study. *Cancer* 112 : 2733-2739, 2008.

Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G and Ktistakis NT: Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol-3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 182: 685-701, 2008.

Bache M, Kappler M, Said HM *et al.*: Detection and specific targeting of hypoxic regions within solid tumors: current preclinical and clinical strategies. *Curr Med Chem* 15: 322-338, 2008.

Barker CA, Burgan WE, Carter DJ *et al.*: In vitro and in vivo radiosensitization induced by the ribonucleotide reductase inhibitor Triapine. *Clin Cancer Res* 12: 2912-2918, 2006.

Beau I, Esclatine A and Codogno P: Lost to translation: when autophagy targets mature ribosomes. *Trends Cell Biol* 18: 311-314, 2008.

Ben-Joseph E: Capecitabine and radiotherapy as neoadjuvant treatment for rectal cancer. *Am J Clin Oncol* 30: 649-655, 2007.

Bentzen SM, Harari PM, Bernier J: Exploitable mechanisms for combining drugs with radiation: concepts, achievements and future directions. *Nat Clin Pract Oncol* 4: 172-180, 2007.

Benzina S, Fischer B, Miterique-Grosse A and Bischoff P: Cell death induced in a human glioblastoma cell line by p(65)+Be neutrons combined with cisplatin. *Life Sci* 79: 513-518, 2006.

Benzina S, Debomy F, Bergerat JP and Bischoff P: The cytotoxicity of high-linear energy radiation is reinforced by oxaliplatin in human glioblastoma cells. *Cancer Lett* 254: 54-62, 2007.

Benzina S, Altmeyer A, Malek F, Dufour P, Denis JM, Gueulette J and Bischoff P: High-LET radiation combined with oxaliplatin induce autophagy in U-87 glioblastoma cells. *Cancer Lett* 264: 63-70, 2008.

Bernier J, Hall EJ and Giacca A: Radiation oncology: a century of achievements. *Nat Rev Cancer* 4: 737-747, 2004.

Bhaskar PT and Hay N: Tho two TORCs and Akt. *Dev Cell* 12: 487-502, 2007.

Bialik S and Kimchi A : The death-associated protein kinase: structure, function and beyond. *Annu Rev Biochem* 75: 189-210, 2006.

Bischoff P, Altmeyer A and Dumont F: Radiosensitizing agents for the radiotherapy of cancer: advances in traditional and hypoxia targeted radiosensitizers. *Expert Op Ther Pat* 19: 643-662, 2009.

Bjornsti MA and Houghton PJ: The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4: 335-348, 2004.

Bosch FX, Ribes J, Diaz M and Cleries R: Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 127: 5-16, 2004.

Brown JM: The hypoxic cell: a target for selective cancer-therapy. *Cancer Res* 59: 5863-5870, 1999.

Brown JM: Tumor hypoxia in cancer therapy. *Methods Enzymol* 435: 297-321, 2007.

Bussink J, van der Kogel AJ and Kaanders JH: Activation of the PI3K/AKT pathway and implications for radioresistance mechanisms in head and neck cancer. *Lancet Oncol* 9: 288-296, 2008.

Candi E, Schmidt R and Melino G: The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 328-340, 2005.

Cariveau MJ, Stackhouse M, Cui XL *et al.*: Clorafabine acts as radiosensitizer in vitro and in vivo by interfering with DNA damage response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 70: 213-220, 2008.

Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R and Kroemer G: Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23: 2825-2837, 2004.

Chen S, Rehman SK, Zhang W, Wen A, Yao L and Zhang J: Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. *Biochem Biophys Acta*, 2010 (in press).

Chitapanarux I, Lorvidhaya V and Kamnerdsupaphon P: Chemoradiation comparing cisplatin versus carboplatin in locally advanced nasopharyngeal cancer: randomized non-inferiority, open trial. *Eur J Cancer* 43: 1399-1406, 2007.

Chiu SJ, Chao JI and Lee YJ: Regulation of gamma H2AX and securing contribute to apoptosis by oxaliplatin via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in human colorectal cancer cells. *Toxicol Lett* 179: 63-70, 2008.

Cividalli A, Ceciarelli F and Livdi E: Radiosensitization by oxaliplatin in a mouse adenocarcinoma: influence of treatment schedule. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 52: 1092-1098, 2002.

Codogno P: ATG genes and macroautophagy. *Med Sci* 20: 734-736, 2004.

Codogno P and Meijer A: Autophagy and signalling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* 12: 1509-1518, 2005.

Cortot A, Armand JP and Soria JC: PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors. *Bull Cancer* 93: 12-26, 2006.

Crichton D, O'Prey J, Bell HS and Ryan KM: p73 regulates DRAM-independent activation of autophagy that does not contribute to programmed cell death. *Cell Death Differ* 14: 1071-1079, 2007.

Crichton D, Wilkinson S and Ryan KM: DRAM links autophagy to p53 and programmed cell death. *Autophagy* 3: 72-74, 2007.

Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vasquez F, Mootha VK and Puigserver P: mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 α transcriptional complex. *Nature* 450: 736-740, 2007.

Daido S, Yamamoto A and Fugiwara K: Inhibition of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit radiosensitizes malignant glioma cells by inducing autophagy. *Cancer Res* 65: 4368-4375, 2005.

Dalby KN, Tekedereli I, Lopez-Berestein G and Ozpolat B: Targeting the prodeath and prosurvival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. *Autophagy* 6: 322-329, 2010.

Dancey JE: Inhibitors of the mammalian target of rapamycin. *Expert Opin Investig Drugs* 14: 313-328, 2005.

Darzynkiewicz Z: Broken beyond repair. Damaging DNA glioblastoma cells with radiation and camptothecin. *Cancer Biol Ther* 7: 374-375, 2008.

Dawson LA: The evolving role of radiation therapy in hepatocellular carcinoma. *Cancer Radiother* 12: 96-101, 2008.

Dawson LA, Normolle D, Balter JM, McGinn CJ, Lawrence TS and Ten Haken RK: Analysis of radiation-induced liver disease using the Lyman NTCP model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 53: 810-821, 2002.

De Duve C and Wattiaux R: Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* 28: 435-492, 1966.

Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, G  linas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S and White E: Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation and tumorigenesis. *Cancer Cell* 10: 51-64, 2006.

Degterev A, Hitomi J, Germscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X et al.: Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol* 4: 313-321, 2008.

De Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Walztinger C, Chambon P and de Murcia G: Requirement of poly(ADP-ribose)polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7303-7307, 1997.

Dewhirst MW, Cao Y and Moeller B: Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat Rev Cancer* 8: 425-437, 2008.

Dikic I, Johansen T and Kirkin V: Selective autophagy in cancer development and therapy. *Cancer Res* 70: 3431-3434, 2010.

Ding ZB, Shi YH, Zhou J, Qiu SJ, Xu Y, Dai Z, Shi GM, Wang XY, Ke AW, Wu B and Fan J: Association of autophagy defect with a malignant phenotype and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 68: 9167-9175, 2008.

Dumont F, Altmeyer A and Bischoff P: Radiosensitizing agents for the radiotherapy of cancer: novel molecularly targeted approaches. *Expert Op Ther Pat* 19: 775-799, 2009.

Duney FA, Loser DA and Chalmers AJ: Replication-dependent radiosensitization of human glioma cells by inhibition of poly(ADP-ribose)polymerase: mechanisms and therapeutic potential. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 72: 1188-1197, 2008

Dunn WA: Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol* 4: 139-143, 1994.

Durdux C: Cisplatin and derivatives with radiation therapy: for what clinical use? *Cancer Radiother* 8: 88-94, 2004.

El-Khamisy SF, Masutani M, Suzuki H and Caldecott KW: A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res* 31: 5526-5533, 2003.

El-Serag HB and Mason AC: Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Eng J Med* 340: 745-750, 1999.

Eshleman JS, Carlson BL, Mladek AC, Kastner BD, Shide KL and Sarkaria JN: Inhibition of the mammalian target of rapamycin sensitizes U87 xenografts to fractionated radiation therapy. *Cancer Res* 62: 7291-7297, 2002.

Eskelinen EL: Maturation of autophagic vacuoles in mammalian cells. *Autophagy* 1: 1-10, 2005.

Eskelinen EL: Fine structure of the autophagosome. *Methods Mol Biol* 445: 11-28, 2008.

Eskelinen EL: The mystery of the membranes. *Autophagy* 4: 3-4, 2008.

Esposito V, Palescandolo E, Spugnini EP, Montesarchio V, De Luca A, Cardillo I, Cortese G, Baldi A and Chirianni A : Evaluation of antitumoral properties of the protease inhibitor indinavir in a murine model of hepatocarcinoma. *Clin Cancer Res* 12: 2634-2639, 2006.

Faivre S, Chan D and Salinas R: DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *Biochem Pharmacol* 66: 225-237, 2003.

Fass E, Shvets E, Degani I, Hirschberger K and Elazar Z: Microtubules support production of starvation-induced autophagosomes but not either targeting and fusion with lysosomes. *J Biol Chem* 281: 36303-36316, 2006.

Fei P and El Deiry WS: P53 and radiation responses. *Oncogene* 22: 5774-5783, 2003.

Festjens N, Vanden Berghe T and Vandenabeele P: Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochem Biophys Acta* 1757: 1371-1387, 2006.

Flanagan SA, Robinson BW, Krokosky CM *et al.*: Mismatched nucleotides as the lesions responsible for radiosensitization with gemcitabine : a new paradigm for antimetabolite radiosensitizers. *Mol Cancer Ther* 6: 1858-1868, 2007.

Franco S, Gostissa M and Zha S: H2AX prevents DNA breaks from progressing to chromosome breaks and translocation. *Mol Cell* 21: 201-214, 2006.

Fujiwara K, Iwato E and Mills GB: AKT inhibition shows anticancer and radiosensitizing effects in malignant cells by inducing autophagy. *Int J Oncol* 31: 753-760, 2007.

Fumoleau P, Coudert B, Isambert N *et al.*: Novel tubulin-targeting agents: anticancer activity and pharmacologic profile of epothilones and related analogues. *Ann Oncol* 18: 9-15, 2007.

Gao W, Kang JH, Liao Y, Ding WX, Gambotto AA, Watkins SC, Liu YJ, Stolz DB and Yin XM: Biochemical isolation and characterization of the tubulovesicular LC3-positive autophagosomal compartment. *J Biol Chem* 285: 1371-1383, 2010.

Garcia-Escudero V and Gargini R: Autophagy induction as an efficient strategy to eradicate tumors. *Autophagy* 4: 923-925, 2008.

Gérard JP, Thariat J, Giraud P and Cosset JM: Past, present and near future of techniques in radiation oncology. *Bull Cancer* 97: 743-751, 2010.

Gewirtz DA, Hilliker ML and Wilson EN: Promotion of autophagy as a mechanism of radiation sensitization of breast tumor cells. *Radiother Oncol* 62: 323-328, 2009.

Gilmore AP: Anoikis. *Cell Death Differ* 12: 1473-1477, 2005.

Golstein P and Kroemer G: Cell death by necrosis: towards a molecule definition. *Trends Biochem Sci* 32: 37-43, 2007.

Gonzales-Polo RA, Boya P, Pauleau AL, Jalil A, Larochette N, Souquere S, Eskelinen EL, Pierron G, Saftig P and Kroemer G: The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J Cell Science* 118: 3091-3102, 2005.

Gozuacik D and Kimchi A: Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23: 2891-2906, 2004.

Gozuacik D, Bialik S and Raveh T: DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspases activation and autophagic cell death. *Cell Death Differ* 15: 1875-1886, 2008.

Gradwohl G, Menissier de Murcia JM, Molinete M, Simonin F, Koken M, Hoeijmakers JH and de Murcia G: The second zinc-finger domain of poly(ADP-ribose)polymerase determines specificity for single-stranded breaks in DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2990-2994, 1990.

Greenow KR, Clarke AR and Jones RH: Chk1 deficiency in the mouse small intestine results in p53 independent crypt death and subsequent intestinal compensation. *Oncogene* 18: 1443-1453, 2009.

Hada M and Georgakilas AG: Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review. *J Radiat Res* 49: 203-210, 2008.

Haince JF, McDonald D, Rodrigue A, Dery U, Masson JY, Hendzel MJ and Poirier GG: PARP-1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NSB1 proteins to multiple DNA damage sites. *J Biol Chem* 283: 1197-1208, 2008.

Hakme A, Wong HK, Dantzer F and Schreiber V: The expanding field of poly(ADP-ribosyl)ation reactions. 'protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep* 9: 1094-1100, 2008.

Hao D, Ritter Ma and Oliver: Platinum-based concurrent chemoradiotherapy for tumors of the head and neck and the esophagus. *Sem Radiat Oncol* 16: 10-19, 2009.

- Hay N: The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell* 8: 179-183, 2005.
- Hermann RM, Rave-Fränk M and Pradier O: Combining radiation with oxaliplatin: a review of experimental results. *Cancer Radiother* 12: 61-67, 2008.
- Hino M, Wada S and Tajika Y: Heavy ion microbeam irradiation induces ultrastructural changes in isolated single fibers of skeletal muscle. *Cell Struct Funct* 32: 51-56, 2007.
- Hippert MM, O'Toole PS and Thorburn A: Autophagy in cancer: good, bad, or both? *Cancer Res* 66: 9349-9351, 2006.
- Hofstetter B, Vuong V, Broggin-Tenzer A *et al.*: Patupilone acts as radiosensitizing agent in multidrug-resistant cancer cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 11: 588-596, 2005.
- Holl V, Coelho D, Weltin D, Denis JM, Dufour P, Gueulette J and Bischoff P: Ex vivo determination of the effect of whole-body exposure to fast neutrons on murine spleen cell viability and apoptosis. *Radiat Res* 154: 301-306, 2000.
- Horn HF and Vousden KH: Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene* 26: 1306-1316, 2007.
- Huang SH, Xiong M and Chen XP: PJ34, an inhibitor of PARP-1, suppresses cell growth and enhances the suppressive effects of cisplatin in liver cancer cells. *Oncol Rep* 20: 567-572, 2008.
- Huynh H, Soo KC, Chow PK, Panasci L and Tran E: Xenografts of human hepatocellular carcinoma: a useful model for testing drugs. *Clin Cancer Res* 12: 4306-4314, 2006.
- Ibrahim MM, Razmara M, Nguyen D, Donahue RJ, Wubah JA and Knudsen TB: Altered expression of mitochondrial 16S ribosomal RNA in p53-deficient mouse embryos revealed by differential display. *Biochim Biophys Acta* 1403: 254-264, 1998.

Iliakis G: Backup pathways of NHEJ in cells of higher eukaryotes: cell cycle dependence. *Radiother Oncol* 92: 310-315, 2009.

Inbal B, Cohen O and Polak-Charcon S: DAP-kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature* 390: 180-184, 1997.

Ito H, Daido S, Kanzawa T, Kondo S and Kondo Y: Radiation-induced autophagy is associated with LC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells. *Int J Oncol* 26: 1401-1410, 2005.

Jin S and White E: Role of autophagy in cancer. *Autophagy* 3: 28-31, 2007.

Jordheim L, Galmarini CM and Dumontet C: Recent developments to improve the efficacy of cytotoxic nucleoside analogs. *Recent Patents Anticancer Drug Discov* 1: 163-170, 2006.

Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y and Yoshimori T: LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO* 19: 5720-5728, 2000.

Kalai M, Van Loo G, Vanden Berghe T, Meeus A, Burm W, Saelens X et al., Tipping the balance between necrosis and apoptosis in human and murine cells treated with interferon and dsRNA. *Cell Death Differ* 9: 981-994, 2002.

Kanzawa T, Germano IM and Komata T: Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Diff* 11: 448-457, 2004.

Kazuno H, Shimamoto Y, Tsujimoto H *et al.*: Mechanism of action of a new antitumor ribonucleoside differs from that of 5-fluorouracil. *Oncol Rep* 17: 1453-1460, 2007.

Kelland L: The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 7: 573-584, 2007.

Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 16: 239-257, 1972.

Kil WJ, Cerna D, Burgan WE *et al.*: In vitro and in vivo radiosensitization induced by the DNA methylating agent témozolomide. *Clin Cancer Res* 14: 931-938, 2008.

Kim HE, Krug MA and Han I: Neutron radiation enhances cisplatin cytotoxicity independently of apoptosis in human head and neck carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 6: 4142-4147, 2000.

Kim KW, Mutter RW, Cao C, Albert JM, Freeman M, Hallahan DE and Lu B: Autophagy for cancer therapy through inhibition of pro-apoptotic proteins and mammalian target of rapamycin signalling. *J Biol Chem* 281: 36883-36890, 2006.

Kim KW, Hwang M and Moretti L: Autophagy up-regulation by inhibitors of caspases-3 and mTOR enhances radiotherapy in a mouse model of lung cancer. *Autophagy* 4: 659-668, 2008.

Kim MY, Zhang T and Kraus WL: Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes Dev* 19: 1951-1967, 2005.

Kim R, Emi M and Tanabe K: The role of apoptotic and nonapoptotic cell death in determining cellular response to anticancer treatment. *Eur J Surg Oncol* 32: 269-277, 2006.

Kitasato Gakuen Foundation. Chemoradiotherapy with TS-1/camptothecins. US1007036717, 2007.

Klionsky DJ and Emr SD: Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290: 1717-1721, 2000.

Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA *et al.*: A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 5: 539-545, 2003.

Kochl R, Hu XW, Chan EYW and Tooze SA: Microtubules facilitates autophagosomes formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic* 7: 1-17, 2006.

Kondo T, Suda T, Fukuyama H, Adachi M and Nagata S: Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis. *Nat Med* 3: 409-413, 1997.

Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R and Kondo S: The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer* 5: 726-734, 2005.

Kondo Y and Kondo S: Autophagy and cancer therapy. *Autophagy* 2: 85-90, 2006.

Kraft C, Deplazes A, Sohrmann M and Peter M: Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nat Cell Biol* 10: 602-610, 2008.

Kroemer G and Jäätelä M: Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 5: 886-897, 2005.

Kroemer G and Levine B: Autophagic cell death: the story of misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 1004-1010, 2008.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nunez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B and Melino G: Classification of cell death. *Cell Death Differ* 16: 3-11, 2009.

Kunos CA, Waggoner S, von Grueniger V, Eldermire E, Pink J, Dowlati A and Kinsella TJ: Phase I trial of pelvic radiation, weekly cisplatin, and 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) for locally advanced cervical cancer. *Clin Cancer Res* 16: 1298-1306, 2010.

Labbe K and Saleh M: Cell death in the host response to infection. *Cell Death Differ* 15: 1339-1349, 2008

Lambert LA, Qiao N and Hunt KK: Autophagy: a novel mechanism of synergistic cytotoxicity between doxorubicin and roscovitine in a sarcoma model. *Cancer Res* 68: 7966-7974, 2008.

Langelier MF, Servent KM, Rogers EE and Pascal JM: A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose)polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation. *J Biol Chem* 283: 4105-4115, 2008.

Lawrence TS, Blackstock AW and McGinn C: The mechanism of action of radiosensitization of conventional chemotherapeutic agents. *Semin Radiat Oncol* 13: 13-21, 2003.

Lee CH, Wu CL and Shiau AL: Salmonella choleraesuis as an anticancer agent in a syngeneic model of orthotopic hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 122: 930-935, 2008.

Lefranc F, Facchini V and Kiss R: Proautophagic drugs: a novel means to combat apoptosis-resistant cancers, with a special emphasis on glioblastomas. *Oncologist* 12: 1395-1403, 2007.

Lemasters JJ: Selective mitochondrial autophagy, or mitophagie, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res* 8: 3-5, 2005.

Levine B, Sinha S and Kroemer G: Bcl-2 family members. *Autophagy* 4: 600-606, 2008.

Lévy A, Sauvin LA, Massard C and Soria JC: Everolimus (RAD001) and solid tumors: a 2008 summray. *Bull Cancer* 95: 1205-1211, 2008.

Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H and Levine B: Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by Beclin-1, *Nature*, 402: 672-676, 1999.

Lin CI, Whang EE, Donner DB, Du J, Lorch J, He F, Jiang X, Price BD, Moore FD Jr and Ruan DT: Autophagy induction with RAD001 enhances chemosensitivity and radiosensitivity through Met inhibition in papillary thyroid cancer. *Mol Cancer Res* 8: 1217-1226, 2010.

Lippens S, Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P and Declercq W: Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. *Cell Death Differ* 12: 1497-1508, 2005.

Llovet JM, Fuster J and Bruix J: Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. *Hepatology* 30: 1434-1440, 1999.

Llovet JM and Beaugrand M: Hepatocellular carcinoma: present status and future prospects. *J Hepatol* 38: 136-1149, 2003.

Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, Cosme de Oliveira A, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Ezuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D and Bruix J: Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Eng J Med* 359: 378-390, 2008.

Lonskaya I, Potaman VN, Shlyakhtenko LS, Oussatcheva EA, Lyubchenko YL and Solatenkov VA: Regulation of poly(ADP-ribose)polymerase-1 by DNA structure-spécific binding. *J Biol Chem* 280: 17076-17083, 2005.

Lorin S, Codogno P and Djavaheiri-Mergny M: Autophagy: a new concept in cancer research. *Bull Cancer* 95: 43-50, 2008.

Majumder PK, Febbo PG, Bikoff R, Berger R, Xue Q, McMahon LM, Manola J, Brugarolas J, McDonnell TJ, Golub TR, Loda M, Lane HA and Sellers WR: mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. *Nat Med* 10: 594-601, 2004.

Martinon F, Gaide O, Petrilli V, Mayor A and Tschopp J: NALP inflammasomes: a central role in innate immunity. *Semin Immunopathol* 29: 213-229, 2007.

Manegold PC, Paringer C, Kulka U, Krimmel K, Eichhorn ME, Wilkowski R, Jauch KW, Guba M and Bruns CJ: Antiangiogenic therapy with mTOR inhibitor RAD001 increases radiosensitivity in solid cancer. *Clin Cancer Res* 14: 892-900, 2008.

Masutani M, Nozaki T, Nishiyama E, Shimokawa T, Tachi Y, Suzuki H, Nakagama H, Wakabayashi K and Sugimura T: Function of poly(ADP-ribose)polymerase in response to DNA damage: gene disruption study in mice. *Mol Cell Biochem* 193: 149-152, 1999.

McKeown SR, Cowen RL and Williams KJ: Bioreductive drugs: from concept to clinic. *Clin Oncol* 19: 427-442, 2007.

Mégnin-Chanet F, Bollet MA and Hall J: Targeting poly(ADP-ribose)polymerase activity for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 67: 3649-3662, 2010.

Meijer AJ and Codogno P: Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2445-2462.

Meléndez A and Levine B: Autophagy in *C. elegans*. *Worm-book* 24: 1-26, 2009.

Meley D, Pattingre S and Codogno P: PI3 kinases and the control of autophagy. *Bull Cancer* 93: 439-444, 2006.

Melino G: The sirens' song. *Nature* 412: 23, 2001.

Milas L, Mason KA, Liao Z and Ang KK: Chemoradiotherapy: emerging treatment improvement strategies. *Head & Neck* 25: 152-167, 2003.

Mizushima N, Yoshimori T and Levine B: Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 140: 313-326, 2010.

Moeller BJ and Dewhirst MW: Raising the bar: how HIF-1 helps determine tumor radiosensitivity. *Cell Cycle* 3: 1107-1110, 2004.

Moeller BJ, Dreher MR, Rabbani ZN, Schroeder T, Cao Y, Li CY and Dewhirst MW: Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. *Cancer Cell* 8: 99-110, 2005.

Momekov G and Momekova D: Recent developments in antitumor platinum coordination compounds. *Expert Opin Ther Patents* 16: 1383-1403, 2006.

Monastyrska I and Klionsky DJ: Autophagy in organelle homeostasis: peroxysome turnover. *Molec Aspects Med* 27: 483-494, 2006.

Mulcahy MF: Management of hepatocellular cancer. *Curr Treat Options Oncol* 6: 423-435, 2005.

Murray-Zmijewski F, Slee EA and Lu X: A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 stress. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 702-712, 2008.

Nakata E, Fukushima M, Takai Y et al.: S-1, an oral fluoropyrimidine, enhances radiation response of DLD-1/FU human colon cancer xenografts resistant to 5-FU. *Oncol Rep* 16: 465-471, 2006.

Nehmé A, Baskaran R and Nebel S: Induction of JNK and c-Abl signalling by cisplatin and oxaliplatin in mismatch repair proficient and deficient cells. *Br J Cancer* 79: 1104-1110, 1999.

Nieder C, Adam M and Grosu AL: Combined modality treatment of glioblastoma multiforme: the role of témozolomide. *Rev Recent Clin Trials* 1: 43-51, 2006.

Nukatsuka M, Fujioka A, Nakagawa F *et al.*: Antimetastatic and anticancer activity of S-1, a new oral dihydropyrimidine-dehydrogenase-inhibiting fluoropyrimidine, alone and in combination with paclitaxel in an orthotopically implanted human breast cancer model. *Int J Oncol* 25: 1531-1536, 2004.

Oehler C, Dickinson DJ and Broggin-Tenzer M: Current concepts for the combined treatment modality of ionizing radiation with anticancer agents. *Curr Pharm Des* 13: 519-535, 2007.

Ohsumi Y: Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 211-216, 2001.

Okada H and Mak TW: Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 4: 592-603, 2004.

Orecchia R, Krengli M, Jerezek-Fossa BA, Franzetti S and Gerard JP: Clinical and research validity of hadrontherapy with ion beams. *Crit Rev Oncol Hematol* 51: 81-90, 2004.

Orrenius S, Zhivotovsky B and Nicotera P: Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 552-565, 2003.

Otto GP, Wu MY, Kazgan N, Anderson OR and Kessin RH: Dictyostelium macroautophagy mutants vary in the severity on their developmental defects. *J Biol Chem* 279: 15621-15629, 2004.

Overgaard J: Hypoxic radiosensitization: adored and ignored. *J Clin Oncol* 25: 4066-4074, 2007.

Overholzer M, Mailleux AA, Mouneimne G, Normand G, Schnitt SJ, King RW and al.: A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell* 131: 966-979, 2007.

Pagin S, Hollister T and Delohery T: A novel response of cancer to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res* 61: 439-444, 2001.

Pandita TK, Lieberman HK, Lim DS, Dhar S, Zheng W, Taya Y and Kastan MB: Ionizing radiation activates the ATM kinase throughout the cell cycle. *Oncogene* 19: 1386-1391, 2000.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J and Pisani P: Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55: 74-108, 2005.

Pawlik TM and Keyomarsi K: Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59: 928-942, 2004.

Pendyala L and Creaven PJ: In vitro cytotoxicity, protein binding, red blood cell partitioning, and biotransformation of oxaliplatin. *Cancer Res* 53: 5970-5976, 1993.

Petroulakis E, Mamane Y, Le Bacquer O, Shahbazian D and Sonenberg N: mTOR signalling: implications for cancer and anticancer therapy. *Br J Cancer* 94: 195-199, 2006.

Petrucchio S and Percudani R: Structural recognition of DNA by poly(ADP-ribose)polymerase-like zinc finger families. *FEBS J* 275: 883-893, 2008.

Pommier P, Balosso J, Bolla M and Gérard JP: The French project ETOILE: review of clinical data for light ion hadrontherapy. *Cancer Radiother* 6: 369-378, 2002.

Pommier Y: Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* 6: 789-802, 2006.

Pons-Renedo F and Llovet JM: Hepatocellular carcinoma: a clinical update. *Med Gen Med* 5: 11, 2003.

Radford IR: DNA lesion complexity and induction of apoptosis by ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 78: 457-466, 2002.

Raff MC, Whitmore AV and Finn JT: Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science* 296: 868-871, 2002.

Rashmi R, Pillai SG, Vijayalingam S, Ryerse J and Chinnadurai G: BH3-only protein BIK induces caspases-independent cell death with autophagic features in Bcl-2 null cells. *Oncogene* 27: 1366-1375, 2008.

Rathore R, Safran H, Soares G, Dubel G, McNulty B, Ahn S, Iannitti D and Kennedy T: Phase I study of hepatic arterial infusion of oxaliplatin in advanced hepatocellular cancer: a brown university oncology group study. *Am J Clin Oncol* 33: 43-46, 2010.

Ratnam K and Low JA: Current development of clinical inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase in oncology. *Clin Cancer Res* 13: 1383-1388, 2007.

Riccardi C and Nicoletti I: Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protoc* 1: 1458-1461, 2006.

Ricci MS and Zong WX: Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist* 11: 342-357, 2006

Rieber M and Rieber MS: Sensitization to radiation-induced DNA damage accelerates loss of Bcl-2 and increases apoptosis and autophagy. *Cancer Biol Ther* 7: 1561-1566, 2008.

Rixe O and Fojo T: Is cell death a critical end point for anticancer therapies or is cytostasis, sufficient. *Clin Cancer Res* 13: 7280-7287, 2007.

Roberts LR and Gores GJ: Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets. *Semin Liver Dis* 25: 212-225, 2005.

Roninson IB, Broude EV and Chang BD: If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* 4: 303-313, 2001.

Russo AL, Kwon HC, Burgan WE, Carter D, Beam K, Weizheng X, Zhang J, Slusher BS, Chakravarti A, Tofilon PJ and Camphausen K: *In vitro* and *in vivo* radiosensitization of glioblastoma cells by the poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor E7016. *Clin Cancer Res* 15: 607-612, 2009.

Sabatini DM: mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer* 6: 729-734, 2006.

Saif MW, Berk G, Cheng YC *et al.*: IPdR: a novel oral radiosensitizer. *Expert Opin Invest Drugs* 16: 1415-1424, 2007.

Schreiber V, Dantzer F, Ame JC and de Murcia G: Poly(ADP-ribose): novel functions for old an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 517-528, 2006.

Schwartzernberg-bar-Yoseph F, Armoni M and Karnieli E : The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res* 64 : 2627-2633, 2004.

Seiwert TY, Salama JK and Vokes EE: The concurrent chemoradiation paradigm-general principles. *Nat Clin Pract Oncol* 4: 86-100, 2007.

Semenza GL: Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug Discov Today* 12: 853-859, 2007.

Shall S and de Murcia G: Poly(ADP-ribose)polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat Res* 460: 1-15, 2000.

Shao Y, Gao Z, Marks PA and Jiang X: Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 18030-18035, 2004.

Shewach DS and Lawrence TS: Antimetabolite radiosensitizers. *J Clin Oncol* 25: 4043-4050, 2007.

Simonin F, Poch O, Delarue M and de Murcia G: Identification of potential active-site residues in the human poly(ADP-ribose)polymerase. *J Biol Chem* 268: 8529-8535, 1993.

Smolewski P: Recent developments in targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase pathway. *Anticancer Drugs* 17: 487-494, 2006.

Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P and Lieberman J: RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 9: 347-351, 2003.

Southern Research Institute: Methods for treating neoplasia with combination of chemotherapeutic agents and radiation. WO2008128170, 2008.

Sperandio S, de Belle I and Bredesen DE: An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14376-14381, 2000.

Steelman LS, Abrams SL, Whelan J, Bertrand FA, Ludwig DE, Basecke J, Libra M, Stivala F, Milella M, Tafuri A, Lunghi P, Bonati A, Martelli AM and McCubrey JA: Contributions of the Raf/MEK/ERK/PI3K/PTEN/Akt/mTOR and JAK/STAT pathways to leukaemia. *Leukemia* 22: 686-707, 2008.

Taiho Pharmaceutical Co.: Radiotherapy enhancer. EP1864683, 2007.

Taiho Pharmaceutical Co.: Potentiator for radiation therapy comprising pyridine derivative as active ingredient. EP1864974, 2007.

Takahashi T, Hara K, Inoue H, Kawa Y, Tokunaga C, Hidayat S, Yoshino K, Kuroda Y and Yonezawa K: Carboxy-terminal region conserved among phosphoinoside-kinase-related kinases is indispensable for mTOR function in vivo and in vitro. *Genes Cell* 5: 765-775, 2000.

Tanida I, Ueno T and Komimani E: LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2503-2518, 2004.

Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, Criollo A, Morselli E, Zhu C and Kroemer G: Regulation of autophagy by cytoplasmic p53; *Nat Cell Biol* 10: 676-687, 2008.

Tasdemir E, Chiara Mauri M, Morselli E, Criollo A, D'Amelio M, and Kroemer G: A dual role of p53 in the control of autophagy. *Autophagy* 4: 810-814, 2008.

Thomas F and Chatelut F: Les derives du platine. *Oncologie* 9 : 741-745, 2007.

Thomas MB and Abbruzzese JL: Opportunities for targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 23: 8093-8108, 2005.

Tooze S and Yoshimori T: The origin of the autophagosomal membrane. *Nature Cell Biology* 12: 831-835, 2010.

Trivedi RN, Wang XH, Jelezcova E *et al.*: Human methyl purine DANN glycosylase and DNA polymerase beta expression collectively predicts sensitivity to témozolomide. *Mol Pharmacol* 74: 505-516, 2008.

Tulin A, Chinenov Y and Spradling A: Regulation of chromatin structure and gene activity by poly(ADP-ribose)polymerases. *Curr Top Dev Biol* 56: 55-83, 2003.

University of Miami: Designer therapy of pancreatic tumors. WO1008085611, 2008.

Vakifahmetoglu H, Olsson M and Zhivotovsky B: Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* 15: 1153-1162, 2008.

Virag L and Szabo C: The therapeutic potential of poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 54: 375-429, 2002.

Vousden B, Lane D and Levine AJ: Surfing the p53 network. *Nature* 408: 307-310, 2000.

Vousden KH and Ryan KM: p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer* 9: 691-700, 2009.

Wambersie A, Hendry J, Gueulette J, Gahbauer R, Potter R and Grégoire V: Radiobiological rationale and patient selection for high-LET radiation in cancer therapy. *Radiother Oncol* 73, suppl 2: S1-14, 2004.

Wang CW and Klionsky DJ: The molecular mechanism of autophagy. *Mol Med* 9: 65-76, 2003.

Wang M, Wu W, Wu W, Rosidi B, Zhang L, Wang H and Iliakis G: PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res* 34: 6170-6182, 2006.

Wang ZQ, Stingl L, Morrison C, Jantsch M, Los M, Schulze-Osthoff K and Wagner EF: PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev* 11: 2347-2358, 1997.

Wardman P: Chemical radiosensitizers for use in radiotherapy. *Clin Oncol* 19: 397-417, 2007.

Whittaker S, Marais R and Zhu AX: The role of signaling pathways in the development and treatment of Hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 29: 4989-5005, 2010.

Wiedenmann N, Valdecanas D, Hunter N *et al.*: 130-nm albumin-bound paclitaxel enhances tumor radiocurability and therapeutic gain. *Clin Cancer Res* 13: 1868-1874, 2007.

Wigg AJ, Palumbo K and Wigg DR: Radiotherapy for hepatocellular carcinoma: systemic review of radiobiological and modelling projections indicates reconsideration of its use. *J Gastroentero Hepatol* 25: 664-671, 2010.

Wilson GD, Bentzen SM and Harari PM: Biological basis for combining drugs with radiation. *Semin Radiat Oncol* 16: 2-9, 2006.

Yang Q and Guan KL: Expanding mTOR signalling. *Cess Research* 17: 666-681, 2007.

Yang YC, Chao KS and Lin CP: Oxaliplatin regulates DNA repair responding to ionizing radiation and enhances radiosensitivity of human cancer cells. *Int J Gynecol Cancer* 19: 782-786, 2009.

Yang YG, Cortes U, Patnaik S, Jasin M and Wang ZQ: Ablation of PARP-1 does not interfere with the repair of DNA double-strand breaks, but compromises the reactivation of stalled replication forks. *Oncogene* 23: 3872-3882, 2004.

Yasui H, Inanami O, Asanuma T *et al.*: Treatment combining X-irradiation and a ribonucleoside anticancer drug, TAS106, effectively suppresses the growth of tumor cells transplanted in mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 68: 218-228, 2007.

Yasui H, Ogura A, Asanuma T *et al.*: Inhibition of HIF-1 alpha by the anticancer drug TAS106 enhances X-ray-induced apoptosis in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 99: 1442-1452, 2008.

Yen Y, Lim DW, Chung V, Morgan RJ, Leong LA, Shibata SI, Wagman LD, Marx H, Chu PG, Longmate JA, Lenz HJ, Ramanathan RK, Belani CP and Gandara DR: Phase II study of oxaliplatin in patients with unresectable, metastatic, or recurrent hepatocellular cancer: a California Cancer Consortium Trial. *Am J Clin Oncol* 31: 317-322, 2008.

Yorimitsu T and Klionsky DJ: Eating the endoplasmic reticulum: quality control by autophagy. *Trends Cell Biol* 17: 279-285, 2007.

Zalckvar E, Berissi H, Eisenstein M and Kimchi A: Phosphorylation of Beclin-1 by DAP kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and Bcl-xl. *Autophagy* 5: 1-3, 2009.

Zamboni WC: Concept and clinical evaluation of carrier-mediated anticancer agents. *Oncologist* 13: 248-260, 2008.

Zois CE and Koukourakis MI: Radiation-induced autophagy in normal and cancer cells. *Autophagy* 5: 1-9, 2009.

Annexes

PUBLICATIONS

- **Altmeyer A.**, Ignat M., Denis J.M., Messaddeq N., Gueulette J., Mutter D., Bischoff P. "Cell death detection after high-LET irradiation in an orthotopic human hepatocellular carcinoma in vivo". In Vivo, 2010 (Article accepté pour publication)
- **Altmeyer A.**, Jung A., Ignat M., Benzina S., Denis J.M., Gueulette J., Noël G., Mutter D., Bischoff P. "*Pharmacological enhancement of autophagy induced in a Hepatocellular Carcinoma cell line by high-LET radiation*". Anticancer Research, 2010 Feb; 30 (2) : 303-10
- Ignat M., Aprahamian M., **Altmeyer A.**, Lindner V., Perretta S., Dallemagne B., Mutter D., Marescaux J. "*Feasibility and reliability of pancreatic cancer staging using fiberoptic confocal fluorescence microscopy in rat*". Gastroenterology, 2009 Nov; 137 (5) : 1584-92
- Bischoff P., **Altmeyer A.**, Dumont F. "*Radiosensitizing agents for the radiotherapy of cancer: II. Novel molecularly targeted approaches*". Expert Opinion On Therapeutics Patents, 2009 Jun; 19 (5) : 775-99
- Bischoff P., **Altmeyer A.**, Dumont F. "*Radiosensitizing agents for the radiotherapy of cancer: I. Advances in traditional and hypoxia targeted radiosensitizers*". Expert Opinion On Therapeutics Patents, 2009 May; 19 (5) : 643-62
- Benzina S., **Altmeyer A.**, Malek F., Dufour P., Denis J.M., Gueulette J., Bischoff P. "*High-LET radiation combined with oxaliplatin induce autophagy in U-87 glioblastoma cells*". Cancer Letters. 2008 Jun 8; 264 (1) : 63-70

COMMUNICATIONS

- **Altmeyer A.**, Jung A., Ignat M., Wilt M., Messaddeq N., Denis J.M., Gueulette J., Bischoff P. "Autophagic cell death induced in a human hepatocellular carcinoma cell line after high-LET irradiation". Second International Conference "Medical Radiations: Research and Applications", Marrakech, 7-9 avril 2010 (communication orale)
- **Altmeyer A.**, Jung A., Ramolu L., Ignat M., Denis J.M., Gueulette J., Noël G., Mutter D., Bischoff P. "*Morts cellulaires programmées induites par un traitement associant radiations à transfert linéique d'énergie (TLE) élevé et oxaliplatine dans un carcinoma hépatocellulaire*". 9^{ème} Colloque International de Radiobiologie Fondamentale et Appliquée, Annecy, 20-25 septembre 2009 (communication orale)

- **Altmeyer A.**, Jung A., Ignat M., Denis J.M., Gueulette J., Noël G., Mutter D., Bischoff P. “*Autophagy as the predominant type of programmed cell death induced by high-LET radiation combined with oxaliplatin in a human hepatocellular carcinoma cell line*”. American Association for Cancer Research 100th Annual Meeting 2009, Denver (CO, USA), 18-22 avril 2009 (poster)

- **Altmeyer A.**, Jung A., Gueulette J., Denis J.M., Ignat M., Noël G., Mutter D., Bischoff P. “*Cell death induced by high-LET radiation combined with oxaliplatin in two human cancer cell lines*”. 1^{er} Colloque Inter-Régional Grand-Est de Recherche Translationnelle en Oncologie OncoTrans 2009, Nancy, 19-20 mars 2009, (poster)

- **Altmeyer A.**, Benzina S., Ignat M., Denis J.M., Gueulette J., Noël G., Mutter D., Bischoff P. “*Radiosensibilisation par des sels de platine : l’oxaliplatine, combiné aux radiations ionisantes, induit la mort cellulaire par autophagie dans une lignée de carcinome hépatocellulaire*”. 2^{ème} Forum du Cancéropôle du Grand-Est, Vittel, 17 octobre 2008 (poster)

- **Altmeyer A.**, Benzina S., Ignat M., Leyva L., Denis J.M., Gueulette J., Dufour P., Mutter D., Bischoff P. “*Induction of different types of cell death in radioresistant tumor cell lines by treatments combining high linear energy transfer (LET) radiation and oxaliplatin*”. American Association for Cancer Research 99th Annual Meeting 2008, San Diego (CA, USA), 12-16 avril 2008 (poster)

- Ignat M., Perretta S., **Altmeyer A.**, Hajri A., Sereno S., Mutter D., Dallemagne B., Marescaux J., Aprahamian M. “*Détection in vivo par microscopie confocale à fibres optiques de métastases ganglionnaires d’un adénocarcinome pancréatique sur un modèle de tumeur orthotopique chez le rat*”. XXII^{ème} Réunion Annuelle du Club Français du Pancréas, Lyon, 27-28 septembre 2007 (communication orale)

- Ignat M., **Altmeyer A.**, Benzina S., Denis J.M., Gueulette J., Mendoza L., Perretta S., Mutter D., Dallemagne B., Marescaux J., Bischoff P. “*Evaluation in vivo par FCFM (Fibered Confocal Fluorescence Microscopy) de l’efficacité de radiations ionisantes à transfert linéique d’énergie (TLE) élevé sur un modèle orthotopique de carcinome hépatocellulaire chez la souris nude*”. XXVII^{ème} Forum Eurocancer, Paris, 26-28 juin 2007. Publication de l’abstract dans : Bulletin du Cancer, juin 2007, 94 (6) : 597 (poster et communication orale)

Expert Opinion

1. Introduction
2. Traditional radiosensitisers
3. Targeting tumour hypoxia
4. Expert opinion

informa
healthcare

Radiosensitising agents for the radiotherapy of cancer: advances in traditional and hypoxia targeted radiosensitisers

Pierre Bischoff[†], Anais Altmeyer & Francis Dumont

Université de Strasbourg, Centre Régional de Lutte contre le Cancer Paul Strauss,

Laboratoire de Radiobiologie EA-3430, 3 rue de la porte de l'Hôpital, F-67065 Strasbourg, France

Background: Radiotherapy is utilised for the treatment of ~ 50% of patients with solid tumours, but its efficacy is limited by normal tissue toxicity and by the intrinsic or acquired radioresistance of many tumours. The combination of radiotherapy with chemotherapeutic agents that preferentially sensitise tumour cells to its cytotoxic effects has thus long been considered as a strategy to enhance cancer therapy. However, current chemoradiotherapy protocols remain highly unsatisfactory. Therefore, continuing efforts are being conducted to identify improved radiosensitising agents. **Objective:** To survey the patent literature and associated peer-reviewed publications of the past 4 years pertaining to the development of novel radiosensitising agents, with a focus on anticancer drugs traditionally used as radiosensitisers and on agents targeting radioresistant hypoxic tumour cells. **Methods:** Patents were searched with a set of relevant keywords using several search engines (ep.espacenet.com/, www.freepatentsonline.com/, patft.uspto.gov/). A Medline search on the same topics was performed in parallel. **Results/conclusion:** A total of 37 patents/applications were retrieved. Of these, 14 concern the use of conventional anticancer cytotoxic drugs for tumour radiosensitisation. The other patents mostly disclose novel hypoxic radiosensitisers, bioreductive drugs and inhibitors of hypoxia-inducible factor-1. Whether these advances will translate into clinically valuable radiosensitisers is, however, unclear.

Keywords: antimetabolites, bioreductive drugs, camptothecin, cancer, chemotherapy, hypoxia, hypoxia-inducible factor 1, ionising radiation, platinum complexes, radiosensitiser, radiotherapy, taxane

Expert Opin. Ther. Patents (2009) 19(5):643-662

1. Introduction

Radiotherapy (RT) is currently utilised in ~ 50% of patients with solid tumours at some stage of their treatment [1]. Often combined with surgery and/or chemotherapy, RT involves most commonly the use of low linear energy transfer ionising radiation (IR) such as X-rays and γ -rays whose cytotoxicity arises from their ability to produce DNA damage, particularly DNA double-strand breaks (DSBs), through formation of free radicals within the cells [1]. IR can exert anticancer effects owing to the high proliferation rate of neoplastic cells and their diminished ability to repair sub-lethal DNA damage. Moreover, unlike cytotoxic anticancer drugs, IR can be administered locally to a solid tumour, where it penetrates tissue and cellular boundaries without any of the usual pharmacokinetic barriers [1].

Despite the therapeutic attributes of RT, its efficacy is nonetheless limited by a number of drawbacks and side effects. Standard RT generally involves administering the maximal tolerable dose of IR, which is often associated with substantial morbidity

owing to normal tissue toxicity. Although refinements in IR fractionation schemes have optimised dose delivery and recent technical developments, including intensity-modulated and image-guided RT, have increased the precision of irradiation to the target tumour, there are still limitations in doses and effectiveness that lead to treatment failure [1]. This is due to the fact that many tumours exhibit intrinsic or acquired resistance to IR as part of the carcinogenic process or during the course of therapy [2]. Therefore, the combination of RT with chemotherapeutic agents that may overcome radioresistance and sensitise tumour cells to the cytotoxic effects of IR has long been utilised as an attempt to enhance tumour control and minimise the radiation toxicity toward healthy tissues through dose reduction [2]. Although combination chemoradiation protocols have ameliorated treatment outcomes in several human malignancies, they are still largely unsatisfactory, as the existing agents frequently cause a high rate of unacceptable treatment-related morbidity [2,3]. Therefore, a continuing endeavour in experimental and translational oncology research has been to identify more effective tumour radiosensitising agents, as recently discussed [4,5].

Here, we review the patent literature and associated peer-reviewed publications of the past 4 years that pertain to the development of such radiosensitising agents. Owing to space constraints and given the broad diversity of the approaches being considered, this article focuses on advances in the design of anticancer drugs traditionally used as radiosensitisers and of agents targeting radioresistant hypoxic tumour cells (Figure 1). A subsequent article will cover the emerging approaches of tumour radiosensitisation targeting molecular components of DNA repair, survival signalling and apoptosis resistance pathways as well as angiogenesis and other radioresistance mechanisms.

2. Traditional radiosensitisers

A number of cytotoxic anticancer drugs with various modes of action have found utility in chemoradiation protocols currently used in clinical practice (Table 1) [2]. However, owing to their inherent cytotoxicity, these drugs can increase normal tissue damage and IR-related side effects when combined with RT. Efforts directed at improving their pharmaceutical properties in their use as anticancer agents have, nonetheless, benefited their usefulness as radiosensitisers.

2.1 Antimetabolites

Antimetabolites are among the most potent radiosensitisers now available. They all induce tumour cell death primarily by generating intracellular metabolites that interfere with nucleic acid synthesis pathways and DNA replication, but may differ in the mechanisms by which they enhance the cytotoxicity of IR (Table 1) [6].

The halogenated pyrimidine, 5-fluorouracil (5-FU) (1) has been widely used as adjunct for RT over the past 40 years. Although the direct cytotoxicity of 5-FU is due to blockade

of DNA synthesis through thymidylate synthase inhibition, its radiosensitising effect at sub-lethal concentrations reflects alterations of both DNA repair and cell cycle checkpoints [6]. One drawback of 5-FU is its requirement for continuous intravenous infusion during the course of fractionated radiation to achieve optimal radiosensitisation [6]. An orally bioavailable prodrug of 5-FU, capecitabine (2), may render such a protracted radiosensitising modality easier and safer [7]. Another orally active 5-FU prodrug is tegafur (3), which has been initially used together with uracil to inhibit its degradation by dihydropyrimidine dehydrogenase. A mixed formulation of tegafur, called S-1, containing the dihydropyrimidine dehydrogenase inhibitor, 5-chloro-2,4 dihydroxypyridine (4), and oxonic acid (5), a gastrointestinal side effect mitigator, was more recently designed by Taiho Pharmaceuticals. Numerous laboratory studies demonstrated the anticancer activity of S-1, and showed its superior efficacy compared to capecitabine [8]. Moreover, evidence that S-1 exerts radiosensitising effects was obtained in a variety of experimental systems, including 5-FU resistant human colon cancer cells [9]. Accordingly, Taiho Pharmaceuticals claimed the potential utility of S-1 for enhancing the response to RT in the treatment of cancer [10]. Studies presented in another patent by Taiho Pharmaceuticals further indicated that 5-chloro-2,4 dihydroxypyridine alone exerts a radiosensitising effect *in vivo*, but the mechanism for this unexpected activity was not investigated [11]. The S-1 drug cocktail is now used in conjunction with RT in Japan [12], and is undergoing Phase III studies in the US and Europe [13].

The radiosensitising activity of halogenated thymidine analogues such as 5-iododeoxyuridine (IUDR) (6) and 5-bromodeoxyuridine, which is thought to involve increased formation of DSBs and an inhibition of their repair, has also long been recognised [6]. However, the clinical use of these agents has been severely limited by their high toxicity to normal tissue [6]. A possibly less toxic orally active prodrug of IUDR, 5-iodo-2-pyrimidinone-2'-deoxyribose (7), which may be preferentially converted to IUDR in tumour compared with normal tissue, is awaiting clinical evaluation as a radiosensitiser [14]. An alternative method to increase the tumour specificity of this mode of radiosensitisation has been proposed in a recent patent application by the University of Miami [15]. It is based on the finding that certain tumours, especially pancreatic cancer, express elevated intracellular levels of cytidine deaminase making them capable of metabolising nontoxic 5-iodo-deoxycytidine (8) into IUDR. Data show that 5-iodo-deoxycytidine and other deoxycytidine analogues could radiosensitise a prostate tumour cell line *in vitro* and that this effect was abrogated by a cytidine deaminase inhibitor [15]. Such deoxycytidine compounds may thus allow for selective tumour radiosensitisation, but further *in vivo* studies are clearly needed to assess the therapeutic potential of this method.

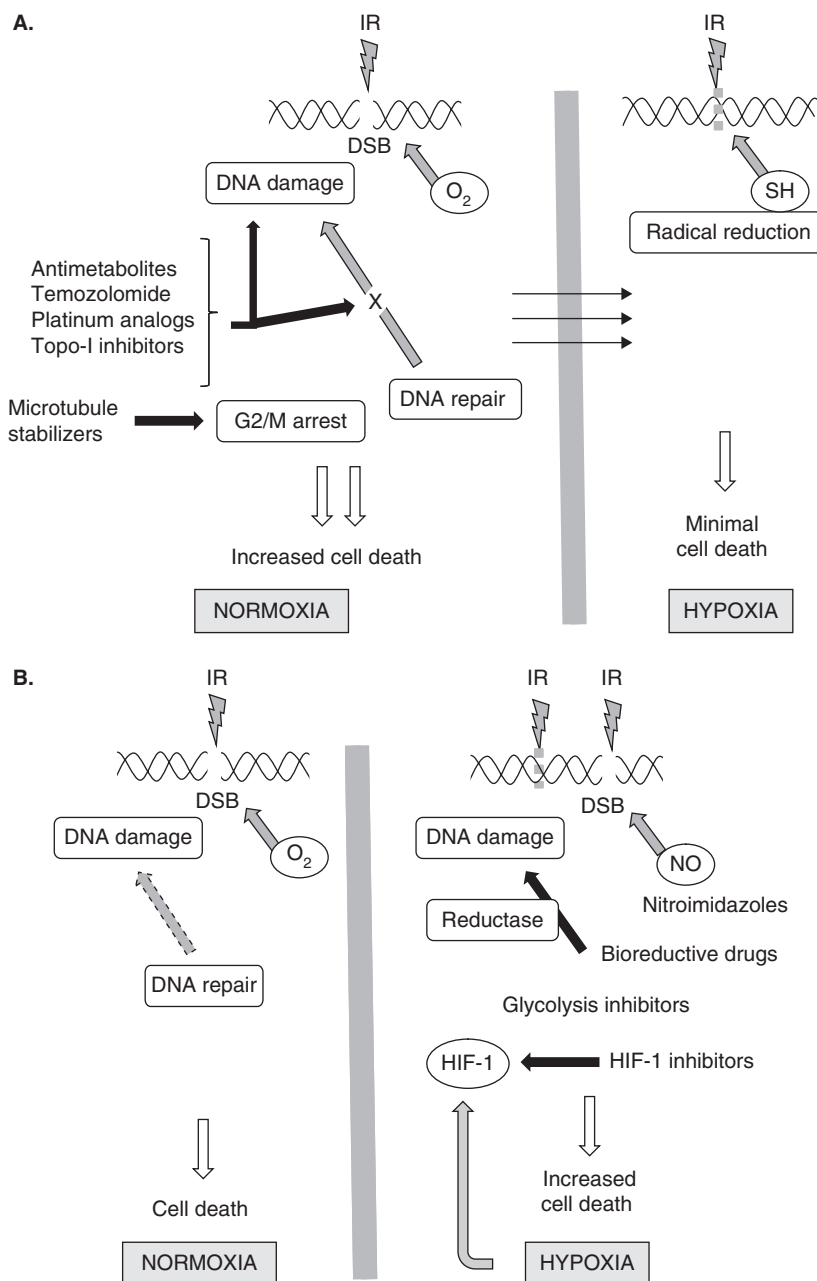


Figure 1. Simplified model of the cytotoxic action of IR and radiosensitising agents in normoxic and hypoxic tumour cells. The main effect of IR is to induce DNA damage, particularly DSB, through production of free radicals on the DNA. These radicals enter into a competition for oxidation, primarily by oxygen, which renders the damage permanent, or reduction, mainly by -SH containing molecules, which restores DNA to its original form [48]. IR-induced DNA damage is, therefore, more severe under normoxia than under hypoxia. Panel **A** shows that in normoxic tumour cells several of the conventional anticancer agents amplify IR-induced DNA damage and interfere with the DNA repair process, or cause a blockade of cell cycle progression in radiosensitive G2/M phase, thereby, leading to increased cell death. Other modes of action (not shown) include the production of DNA mismatches and enhancement of IR-induced apoptosis (Table 1). These anticancer agents may also affect hypoxic tumour cells, but because IR has little DNA damaging effect in these cells, the resulting cytotoxicity is minimal. Panel **B** shows that IR-induced DNA damage can be stabilised in hypoxic tumour cells by reduced nitro groups from radiosensitisers such as nitroimidazoles. Hypoxic cells can be selectively killed by bioreductive drugs that are activated by intracellular reductases to form DNA damaging species, as well as by inhibitors of glycolysis, owing to their high reliance on this process for ATP generation. Agents targeting the HIF-1 transcription factor can also compromise the survival of hypoxic cells. Increased cell death of radioresistant hypoxic tumour cells resulting from exposure to any of these agents will complement the cytotoxic effect of IR toward normoxic tumour cells, leading to overall enhanced antitumour efficacy of RT.

DSB: Double-strand break; HIF-1: Hypoxia-inducible factor 1; IR: Ionising radiation; NO: Nitric oxide; RT: Radiotherapy.

Table 1. Mechanisms of cytotoxicity and radiosensitisation of anticancer drugs used as radiosensitisers.

Compound	Cytotoxicity	Radiosensitisation
5-Fluorouracil	Inhibition of thymidylate synthase, incorporation into DNA and inhibition of RNA maturation [6,16]	Inhibition of the repair of IR-induced DSBs and impairment of cell cycle checkpoints [6]
Iododeoxyurine Bromodeoxyuridine	Inhibition of ribonucleotide reductase and incorporation into DNA [6]	Augmentation of IR-induced DSBs and inhibition of their repair [6]
TAS-106	Inhibition of thymidylate synthase and RNA synthesis [16]	Abrogation of G2/M checkpoint, enhancement of IR-induced tumour cell apoptosis associated with an inhibition of the expression of HIF-1 α and of the antiapoptotic protein, survivin [17,18]
Gemcitabine	Depletion of deoxynucleoside triphosphates resulting in DNA polymerase and ribonucleotide reductase inhibition [6]	Induction of nucleotide misincorporation during DNA replication that augments cell death following IR. Enhanced by mismatch repair deficiency [21]
Clofarabine	Inhibition of DNA polymerases and ribonucleotide reductase and incorporation into DNA [25]	Inhibition of the repair of IR-induced DSBs at low doses and induction of DSBs at high doses [25]
3-AP (Triapine)	Inhibition of ribonucleotide reductase resulting in blockade of DNA synthesis and repair [6,26]	Inhibition of the repair of IR-induced DSBs [26]
Temozolomide	Methylation of guanine at O6 position resulting in DNA mismatch pairing, DNA strand breakage and cell death [20]	Inhibition of the repair of IR-induced DSBs leading to increased mitotic catastrophe [28]
Platinum analogues	Covalent binding to purine DNA bases causing interstrand and intrastrand crosslink [32]	Inhibition of the repair of IR-induced DNA damage, induction of apoptosis and formation of IR-induced toxic platinum intermediates [32,33]
Camptothecin analogues	Inhibition of topoisomerase I, resulting in irreversible DNA DSBs [36]	Worsening of IR-induced DNA lesions and inhibition of their repair [36,37]
Taxanes, epothilones	Stabilisation of microtubules through tubulin binding resulting in cell cycle arrest in G2-M and cell death [2,44]	Synchronisation of tumour cells in G2-M at a point of maximum radiosensitivity [2]

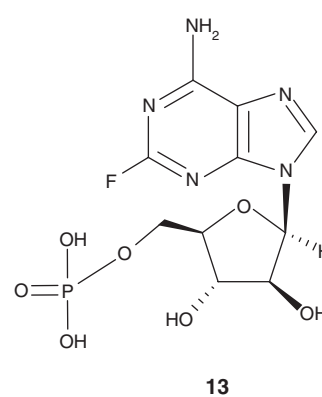
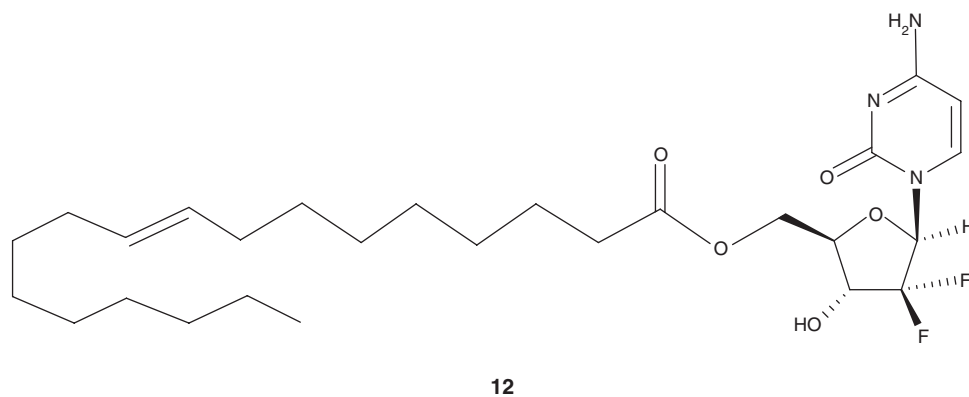
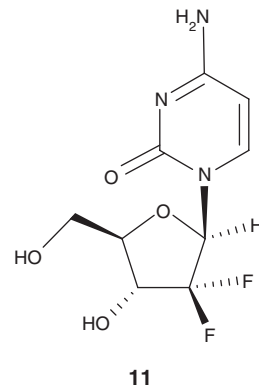
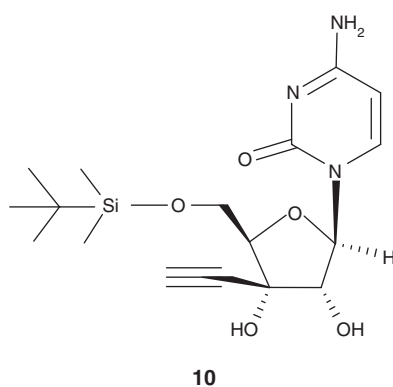
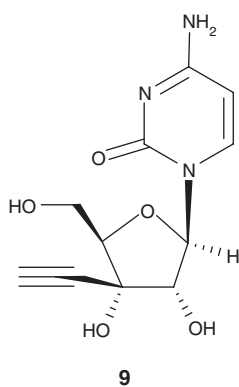
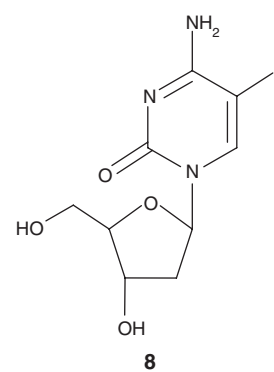
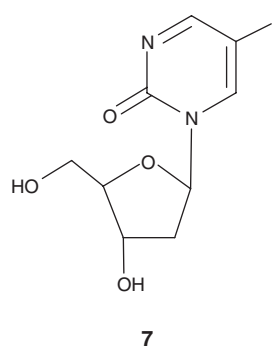
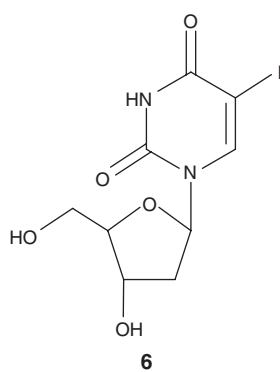
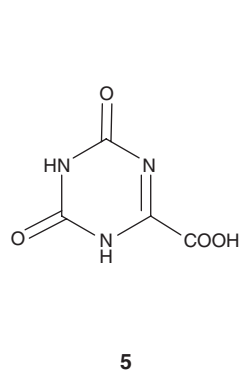
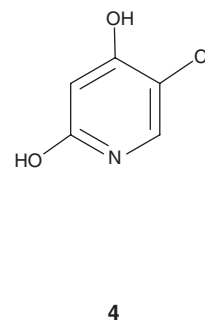
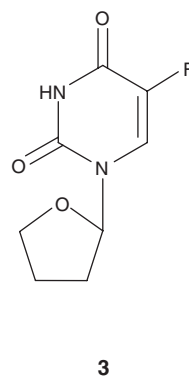
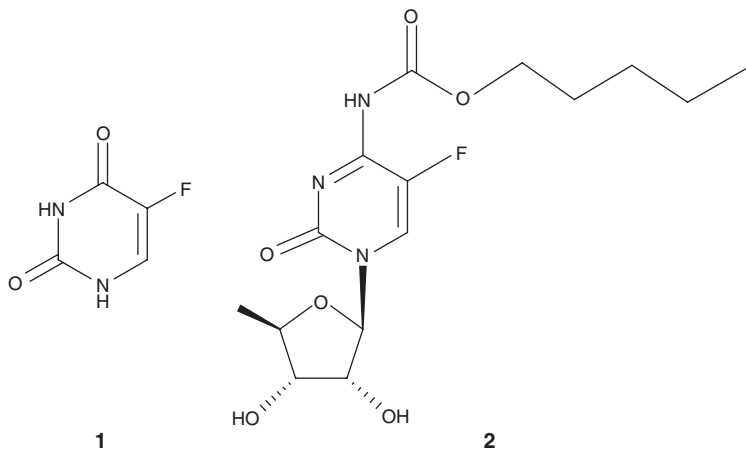
DSB: Double-strand break; HIF-1 α : Hypoxia-inducible factor 1 α ; IR: Ionising radiation.

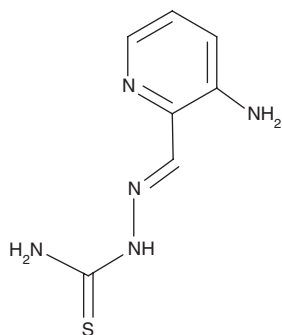
Another cytidine analogue, TAS-106 (3'-C-ethynylcytidine) (9), which inhibits thymidylate synthase and RNA synthesis [16], was recently shown to reinforce the anticancer effect of IR by increasing tumour cell apoptosis through inhibition of the antiapoptotic protein, survivin [17,18]. TAS-106 is undergoing Phase I/II clinical trials in cancer patients [13]. A recent patent application by Taiho Pharmaceutical disclosed orally active TAS-106 derivatives, such as compound (10), which may prove advantageous as anticancer and radiosensitiser agents [19].

Gemcitabine (11), a fluorinated analogue of cytarabine with broad spectrum activity against solid tumours, is one of the most widely used anticancer drugs and is also utilised as a radiosensitiser in clinical practice [20]. It hinders DNA synthesis by inhibiting DNA polymerase and ribonucleotide reductase, and can radiosensitise tumour cells at minimally cytotoxic concentrations by causing errors in DNA replication [21]. However, the efficacy of gemcitabine is limited by the need of membrane nucleoside transporters for its influx into cancer cells. Derivatives that can enter cells independently of these

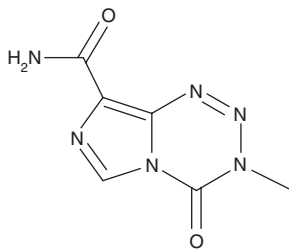
transporters have thus been generated [22], one of the most advanced of which being the elaidic acid ester, CP-4126 (12), developed by Clavis Pharmaceuticals [23]. CP-4126 recently entered a Phase I clinical trial [13], and further evaluation of its potential as a radiosensitiser seems worthwhile. The novel purine analogue, clofarabine (13), an inhibitor of DNA polymerases and ribonucleotide reductase now approved for the treatment of leukaemia, was recently claimed as a radiosensitiser for the treatment of solid tumours in a patent application by the Southern Research Institute [24]. Evidence was presented that clofarabine sustains IR-induced DNA damage in tumour cell lines and synergizes with fractionated RT in inhibiting the growth of human cancer xenografts in mice [24,25].

Another well recognised radiosensitiser is hydroxyurea, known to affect nucleotide metabolism and to impede the repair of IR-induced DSBs by inhibiting ribonucleotide reductase [6]. Consistently, the potent ribonucleotide reductase inhibitor, 3-AP (triapine[®], Vion Pharmaceuticals,

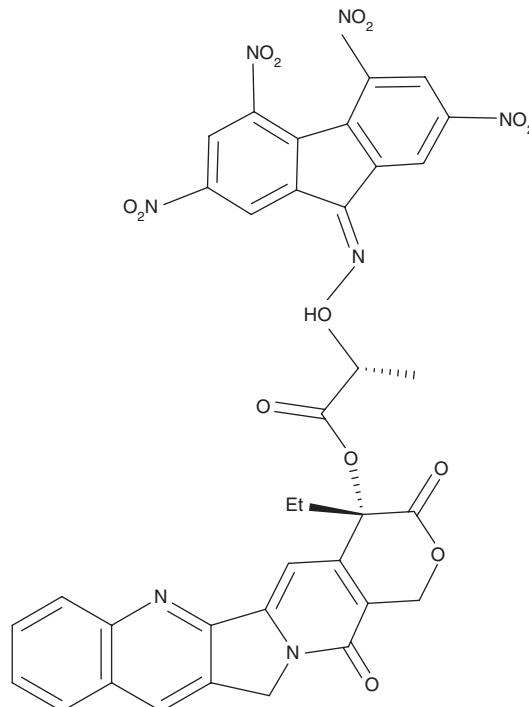




14



15



16

Inc., New Haven, CT, USA) (14), was recently demonstrated to act as an effective radiosensitiser in preclinical *in vitro* and *in vivo* models when delivered before or immediately after irradiation [26]. By contrast, the radiosensitivity of normal human fibroblasts was only enhanced when 3-AP was added before irradiation [26]. The use of 3-AP for potentiating the antitumour effect of RT in cancer treatment was claimed in a patent by the US Government [27]. This compound is now being evaluated in combination with RT in Phase I trials in pancreatic or gynecologic cancer [13].

2.2 Alkylating agent: temozolomide

Temozolomide (15) is the orally active prodrug of an alkylating anticancer agent that causes DNA damage by methylation of the O-6-position of guanine, thereby, inducing mismatch pairing during DNA replication followed by DNA strand breakage and eventually cell death [28]. It acts as a potent radiosensitiser by inhibiting the repair of IR-induced DSBs, leading to increased mitotic catastrophe [28]. Because temozolomide has good blood–brain barrier penetration, it has proven useful in conjunction with RT for the treatment of glioblastoma [29]. However, resistance to temozolomide often occurs in individual tumours, owing to increased levels of the DNA repair enzyme, O6-methylguanine-DNA methyltransferase, or to mismatch repair deficiency. Expression of DNA polymerase β , which is involved in base excision repair, has also been shown to correlate with temozolomide resistance [30]. A patent by Pittsburgh University, thus, claimed that blocking the

activity of this enzyme may enhance the therapeutic efficacy of temozolomide [31].

2.3 DNA-damaging platinum drugs

Platinum complexes, such as cisplatin, carboplatin and oxaliplatin, are commonly used in current chemoradiotherapy protocols [2,32]. When administered before or after IR, these compounds may enhance cell killing through several mechanisms, including the formation of DNA adducts that prevent the repair of IR-induced DNA damage and lead to cell-cycle arrest and apoptotic cell death. In addition, IR may augment cellular platinum uptake and, through the induction of free radicals, enhance the generation of toxic platinum intermediates within cells [2,32,33]. Because platinum complexes act as radiosensitisers in both well-oxygenated and hypoxic cells [2], they may serve to reinforce the radiation sensitising ability of a nitroimidazole hypoxic cell radiosensitiser, as claimed in a Japanese patent by Pola Chemical Industry [34].

The toxic side effects, limited activity in a range of tumours and poor tumour selectivity of platinum compounds used at present have motivated efforts to develop newer analogues [32,35]. Although this may lead to improved radiosensitising platinum agents, no recent patents have been published on the subject.

2.4 DNA topoisomerase I inhibitors: camptothecin analogues

The camptothecin derivatives, topotecan and irinotecan, belong to another class of clinically important anticancer drugs currently evaluated in chemoradiation protocols [4,13].

They target topoisomerase I, an enzyme that creates a transient DNA single-strand break to allow DNA relaxation during replication. By blocking the rejoining step of the breakage reunion reaction of the enzyme, camptothecins cause irreversible DSBs, which results in apoptotic cell death [36]. The radiosensitising activity of these drugs, demonstrated by a number of preclinical and early clinical studies, is thought to stem from their ability to worsen IR-induced DNA lesions and to sabotage their repair [36,37].

A patent claimed the therapeutic utility of coadministering irinotecan with the S-1 formulation of tegafur to enhance the efficacy of preoperative RT without causing major side effects for the treatment of rectal cancer [38]. This was supported by data from a pilot clinical trial [38]. Furthermore, novel camptothecin derivatives bearing electron-affinic groups were described as potent radiosensitisers for cancer therapy in a patent by the California Pacific Medical Center [39]. An exemplary compound (16) was shown to be much less toxic than camptothecin or topotecan in mice. It enhanced the antiproliferative effect of IR in human prostate and breast cancer cells *in vitro* and markedly radiosensitised mouse mammary adenocarcinoma tumours when administered at a non-toxic dose 24 h before IR in mice [39]. It is worth noting that, although the electron-affinic moiety is expected to endow such compounds with radiosensitising properties towards hypoxic cells, this was not investigated. Further studies are also needed to directly compare the radiosensitising potential of these compounds with that of topotecan or irinotecan.

2.5 Microtubule-stabilising agents

The taxane drugs, paclitaxel and docetaxel are antineoplastic agents with well-documented radiosensitising properties [2]. They form high-affinity bonds with tubulin, promoting accelerated assembly of excessively stable microtubules, which causes cell cycle arrest in G2-M followed by eventual cell death. By synchronising tumour cells in G2-M, at a point of maximum radiosensitivity [40], taxanes can augment the lethal effects of IR even in p53-mutated cells [2].

Florida State University claimed that the radiosensitising activity of taxanes could be improved by their conjugation with electron-affinic functional groups to target hypoxic cells [41]. By way of example, the metronidazole (17) and 4-nitrophenyl (18) derivatives of taxotere were shown to radiosensitise tumour cells to a greater extent and with less *in vivo* toxicity than taxol in mice [41], but no further study of these compounds has been published.

One of the drawbacks of taxanes is their poor aqueous solubility, which requires their formulation in chemical solvents causing biological and pharmacologic side effects. To overcome this problem, a novel, solvent-free 130 nm nanoparticle albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane) was developed by American Bioscience (now Abraxis Bioscience, Los Angeles, CA, USA). The use of abraxane in combination with RT was claimed in a patent application assigned to this

company [42]. Preclinical evidence for the radiosensitising ability of abraxane was obtained in mice bearing syngeneic ovarian or mammary carcinomas [43].

Inherent toxicities and the development of tumour multidrug resistance linked to P-glycoprotein expression also restrict the therapeutic utility of taxanes. The search for novel microtubule-stabilising agents devoid of such limitations led to the discovery of epothilones, which exhibit promising antitumour activity in a variety of taxane-sensitive and -refractory tumours [44]. One of the most potent of these agents, epothilone B (EPO906) (19), was shown to act as radiosensitiser in a p53-mutated human colon adenocarcinoma cell line that overexpresses P-glycoprotein and is relatively resistant to paclitaxel [45]. Novartis AG thus claimed that combining EPO906 or another epothilone derivative with IR may prove advantageous for the treatment of solid tumour diseases [46]. A Phase I clinical trial of EPO906 in conjunction with RT has been initiated in cancer patients [13].

3. Targeting tumour hypoxia

As a result of their chaotic growth and inadequate vascularisation, human solid tumours frequently contain oxygen-deficient hypoxic areas [47-49]. Viable cells in these areas are two to threefold more resistant to killing by IR than normoxic cells, largely due to reduced generation of DNA-damaging oxygen radicals [47-49]. Overall, the poor oxygenation of solid tumours represents a major cause of treatment failure in RT, and overcoming hypoxia-mediated radioresistance has thus long been considered as an approach for enhancing cancer therapy [47-49].

During the past decades, several strategies have been explored to tackle the problem of radioresistance linked to tumour hypoxia [4,48-50]. One strategy encompasses methods aimed at improving tumour oxygenation during RT, including hyperbaric oxygen treatment; the administration of nicotinamide combined with carbogen breathing [4,50]; the administration of efaproxiral (20), a synthetic allosteric modifier of haemoglobin that enhances its oxygen unloading to tissue, as claimed by Allos Therapeutics [51]; or the administration of an endothelin type B receptor agonist to selectively increase the tumour blood supply, as claimed by Spectrum Pharmaceuticals [52]. A second strategy comprises a number of approaches that directly target hypoxic tumour cells, and involve pharmacologic agents acting as hypoxic radiosensitisers, bioreductive cytotoxins or glycolysis-directed inhibitors [4,47,48,50,53]. A third strategy targets hypoxia-inducible factor (HIF)-1, a transcription factor that promotes the survival of hypoxic tumour cells [54-57]. Recent developments and patents related to these last two types of strategies are examined below.

3.1 Hypoxic cell radiosensitisers

These compounds consist of electron-affinic nitroaromatic structures that undergo bioreductive metabolism within hypoxic cells. The reduced nitro groups thus function as

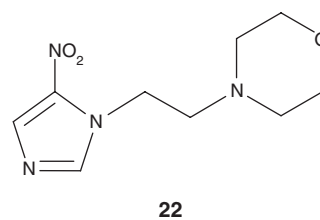
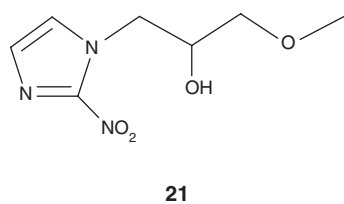
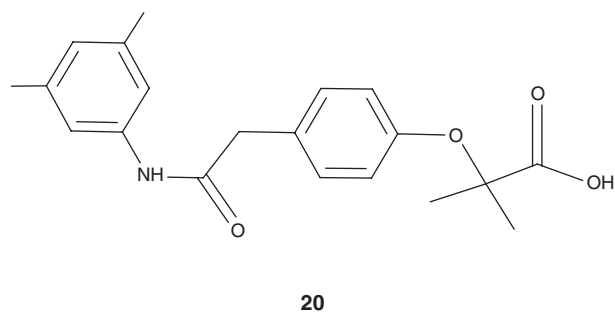
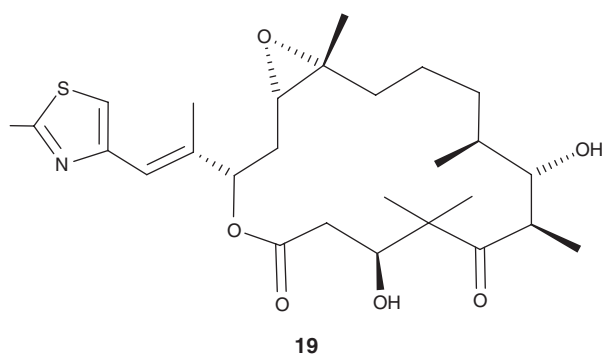
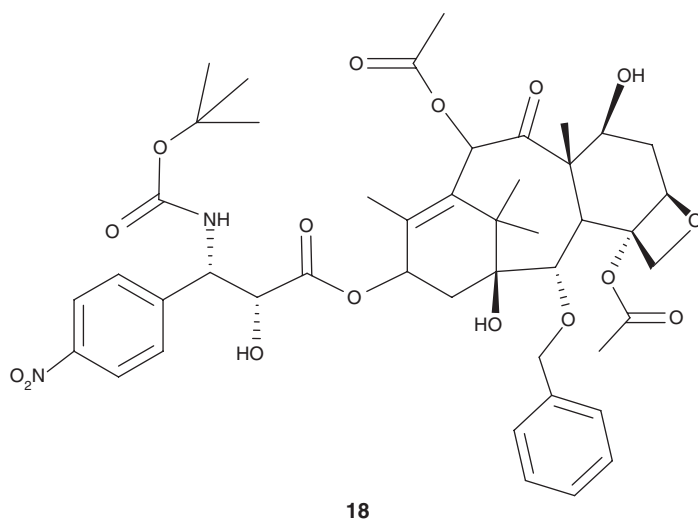
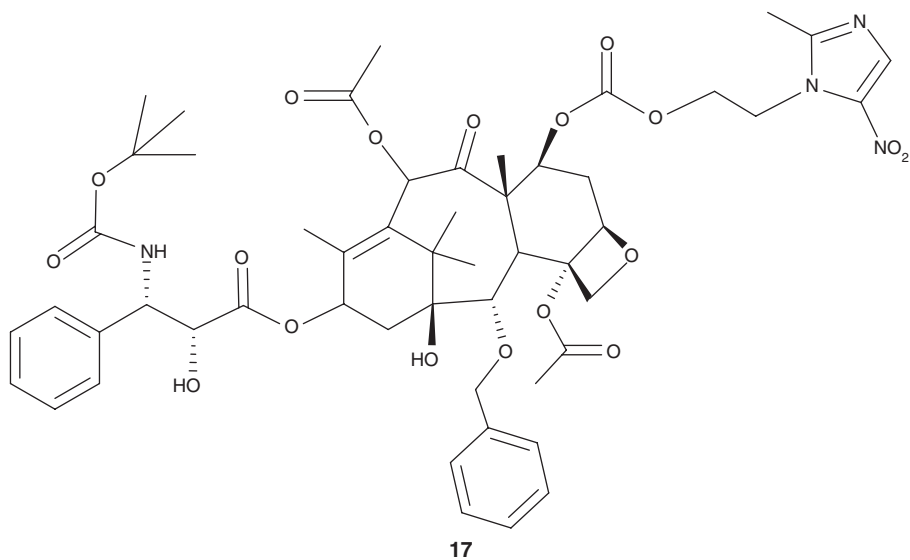


Table 2. Proposed strategies for improving the therapeutic ratio of hypoxic radiosensitisers.

Strategy	Compounds	Comments
Reduced hydrophobicity	Dorinazole [34,63,64]	Clinical trials of dorinazole in combination with RT revealed an encouraging activity with minimal neurotoxicity [61,62]
Enhanced affinity for nucleoside transporters	Riboside derivatives of 2-nitroimidazole with β -nucleoside configuration [65]	Improved radiosensitising activity was suggested by <i>in vitro</i> studies [66], but this needs to be confirmed <i>in vivo</i>
Enhanced affinity for glucose transporters	Acetylated glucose derivative of 2-nitroimidazole, TX-2224 [67]	Improved radiosensitising activity was suggested by <i>in vitro</i> studies but this needs to be confirmed by <i>in vivo</i> studies
Enhanced affinity for amino-acid transporters	Nitrohistidine [68]	Enhanced radiosensitising activity compared with misonidazole was shown <i>in vivo</i> but there has been no follow-up study

RT: Radiotherapy.

oxygen mimics that react with IR-induced DNA free radicals, and thereby stabilise the DNA lesions under hypoxia [4,47,50]. Among this class of compounds, 2-nitroimidazole derivatives, such as misonidazole (21), were found to be effective tumour radiosensitisers in preclinical studies [4,47,50]. However, dose-limiting side effects, especially neurotoxicity, prevented their widespread use as clinical radiosensitisers [4,47,50], although the 5-nitroimidazole, nimorazole (22), is now used with some success for RT of head and neck cancers in Denmark [50]. Efforts have thus been directed towards improving the therapeutic ratio of such molecules [4,47,58,59], the most recent of which are mentioned below (Table 2).

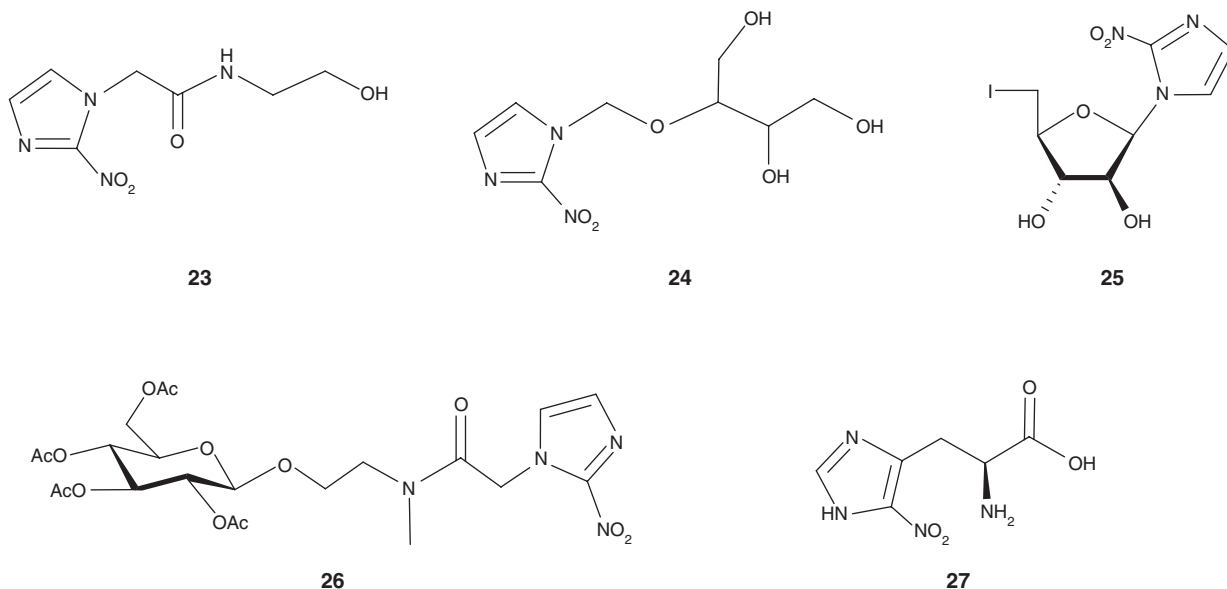
Attempts were made to decrease the hydrophobicity of nitroimidazole analogues and thereby their propensity to accumulate within nervous tissue by modifying their side chain. Initial studies led to the identification of etanidazole (23), which proved less neurotoxic than misonidazole in mice but failed to show a significant therapeutic benefit as adjunct to RT in clinical trials [47]. More recently, scientists at Pola Chemical Industry synthesised doranidazole (24), a compound structurally related to misonidazole but highly water-soluble. Preclinical studies demonstrated that doranidazole enhances the local control of tumour growth when injected at a non-toxic dose before single or fractionated irradiation *in vivo* [60]. A Phase I/II trial of doranidazole added to thoracic RT in patients with locally advanced NSCLC showed only minimal neurotoxicity [61]. Moreover, long-term follow-up of a placebo-controlled Phase III study in patients with unresectable pancreatic cancer revealed that doranidazole given as a systemic intravenous infusion 10–40 min before intraoperative RT significantly ameliorated the 3-year survival rate as compared to placebo and RT treatment [62]. Based on these encouraging data, Pola Chemical Industry issued several Japanese patents claiming the utility of doranidazole as a hypoxic radiosensitiser to enhance the efficacy of RT against radioresistant cancers [34,63,64].

Riboside derivatives of nitroimidazole with unaltered reduction potential and hydrophobicity but with a β -nucleoside configuration so as to facilitate their entry into hypoxic cells through nucleoside transporters were described in a patent by the University of Alberta [65]. Evidence was presented that 1- β -D-(5-deoxy-5-iodoarabinofuranosyl)-2-nitroimidazole (25) behaves as a superior radiosensitiser of hypoxic colorectal carcinoma cells in a clonogenic survival assay *in vitro* [66].

The elevated membrane transporter-mediated uptake of glucose, known to be associated with enhanced glycolysis in hypoxic tumour cells [56], may offer another approach to boost the affinity of nitroimidazoles for tumoural tissue independently of hydrophobicity. To that aim, sugar-hybrid 2-nitroimidazole derivatives were synthesised and characterised, leading to the identification of TX-2224 (26), which contains an acetylated glucose moiety, as a potent radiosensitiser [67]. When tested using a colony formation assay in mammary sarcoma cells under hypoxic conditions, TX-2224 showed a higher radiosensitising activity than misonidazole, although the two compounds displayed similar hydrophobicity [67].

Nitrohistidine analogues that structurally resemble nitroimidazoles and that may concentrate in tumour cells through uptake by the amino-acid transport system were claimed to be useful as radiosensitisers in a patent by Matthews [68]. In support of this claim, 5-nitrohistidine (27) was shown to enhance the killing effect of IR towards hypoxic cells *in vitro*. A tumour growth retardation assay in mice implanted with lung carcinoma cells further indicated that 5-nitrohistidine is a more potent radiosensitiser than misonidazole *in vivo* [68]. However, these observations have not been followed up by published studies in a peer-reviewed journal.

Nitric oxide (NO) has also gained interest as a potential radiosensitiser of hypoxic tumour cells as it is highly reactive towards other free radicals and enhances the yield of DSBs with greater efficiency than oxygen in cells exposed to low IR doses [69,70]. Accordingly, a patent by Duke University



claimed an original method of NO delivery *in vivo* for enhancing cancer RT [71]. This method involves the inhalation of a gas mixture comprising 100 ppm of ethyl nitrile in 100% oxygen, based on the knowledge that ethyl nitrile reacts with fully-oxygenated haemoglobin within red blood cells, leading to the formation of S-nitrosylated haemoglobin, a transducer of NO biological activity [72]. Data show that the growth of irradiated tumours was markedly delayed in rats breathing the aforementioned mixture as compared to rats breathing air or oxygen alone [71]. Additional methods of NO delivery for tumour radiosensitisation have been suggested, which take advantage of local NO production by inducible NO synthase [70,73]. Whether such protocols might be implemented in clinical settings remains, however, unclear. Furthermore, as will be noted below, there is evidence that NO may upregulate HIF-1 activity and thereby promote tumour radioresistance [74].

3.2 Bioreductive hypoxic cell cytotoxins

These drugs, which include several categories of compounds (Table 3), were specifically designed to require activation by intracellular reductases under low oxygen tension so as to form active species selectively toxic for hypoxic tumour cells [48,53]. By killing radioresistant hypoxic cells, bioreductive drugs are expected to complement the lethality of IR for oxygenated tumour cells and, thereby, to potentiate the antitumour effect of RT.

The most advanced bioreductive drug is tirapazamine (TPZ) (28), a heteroaromatic N-oxide that is activated by one-electron reduction under hypoxia to a cytotoxic radical causing DNA strand cleavage, base damage and DNA-protein crosslinks [75]. TPZ underwent Phase II/III clinical trials in combination with RT or cisplatin chemotherapy and showed some benefits when given with certain standard regimens [76]. However, it also demonstrated substantial toxicity at efficacious doses in some combinations, owing to its less than ideal

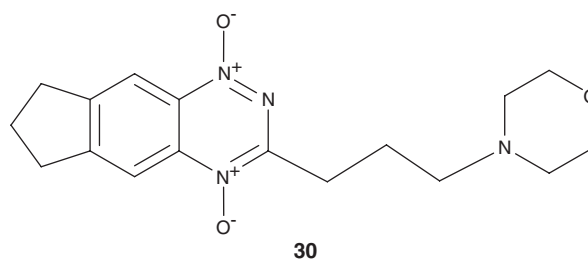
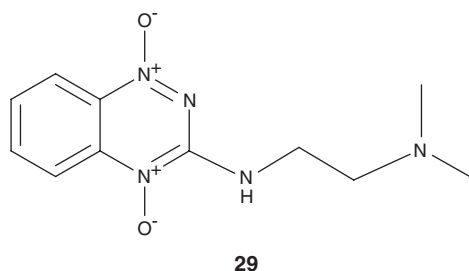
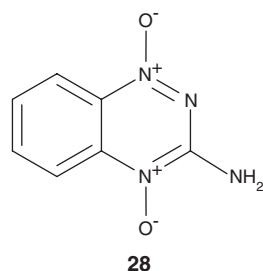
pharmacokinetic features and its effects on mildly hypoxic normal tissues [53,76]. Earlier attempts at generating TPZ analogues with improved therapeutic properties have been previously discussed [77]. More recent efforts focused on increasing the extravascular diffusion capacity of the compounds because this parameter is inadequate for TPZ and limits its ability to reach and kill hypoxic cells within tumours [78]. To that aim, Denny and colleagues at Auckland University synthesised a series of novel 1,2,4-benzotriazine 1,4-dioxide analogues of TPZ, and selected the compounds for optimal extravascular transport and hypoxic cytotoxicity in conjunction with irradiation in a human colon carcinoma xenograft model [79,80]. This led to the identification of a compound (29) being threefold more active than TPZ in the tumour xenograft model [79,80]. The same research group also claimed novel tricyclic triazine oxides and dioxides related to TPZ for use as hypoxia selective cytotoxins and radiosensitisers in cancer therapy [81,82]. Certain of these compounds were found to be cytotoxic against hypoxic tumour cells *in vivo* despite having lower reduction potentials than related tricyclic triazines previously reported in the literature. The lead compound (30) exhibited a greater ability than TPZ to potentiate the antitumour efficacy of fractionated IR in human colon and cervical carcinoma xenograft models, but the pharmacological basis for this enhanced activity was not determined [81].

Another type of hypoxia selective bioreductive drug is represented by nitrobenzindoles, which are prodrugs of corresponding aminobenzindoles that alkylate DNA in the minor groove at adenine N3 sites of AT-rich sequences [83]. A novel series of such compounds having enhanced hypoxic selectivity was claimed to be useful as tumour radiosensitisers in a patent application by Auckland Uniservices Ltd [84]. Selective toxicity to hypoxic tumour cells *in vitro* was demonstrated to be highest for compounds bearing a carboxamide or sulfonamide substituent in the 7-position. A

Table 3. Bioreductive drugs with potential as tumour radiosensitisers.

Prodrug	Active metabolite	Cytotoxic action	Comments
Benzotriazines (TPZ)	Oxidising benzotriazinyl radical	DNA strand breaks	Phase III clinical trials of TPZ as a radiosensitiser have been completed or are underway [13,53,76]. Analogues of TPZ with increased extravascular diffusion properties and radiosensitising potential have been identified but need to be further evaluated in preclinical models [79-81]
Nitrobenzindoles	Aminobenzindoles	DNA alkylation at AT-rich sequences in minor groove	Novel compounds need to be tested as radiosensitisers [84]
Dinitrobenzamide mustard (Phosphate ester PR-104)	Nitrogen mustard	DNA crosslinking	PR-104 is an effective tumour radiosensitiser that also exerts bystander cytotoxicity through metabolites diffusing from hypoxic tumour tissues [87]. Clinical evaluation has been initiated [13]
Phosphoraminate mustard (TH-302)	Dibromo isophosphoraminate mustard	DNA alkylation	TH-302 acts as a tumour radiosensitiser <i>in vivo</i> [90]. Clinical trials have been initiated [13]
Aliphatic N-oxide (AQ4N)	Stable and persistent mitoxantrone analogue	DNA intercalation, topoisomerase II inhibition	AQ4N acts as a tumour radiosensitiser when given before or after RT [53]. A Phase I/II trial of AQ4N in combination with RT has been initiated [13]
Indolequinone (EO9)	Semiquinone/hydroquinone radical anion	Interstrand DNA crosslinking	EO9 acts as a tumour radiosensitiser in a preclinical <i>in vivo</i> model [93], but its short plasma half-life and poor diffusion properties may restrict its use to the treatment of superficial bladder cancer [94]
Sulfonyl hydrazine (KS119)	Chloroethylating species	DNA crosslinking	A water-soluble phosphate ester derivative of KS119 has been generated but its radiosensitising activity remains to be tested [96]

RT: Radiotherapy.



water soluble phosphate derivative of one of them (31) was shown to be converted to its parent alcohol bioreductive compound with favourable pharmacokinetics in mice. However, the tumour radiosensitising activity of these compounds was not documented [84].

Dinitrobenzamide mustards that are selectively activated under severe hypoxia by tumour cell nitroreductases to form DNA-crosslinking mustard cytotoxins have been produced [77]. Because the first generation compounds of this class suffered from poor water solubility, newer phosphate ester analogues were developed, as described in a patent application by Auckland Uniservices [85]. Studies in mice showed that the lead compound, PR-104 (32), is well tolerated on i.v. administration and rapidly hydrolysed by systemic phosphatases to the alcohol, PR-104A (33), a metabolite that is sufficiently lipophilic to reach hypoxic target cells deep within tumours where it can be converted to the PR-104H cytotoxin (34) [86,87]. PR-104 demonstrated a marked radiation enhancing activity in tumour xenografts models, and this activity proved greater than that of TPZ, most likely due the bystander cytotoxicity of PR-104 metabolites diffusing from hypoxic tumour tissues [87]. PR-104 is under clinical development by Proacta, Inc. and has entered Phase I/II trials in cancer patients [13].

Scientists at Threshold Pharmaceuticals have generated a series of hypoxia-activated achiral phosphoramidate mustards based on the DNA-crosslinking toxin of ifosfamide [88]. The lead compound TH-302 (35), a 2-nitroimidazole triggered bromo analogue, was shown to be selectively converted within hypoxic tumour cells to its active form, the potent DNA alkylator, dibromo isophosphoramidate mustard. It proved active as a monotherapy and demonstrated heightened efficacy when given in combination with gemcitabine in a pancreatic cancer orthotopic xenograft model [89]. TH-302 was further shown to enhance the anticancer effect of IR when given for 5 consecutive days 30 min after each radiation dose in tumour xenograft-bearing mice [90]. Clinical trials of TH-302 in combination with various chemotherapeutic agents have been initiated in patients with advanced solid tumours [13].

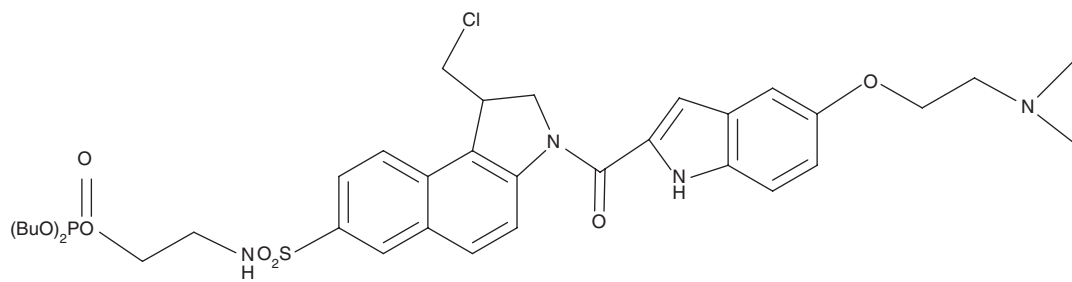
The aliphatic N-oxide, AQ4N (banoxantrone) (36), has shown encouraging antitumour activity in preclinical studies and ongoing clinical trials [53]. It is selectively activated by two-electron reduction within hypoxic cells to AQ4 (37), a stable and persistent mitoxantrone analogue that acts as a DNA intercalator and topoisomerase II inhibitor [53]. Although AQ4N was discovered more than a decade ago, a novel process for its preparation free of contaminant, based on oxidation of AQ4, was recently described in a US patent [91]. Preclinical studies showed that, when given before or after RT, AQ4N could potentiate the antitumour effects of IR in a dose-dependent manner [53]. A recent Phase I study in patients with oesophageal carcinoma revealed that AQ4N is safe and well tolerated at a dose capable of enhancing fractionated RT [92]. A Phase I/II trial of AQ4N in combination with RT and temozolomide has been initiated in glioblastoma patients [13].

Analogues of mitomycin C, the prototypic quinone-based bioreductive drug [53], have been synthesised and selected for increased activity toward hypoxic tumour cells, leading to the generation of EO9 (apaziquone) (38). Similar to other indoloquinones, activation of EO9 is thought to involve one- or two-electron reduction by different cellular reductases, producing semiquinone and hydroquinone radical anions that cause deleterious DNA crosslinking [53]. Although EO9 exhibited little clinical activity as a single agent in a range of tumour types, promising results were obtained when it was combined with RT in preclinical tumour models [53]. A patent application by Spectrum Pharmaceuticals, thus, claimed the utility of EO9 for enhancing the sensitivity of cancer to RT [93]. Data indicated that the combination of EO9 with a regimen of fractionated IR in mice bearing human glioblastoma xenografts reduced tumour growth in an additive manner without causing systemic toxicity [93]. Although the short plasma half-life and poor diffusion properties of EO9 may limit its therapeutic efficacy for solid tumours, this may be advantageous for treating superficial bladder cancer by intravesicular instillation, as stated in another patent application [94]. Accordingly, EO9 is now undergoing Phase III trials in bladder cancer [13], but its role as a radiosensitiser for this indication remains to be examined.

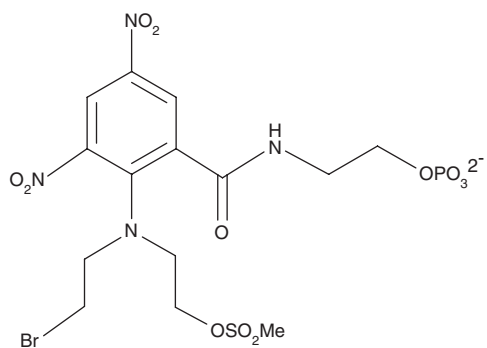
The concept of hypoxia-mediated bioreduction was also exploited by scientists at Yale University and Vion Pharmaceuticals in the design of the sulfonyl hydrazine, KS119 (39), which requires enzymatic nitro-reduction to generate chloroethylating species (40) capable of crosslinking DNA in hypoxic cells [95]. In mice bearing established intradermal solid tumours, combined treatment with KS119 and IR had greater than additive antitumour effects [95]. Because the poor solubility of KS119 in aqueous media would preclude its clinical development, a water-soluble phosphate derivative (41) was synthesised, as disclosed in a patent by Vion Pharmaceuticals [96]. Similar to the original KS119 molecule, this derivative was shown to undergo bioconversion of the 2-nitrophenol under hypoxic conditions. Furthermore, combined therapy of phosphate-bearing KS119 with cytoxan exerted potent synergistic antitumour activity *in vivo* against murine mammary carcinoma and human lung carcinoma xenografts [96].

3.3 Harnessing hypoxia-related tumour glycolysis

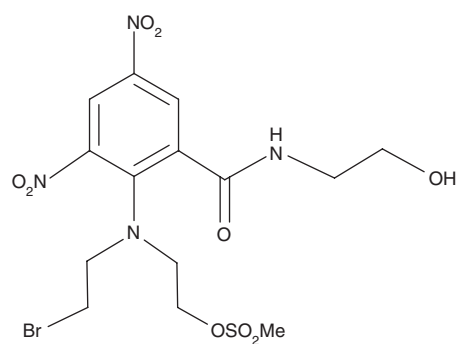
An alternative way to target radioresistant hypoxic tumour cells is to take advantage of their need to metabolise glucose anaerobically for ATP generation [56]. The synthetic glucose analogue, 2-deoxy-D-glucose (2-DG), which inhibits the enzyme responsible for the first step of the glycolytic pathway, was shown to reinforce IR-induced cytotoxicity through an enhancement of metabolic oxidative stress in tumour cells [97,98]. A patent by Threshold Pharmaceuticals claimed the utility of 2-DG, either as a monotherapy or in combination with chemotherapy or RT, for the treatment of cancer [99]. Note, however, that despite encouraging early clinical trial



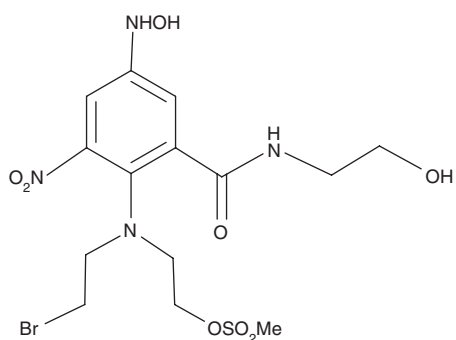
31



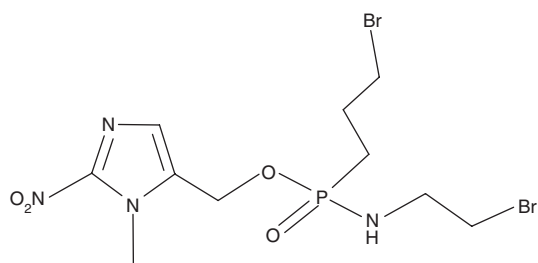
32



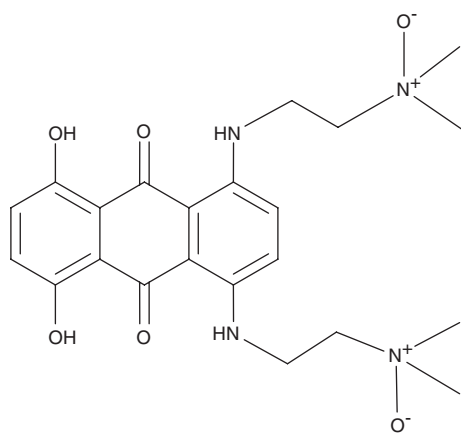
33



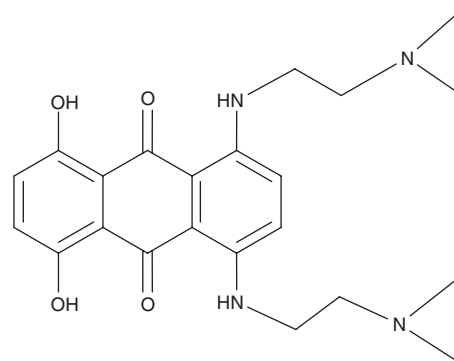
34



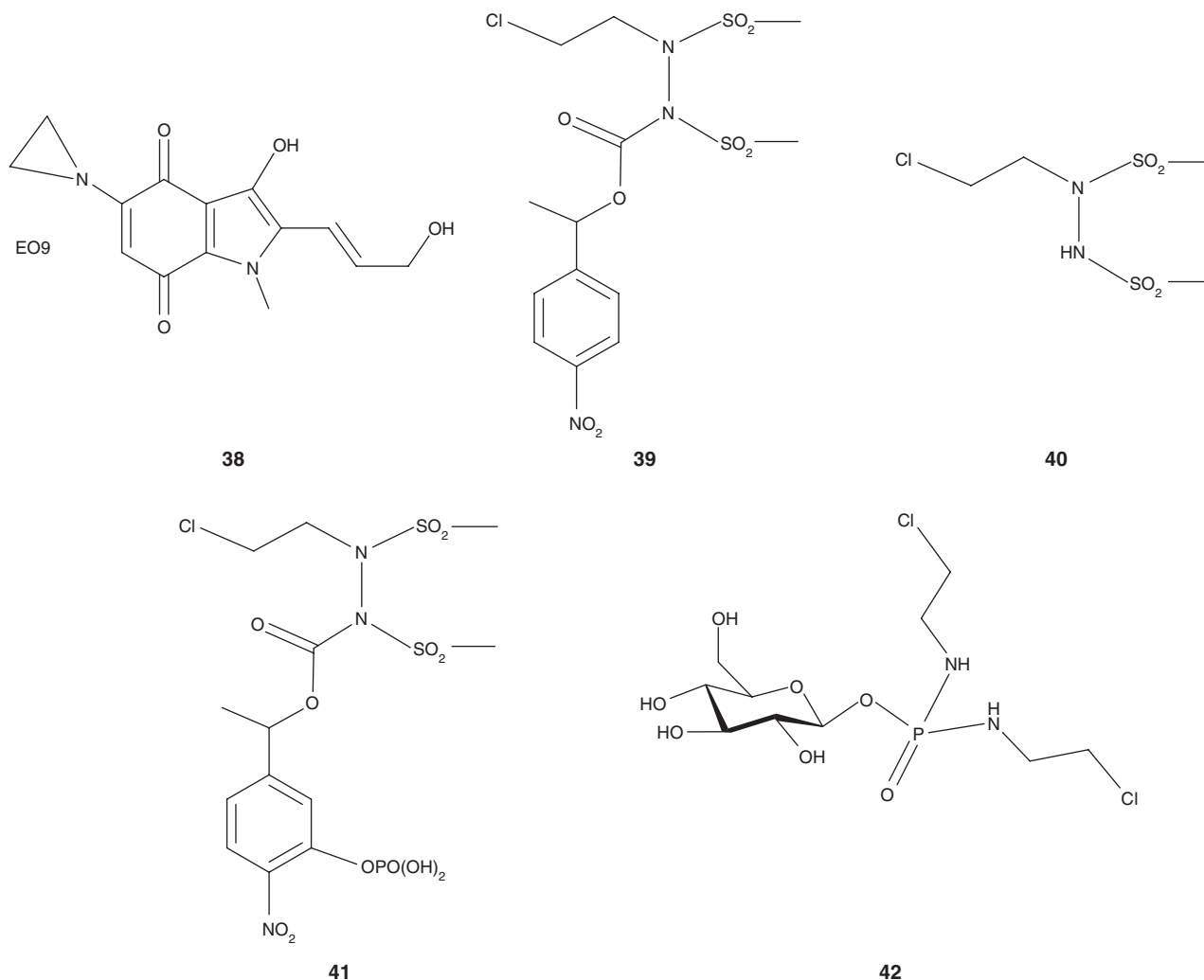
35



36



37



data in solid tumours, further development of 2-DG by this company has been put on hold (www.thresholdpharm.com).

As already mentioned, another consequence of the high rate of glycolysis of hypoxic cancer cells is increased glucose uptake, a process mediated by membrane glucose transporter proteins [56]. This has been exploited in the design of hypoxic cell-selective cytotoxic drugs whose entry into cells depends on glucose transporters, as exemplified by glufosfamide (42), a β -D-glucose conjugate of isophosphoramidate mustard. Glufosfamide and its bromated analogue were claimed as anticancer agents by Threshold Pharmaceuticals [100]. The possible use of glufosfamide for radiosensitisation of sarcomas has been suggested [20].

3.4 Inhibitors of HIF-1

HIF-1 governs the gene expression response associated with hypoxia, leading to angiogenesis, and increased tumour cell glycolysis, survival and metastasis (Figure 2) [54-57]. It is composed of a β subunit that is constitutively expressed and an α subunit, whose stability is regulated by post-translational modifications. HIF-1 α is unstable in well-oxygenated cells

due to ubiquitination and proteasome-mediated degradation, but escapes proteolysis and interacts with HIF-1 β to trigger HIF-1 transcriptional activity in hypoxic cells [54-57]. HIF-1 α expression can also be increased by many growth factors and oncogenic signalling pathways under normoxic conditions (Figure 2). HIF-1 activity is elevated in a variety of cancers, in which it correlates with poor prognosis owing to aggressive growth and resistance to RT [54,57]. Furthermore, exposure of tumour cells to IR upregulates HIF-1 activity through complex processes that result in hypoxia-independent stabilisation of HIF-1 α (Figure 2) [57]. Therefore, by blocking several mechanisms controlling cancer progression and radioresistance, drugs that suppress HIF-1 α expression or inhibit HIF-1 activity through other means may provide therapeutic benefits for the treatment of solid tumours [54,55,57,101].

A number of existing anticancer agents, including compounds that affect heat-shock protein 90, topoisomerases, microtubule complexes, histone deacetylases and various kinases, have been shown to interfere with HIF-1-mediated transcription [54,55]. The aforementioned nucleoside analogue, TAS-106, was also recently shown to enhance IR-induced apoptosis in hypoxic

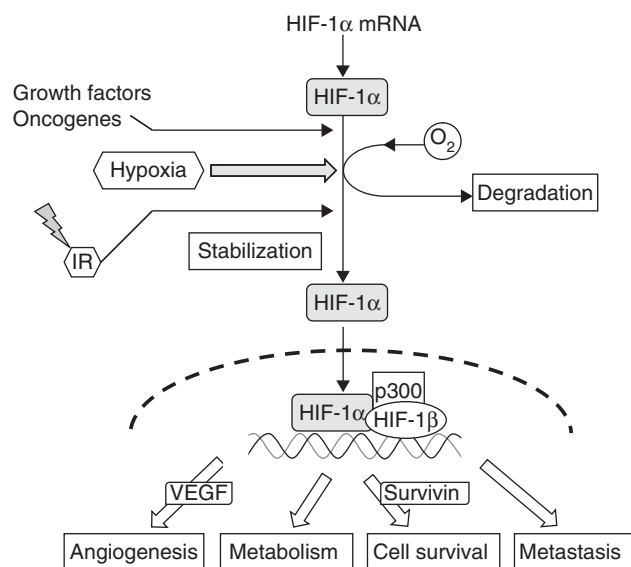


Figure 2. Simplified model of the mechanisms of HIF-1 regulation in tumour cells. HIF-1 transcriptional activity requires the formation of a heterodimer consisting of HIF-1 β , which is constitutively expressed, and HIF-1 α , whose stability is regulated by post-translational modifications. Under normoxic conditions, HIF-1 α protein is hydroxylated in an oxygen-dependent manner, resulting in its ubiquitination and degradation by the proteasome. Under conditions of hypoxia, such proteolysis cannot occur, which leads to stabilisation of HIF-1 α . Signalling events emanating from growth factor receptors or oncogenes (e.g., Ras) can augment HIF-1 α protein levels independently of hypoxia. HIF-1 α expression can also be upregulated by exposure of tumour cells to IR, through complex processes that may involve the release of HIF-1 α mRNA sequestered in stress granules, as well as the stabilisation of HIF-1 α protein due to the actions of reactive oxygen species and of nitric oxide secreted by IR-activated macrophages. On translocation into the nucleus, HIF-1 α heterodimerises with HIF-1 β and recruits cofactors, such as p300, to bind to and activate hypoxia response elements in regulatory regions of target genes that control angiogenesis, anaerobic metabolism, cell survival and metastasis, as well as other cellular functions. Examples of molecules whose synthesis is increased by HIF-1 activity are VEGF, which stimulates angiogenesis, and survivin, an antiapoptotic protein that promotes tumour cell survival.

HIF-1: Hypoxia-inducible factor 1; IR: Ionising radiation.

tumour cells through HIF-1 α inhibition and subsequent downregulation of survivin expression [18]. However, many of these drugs seem non-selective in targeting HIF-1 as they may alter different signalling pathways implicated in its regulation.

A more specific approach is to suppress the synthesis of HIF-1 α by means of RNA inhibition methodology. As a proof of concept, downregulation of HIF-1 α protein level using small interfering RNA was shown to potentiate the antitumour effect of IR [102]. This approach was advocated in a patent by Santaris Pharmaceuticals [103] based on the design of high-affinity and biologically stable antagonistic RNA analogues with rigid conformation called locked

nucleic acids. The lead anti-HIF-1 α locked nucleic acid sequence was shown to suppress the growth of glioblastoma xenografts in mice [103]. This compound, now licensed to Enzon Pharmaceuticals (EZN-2968), is undergoing a Phase I clinical trial in patients with advanced solid tumours or lymphoma [13].

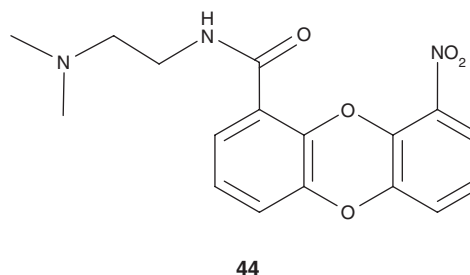
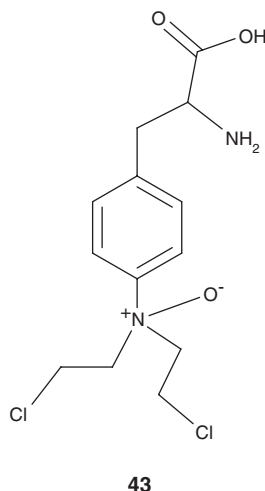
An alternative method for targeting HIF-1 α is exemplified by PX-478 (43), a compound that was discovered by scientists at Prolx (now Oncocyte) [104]. PX-478 was shown to downregulate HIF-1 α expression in colon cancer xenografts and to markedly delay the growth of a variety of human cancer xenografts in mice [105]. Evidence was obtained that PX-478 acts predominantly by suppressing HIF-1 α synthesis at the level of translation, and to a lesser extent, by increasing the degradation of the protein through heightened ubiquitination [106]. Recent studies further demonstrated the ability of PX-478 to enhance the radiosensitivity of prostate carcinoma cells under hypoxic and normoxic conditions *in vitro* [107] and to potentiate the antitumour effect of IR through inhibition of HIF-1 signalling in glioma xenografts [108]. A Phase I trial of PX-478 in lymphoma and advanced solid tumours has been recently initiated [13].

Another approach, recently proposed by Duke University researchers [109], relies on their finding that following IR exposure the expression of HIF-1 α protein is upregulated in tumour cells as a result of its stabilisation through S-nitrosylation by NO released from tumour-associated macrophages [74]. Suppression of NO production by administration of a potent NO synthase inhibitor was shown to sensitise melanoma and mammary tumours to the antitumour effect of fractionated RT in mice [74]. It was thus claimed that agents preventing the S-nitrosylation of HIF-1 α may prove useful as radiosensitisers for cancer treatment [109]. As noted before, the observation that NO may contribute to tumour radioresistance underscores the complex role of this molecule in tumour development and the difficulty of predicting the consequences of its modulation for RT enhancement [70].

A number of other agents capable of suppressing HIF-1 α expression have been described in recent patents, but their possible use as tumour radiosensitisers remains to be determined experimentally. This is the case for the tricyclic carboxamide, NSC 644221 (44), which was shown to inhibit HIF-1 α activity at non-cytotoxic concentrations in hypoxic tumour cells [110]. Further studies warranting further preclinical development of this compound were reported [111].

4. Expert opinion

This patent survey does not pretend to be a comprehensive overview of current approaches for radiosensitisation. Nevertheless, it makes it clear that despite methodological progresses in the utilisation of conventional anticancer drugs as radiosensitisers, their intrinsic toxicity remains a major limiting liability. Indeed, these drugs were not initially designed for radiosensitisation, and their use for this application is based on empirical rather than rational approaches. The patents



mentioned here mostly reflect efforts to enhance the pharmaceutical activity of these drugs, primarily as anticancer chemotherapeutics and only optionally as radiosensitisers. Orally bioavailable derivatives were produced so as to facilitate their clinical use, or to bypass processes that render tumour cells refractory to their cytotoxic action. More innovative are strategies to improve the tumour selectivity of the active entity by altering its metabolism in normal tissues, or by harnessing the enzymatic make up of the tumour cells. Drugs have also been modified to tentatively confer hypoxic radiosensitising activity by the addition of electron-affinic groups. Overall, these advances, however, fall short of providing the desired incremental enhancement of RT efficacy that would dramatically ameliorate cancer treatment outcome. ongoing and future studies aimed at defining the mechanisms of tumour radiosensitisation by conventional anticancer drugs are thus critical to optimise their clinical use and to help identify novel molecular targets for drug development. For instance, current data indicate that many of these drugs potentiate RT by interfering with the repair of IR-induced DNA damage (Table 1). Such a mechanism is already exploited by novel approaches targeting DNA repair enzymes, as will be reviewed in a second article. Therefore, it seems likely that, given the advent of more rationally designed agents, the patent activity related to traditional cytotoxic radiosensitisers will wane over the coming years.

Targeting hypoxia, a major parameter of tumour radioresistance, has been validated as a potential strategy for RT enhancement by numerous preclinical studies over the past 3 decades. However, the concept of hypoxic radiosensitiser has not lived up to its promise in the clinic, in part owing to the poor therapeutic index of the available nitroimidazole compounds. Few recently published patents attempted to address this issue (Table 2), but *in vivo* data for the proposed agents are scarce or missing, with the exception of studies conducted in Japan with doranidazole. Although the latter may prove useful in some clinical situations, this may not be sufficient to prompt much further research and patent activity

on hypoxic radiosensitisers. More hopeful may be the field of bioreductive cytotoxins, which has kept busy for the past few years to try and improve on the existing drugs and identify novel structures (Table 3). Although clinical studies with TPZ have proven somewhat disappointing, much has been learnt from them that can help guide the development of the newly patented compounds. It is encouraging that two of these compounds, PR-104 and TH-302, which showed potential as tumour radiosensitisers in experimental studies, have now entered clinical trials. If successful, these trials are likely to foster further patent activity around this approach in the forthcoming years. For instance, one might anticipate medicinal chemistry efforts aimed at designing novel bioreductive drugs that disable molecular components of radioresistance or help eradicate hypoxic cancer stem cells [112]. Methods of radiosensitisation taking advantage of tumour glycolysis may also get further attention, given the rekindled interest in the metabolic alterations associated with hypoxia and malignancy. Last but not least, inactivation of the HIF-1 pathway stands as one of the most attractive strategies to address the problem of tumour hypoxia. As will be reviewed later, downstream molecular effectors of this pathway, such as VEGF or survivin (Figure 2), represent validated targets for radiosensitisation. Hence, judicious scheduling of HIF-1 inhibition with RT may provide a multitarget approach for enhancing IR-induced tumour cell killing. Depending on the outcome of the ongoing clinical trials with EZN-2968 and PX-748, an upsurge of HIF-1-related patent activity might well take place over the coming years, with likely fallouts in the arena of tumour radiosensitisation for cancer treatment.

Declaration of interest

P Bischoff and A Altmeyer are supported by grants from the European Commission within the Sixth Framework Program through I3-EURONS and Électricité de France (Comité de Radioprotection).

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as either of interest (•) or of considerable interest (••) to readers.

1. Bernier J, Hall EJ, Giaccia A. Radiation oncology: a century of achievements. *Nat Rev Cancer* 2004;4:737-47
2. Seiwert TY, Salama JK, Vokes EE. The concurrent chemoradiation paradigm—general principles. *Nat Clin Pract Oncol* 2007;4:86-100
- **An overview of the molecular mechanism of action of conventional radiosensitisers and of the general principles that may guide their clinical utilization in the treatment of cancer.**
3. Bentzen SM, Harari PM, Bernier J. Exploitable mechanisms for combining drugs with radiation: concepts, achievements and future directions. *Nat Clin Pract Oncol* 2007;4:172-180
- **This review outlines a conceptual framework for combining drugs with IR to enhance the anticancer efficacy of RT that is based on five principal mechanisms for their interaction, including spatial cooperation, cytotoxic enhancement, biological cooperation, temporal modulation and normal tissue protection.**
4. Wardman P. Chemical radiosensitizers for use in radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2007;19:397-417
- **An excellent update on the various types of chemical agents now used as radiosensitisers and of their basic mode of actions with particular emphasis on hypoxia targeted drugs.**
5. Oehler C, Dickinson DJ, Brogini-Tenzer A, et al. Current concepts for the combined treatment modality of ionizing radiation with anticancer agents. *Curr Pharm Des* 2007;13:519-35
- **An overview of the modalities now explored for radiosensitisation as classified according to their action on the biological determinants of tumor response to fractionated RT, namely the repair of IR-induced lesions, the reassortment of tumor cell cycle distribution, and the repopulation and reoxygenation of the tumor.**
6. Shewach DS, Lawrence TS. Antimetabolite radiosensitizers. *J Clin Oncol* 2007;25:4043-50
- **An excellent review of the purported mechanisms of action of antimetabolite drugs now used as radiosensitisers in the clinical setting.**
7. Ben-Josef E. Capecitabine and radiotherapy as neoadjuvant treatment for rectal cancer. *Am J Clin Oncol* 2007;30:649-55
8. Nukatsuka M, Fujioka A, Nakagawa F, et al. Antimetastatic and anticancer activity of S-1, a new oral dihydropyrimidine-dehydrogenase-inhibiting fluoropyrimidine, alone and in combination with paclitaxel in an orthotopically implanted human breast cancer model. *Int J Oncol* 2004;25:1531-6
9. Nakata E, Fukushima M, Takai Y, et al. S-1, an oral fluoropyrimidine, enhances radiation response of DLD-1/FU human colon cancer xenografts resistant to 5-FU. *Oncol Rep* 2006;16:465-71
10. Taiho Pharmaceutical Co. Radiotherapy enhancer. EP1864683; 2007
11. Taiho Pharmaceutical Co. Potentiator for radiation therapy comprising pyridine derivative as active ingredient. EP1864974; 2007
12. Tsujinaka T, Fujitani K, Hirao M, et al. Current status of chemoradiotherapy for gastric cancer in Japan. *Int J Clin Oncol* 2008;13:117-20
13. Clinical Trials. Available from: www.clinicaltrials.gov
14. Saif MW, Berk G, Cheng YC, et al. IPdR: a novel oral radiosensitizer. *Expert Opin Invest Drugs* 2007;16:1415-24
15. University of Miami. Designer therapy of pancreatic tumors. WO2008085611; 2008
16. Kazuno H, Shimamoto Y, Tsujimoto H, et al. Mechanism of action of a new antitumor ribonucleoside, 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)cytosine (ECyd, TAS-106), differs from that of 5-fluorouracil. *Oncol Rep* 2007;17:1453-60
17. Yasui H, Inanami O, Asanuma T, et al. Treatment combining X-irradiation and a ribonucleoside anticancer drug, TAS106, effectively suppresses the growth of tumor cells transplanted in mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;68:218-28
- **This study demonstrates that low amounts of TAS-106 (0.1 mg/kg and 0.5 mg/kg) enhance the inhibitory effect of a low dose of IR (2 Gy) on tumour growth in mice and that this radiosensitising action reflects an inhibition of the expression of the antiapoptotic protein, survivin.**
18. Yasui H, Ogura A, Asanuma T, et al. Inhibition of HIF-1alpha by the anticancer drug TAS106 enhances X-ray-induced apoptosis in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 2008;99:1442-52
- **Shows that TAS-106 (0.5 mg/kg) suppressed HIF-1α expression and enhanced the induction of apoptosis in the hypoxic region of a solid tumor when combined with 2 Gy of IR in mice, indicating that this compound may be useful as hypoxic tumor radiosensitizer.**
19. Taiho Pharmaceutical Co. L. 3'-ethynylcytidine derivative. WO2008012945; 2008
20. Anderson P, Aguilera D, Pearson M, et al. Outpatient chemotherapy plus radiotherapy in sarcomas: improving cancer control with radiosensitizing agents. *Cancer Control* 2008;15:38-46
- **This paper discusses the clinical use of various anticancer drugs to improve the efficacy of RT in the treatment of high-risk sarcomas.**
21. Flanagan SA, Robinson BW, Krokosky CM, et al. Mismatched nucleotides as the lesions responsible for radiosensitization with gemcitabine: a new paradigm for antimetabolite radiosensitizers. *Mol Cancer Ther* 2007;6:1858-68
- **Demonstrates that increased nucleotide misincorporations causing mismatched nucleotides is the principal mechanism that underlies tumor cell radiosensitisation by gemcitabine and suggests that mismatch repair deficiency may amplify this radiosensitising effect.**
22. Jordheim L, Galmarini CM, Dumontet C. Recent developments to improve the efficacy of cytotoxic nucleoside analogs. *Recent Patents Anticancer Drug Discov* 2006;1:163-70
23. Clavis Pharma AS. Oral dosage forms of gemcitabine derivatives. WO2006098628; 2006
24. Southern Research Institute. Methods for treating neoplasia with combination of chemotherapeutic agents and radiation. WO2008128170; 2008
25. Cariveau MJ, Stackhouse M, Cui XL, et al. Clofarabine acts as radiosensitizer in vitro and in vivo by interfering with DNA damage response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008;70:213-20
- **Shows that a moderate dose of clofarabine enhances the growth inhibitory effect of fractionated RT on colorectal cancer xenografts in mice and that this powerful**

- radiosensitising activity of clofarabine is due to an interference with the DNA damage response.
26. Barker CA, Burgan WE, Carter DJ, et al. In vitro and in vivo radiosensitization induced by the ribonucleotide reductase inhibitor Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone). *Clin Cancer Res* 2006;12:2912-8
- Demonstrates that treatment of mice bearing tumour xenografts with triapine immediately after irradiation produced a greater than additive augmentation of IR-induced tumour growth delay and that this effect involves an inhibition of DNA repair.
27. US Government. Methods of treating or preventing cancer using pyridine carboxaldehyde pyridine thiosemicarbazone radiosensitizing agents. WO2007035489; 2007
28. Kil WJ, Cerna D, Burgan WE, et al. In vitro and in vivo radiosensitization induced by the DNA methylating agent temozolomide. *Clin Cancer Res* 2008;14:931-8
- This study shows that the tumour radiosensitising activity of temozolomide reflects an inhibition of the repair of IR-induced DNA lesions resulting in increased mitotic catastrophe.
29. Nieder C, Adam M, Grosu AL. Combined modality treatment of glioblastoma multiforme: the role of temozolomide. *Rev Recent Clin Trials* 2006;1:43-51
30. Trivedi RN, Wang XH, Jelezcova E, et al. Human methyl purine DNA glycosylase and DNA polymerase beta expression collectively predict sensitivity to temozolomide. *Mol Pharmacol* 2008;74:505-16
31. University of Pittsburgh, Sobol R. Inhibiting DNA polymerase beta to enhance efficacy of anticancer agents. WO2007001684; 2007
32. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007;7:573-84
- This review provides an update on the current understanding of the mechanism of anticancer action of platinum complexes and on the development of a new generation of such compounds with improved pharmaceutical properties.
33. Hermann RM, Rave-fränk M, Pradier O. Combining radiation with oxaliplatin: a review of experimental results. *Cancer Radiother* 2008;12:61-7
- The various mechanisms possibly implicated in the radiosensitising action of oxaliplatin are discussed.
34. Pola Chemical Industry, Inc. Agent for reinforcing radiation-sensitizing ability in hypoxic cell radiation sensitizer. JP2007302609; 2007
35. Momekov G, Momekova D. Recent developments in antitumour platinum coordination compounds. *Expert Opin Ther Patents* 2006;16:1383-403
36. Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* 2006;6:789-802
37. Darzynkiewicz Z. Broken beyond repair. Damaging DNA in glioblastoma cells with radiation and camptothecin. *Cancer Biol Ther* 2008;7:374-5
38. Kitasato Gakuen Foundation. Chemoradiotherapy with TS-1/camptothecins. US2007036717; 2007
39. California Pacific Medical Center, Catholic Healthcare West. Camptothecin derivatives as chemoradiosensitizing agents. WO2007048002; 2007
40. Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;59:928-42
41. Florida State University. Radiosensitizing taxanes and their pharmaceutical preparations. US7067552; 2006
42. American Bioscience, Inc. Combinations and modes of administration of therapeutic agents and combination therapy. WO2006089290; 2006
43. Wiedenmann N, Valdecana D, Hunter N, et al. 130-nm albumin-bound paclitaxel enhances tumor radiocurability and therapeutic gain. *Clin Cancer Res* 2007;13:1868-74
44. Fumoleau P, Coudert B, Isambert N, et al. Novel tubulin-targeting agents: anticancer activity and pharmacologic profile of epothilones and related analogues. *Ann Oncol* 2007;18(Suppl 5):v9-15
45. Hofstetter B, Vuong V, Broggin-tenzen A, et al. Patupilone acts as radiosensitizing agent in multidrug-resistant cancer cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2005;11:1588-96
46. Novartis AG. Treatment of proliferative diseases with epothilone derivatives and radiation. EP1605937; 2005
47. Brown JM. The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy – Eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 1999;59:5863-70
48. Brown JM. Tumor hypoxia in cancer therapy. *Methods Enzymol* 2007;435:297-321
- This review concludes that the physicochemical free radical mechanism of the oxygen effect plays a key role in sensitizing cells to IR and that dampening of this mechanism under hypoxia represents a major factor of tumour radioresistance.
49. Bache M, Kappler M, Said HM, et al. Detection and specific targeting of hypoxic regions within solid tumors: current preclinical and clinical strategies. *Curr Med Chem* 2008;15:322-38
50. Overgaard J. Hypoxic radiosensitization: adored and ignored. *J Clin Oncol* 2007;25:4066-74
51. Allos Therapeutics Inc. Coadministration of radiation, efaproxiral sodium, and supplemental oxygen for the treatment of cancer. US2007259966; 2007
52. Spectrum Pharmaceuticals, Inc., Trustees of the University of Illinois. Sensitization of tumour cells to radiation therapy through the administration of endothelin agonists, WO2008027839; 2008
53. Mckeown SR, Cowen RL, Williams KJ. Bioreductive drugs: from concept to clinic. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2007;19:427-42
- An excellent overview of the current development status of bioreductive drugs targeting hypoxic tumour cells.
54. Semenza GL. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug Discov Today* 2007;12:853-9
- Reviews the role of HIF-1 in cancer biology and describes the anticancer agents that have been shown to inhibit HIF-1 through various molecular mechanisms.
55. Melillo G. Targeting hypoxia cell signaling for cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:341-52

56. Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer* 2008;8:705-13
57. Dewhirst MW, Cao Y, Moeller B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat Rev Cancer* 2008;8:425-37
- **This review discusses the interplay between hypoxia and oxygen or nitrogen species free radicals in altering the activity of HIF-1 that influences tumor development. It makes the important point that hypoxia is heterogeneous and fluctuating within tumors and concludes that targeting HIF-1 offers therapeutic promise for cancer treatment.**
58. Weinmann M, Welz S, Bamberg M. Hypoxic radiosensitizers and hypoxic cytotoxins in radiation oncology. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2003;3:364-74
59. Nagasawa H, Uto Y, Kirk KL, et al. Design of hypoxia-targeting drugs as new cancer chemotherapeutics. *Biol Pharm Bull* 2006;29:2335-42
60. Murata R, Tsujitani M, Horsman MR. Enhanced local tumour control after single or fractionated radiation treatment using the hypoxic cell radiosensitizer doranidazole. *Radiother Oncol* 2008;87:331-8
- **Shows that non-toxic doses of doranidazole radiosensitise a mammary carcinoma to a greater extent than normal tissue in mice.**
61. Nishimura Y, Nakagawa K, Takeda K, et al. Phase I/II trial of sequential chemoradiotherapy using a novel hypoxic cell radiosensitizer, doranidazole (PR-350), in patients with locally advanced non-small-cell lung Cancer (WJTOG-0002). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;69:786-92
62. Karasawa K, Sunamura M, Okamoto A, et al. Efficacy of novel hypoxic cell sensitizer doranidazole in the treatment of locally advanced pancreatic cancer: long-term results of a placebo-controlled randomised study. *Radiother Oncol* 2008;87:326-30
- **Although combination of doranidazole with RT did not affect short-term survival in pancreatic cancer patients, it significantly improved their 3-year survival.**
63. Pola Chemical Industry, Inc. Treatment for cancer having resistance to radiotherapy. JP2007326814; 2007
64. Pola Chemical Industry, Inc. Enhancer of radiosensitization ability in hypoxic cell radiosensitizer. JP2007230958; 2007
65. University Alberta. Novel substituted 2-nitroimidazoles useful for hypoxic cell therapy and imaging. WO2006102759; 2006
66. Emami S, Kumar P, Yang J, et al. Synthesis, transportability and hypoxia selective binding of 1-beta-D-(5-Deoxy-5-fluororibofuranosyl)-2-nitroimidazole (beta-5-FAZR), a configurational isomer of the clinical hypoxia marker, FAZA. *J Pharm Pharm Sci* 2007;10:237-45
67. Nakae T, Uto Y, Tanaka M, et al. Design, synthesis, and radiosensitizing activities of sugar-hybrid hypoxic cell radiosensitizers. *Bioorg Med Chem* 2008;16:675-82
68. Matthews RH. Radiosensitizer formulations comprising nitrohistidine derivatives. WO2006078903; 2006
69. Wardman P, Rothkamm K, Folkers LK, et al. Radiosensitization by nitric oxide at low radiation doses. *Radiat Res* 2007;167:475-84
70. De Ridder M, Verellen D, Verovski V, et al. Hypoxic tumor cell radiosensitization through nitric oxide. *Nitric Oxide* 2008;19:164-9
- **This paper reviews the experimental evidence for the role of NO as an efficient hypoxic radiosensitizer. Although adequate radiosensitising levels of NO cannot be achieved *in vivo* due to vasoactive complications, it is shown that stimulating endogenous NO production inside tumours may provide an effective approach for RT enhancement.**
71. Duke University. Use of an agent that restores tissue perfusion and oxygenation. WO2006113540; 2006
72. Sonveaux P, Lobysheva II, Feron O, et al. Transport and peripheral bioactivities of nitrogen oxides carried by red blood cell hemoglobin: role in oxygen delivery. *Physiology (Bethesda)* 2007;22:97-112
73. Coulter JA, McCarthy HO, Worthington J, et al. The radiation-inducible pE9 promoter driving inducible nitric oxide synthase radiosensitizes hypoxic tumour cells to radiation. *Gene Ther* 2008;15:495-503
74. Li F, Sonveaux P, Rabbani ZN, et al. Regulation of HIF-1alpha stability through S-nitrosylation. *Mol Cell* 2007;26:63-74
- **This study demonstrates that IR stabilizes HIF-1 α in normoxic tumour tissues through S-nitrosylation by NO generated from neighboring activated macrophages.**
75. Evans JW, Chernikova SB, Kachnic LA, et al. Homologous recombination is the principal pathway for the repair of DNA damage induced by tirapazamine in mammalian cells. *Cancer Res* 2008;68:257-65
76. Reddy SB, Williamson SK. Tirapazamine: a novel agent targeting hypoxic tumor cells. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18:77-87
77. Denny WA. Hypoxia-activated anticancer drugs. *Exp Opin Ther Patents* 2005;15:635-46
78. Hicks KO, Puijn FB, Secomb TW, et al. Use of three-dimensional tissue cultures to model extravascular transport and predict *in vivo* activity of hypoxia-targeted anticancer drugs. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1118-28
- **Describes an *in vitro* model to predict the extravascular transport of hypoxia-targeted drugs in tumours.**
79. Auckland Uniservices Ltd. Novel 1,2,4-benzotriazine-1,4-dioxides. WO2005082867; 2005
80. Hay MP, Hicks KO, Puijn FB, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic model-guided identification of hypoxia-selective 1,2,4-benzotriazine 1,4-dioxides with antitumor activity: the role of extravascular transport. *J Med Chem* 2007;50:6392-404
- **Describes 1,2,4-benzotriazine 1,4-dioxide analogues of TPZ with improved *in vivo* activity against hypoxic cells owing to increased extravascular transport properties. Shows that the PK/PD model employed may provide a general strategy for selecting hypoxia-directed drug candidate for further *in vivo* evaluation.**
81. Auckland Uniservices Ltd. Tricyclic 1,2,4-triazine oxides and compositions therefrom for therapeutic use in cancer treatments. WO2006104406; 2006
82. Hay MP, Hicks KO, Pchalek K, et al. Tricyclic [1,2,4]triazine 1,4-dioxides as hypoxia selective cytotoxins. *J Med Chem* 2008;51:6853-65
83. Hay MP, Atwell GJ, Wilson WR, et al. Structure-activity relationships for 4-nitrobenzyl carbamates of 5-aminobenz[e]indoline minor groove alkylating agents as prodrugs for GDEPT in conjunction with *E. coli* nitroreductase. *J Med Chem* 2003;46:2456-66

84. Auckland Uniservices Ltd. Nitrobenzidoles and their use in cancer therapy. WO2006043839; 2006
85. Auckland Uniservices Ltd. Novel nitrophenyl mustard and nitrophenylaziridine alcohols and their corresponding phosphates and their use as targeted cytotoxic agents. WO2005042471; 2005
86. Patterson AV, Ferry DM, Edmunds SJ, et al. Mechanism of action and preclinical antitumor activity of the novel hypoxia-activated DNA cross-linking agent PR-104. Clin Cancer Res 2007;13:3922-32
- A study of the *in vivo* metabolism and mode of radiosensitisation of PR-104 in tumour xenografts.
87. Hicks KO, Myint H, Patterson AV, et al. Oxygen dependence and extravascular transport of hypoxia-activated prodrugs: comparison of the dinitrobenzamide mustard PR-104A and tirapazamine. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2007;69:560-71
- This study establishes that PR-104 has different PK/PD properties from TPZ and superior activity with single-dose RT against tumour xenografts. PR-104 is likely to exert a bystander cytotoxic effect onto oxygenated tumour cells resulting from diffusion of its activated metabolites from hypoxic zones.
88. Threshold Pharmaceuticals, Inc. Phosphoramidate alkylator prodrugs. WO2007002931; 2007
89. Duan JX, Jiao H, Kaizerman J, et al. Potent and highly selective hypoxia-activated achiral phosphoramidate mustards as anticancer drugs. J Med Chem 2008;51:2412-20
90. Threshold Pharmaceuticals, Inc. Phosphoramidate alkylator prodrugs for the treatment of cancer. WO2008083101; 2008
91. Kudos Pharmaceuticals, Inc. Process for the preparation of AQ4N. US2007161808; 2007
92. Steward WP, Middleton M, Benghiat A, et al. The use of pharmacokinetic and pharmacodynamic end points to determine the dose of AQ4N, a novel hypoxic cell cytotoxin, given with fractionated radiotherapy in a phase I study. Ann Oncol 2007;18:1098-103
93. Spectrum Pharmaceuticals Inc. Indoloquinone tumor radiation sensitization. WO2006105507; 2006
94. Spectrum Pharmaceuticals Inc. Medical compositions for intravesical treatment of bladder cancer. US2007010570; 2007
95. Seow HA, Penketh PG, Shyam K, et al. 1,2-Bis(methylsulfonyl)-1-(2-chloroethyl)-2-[[1-(4-nitrophenyl)ethoxy]carbonyl]hydrazine: an anticancer agent targeting hypoxic cells. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:9282-7
96. Vion Pharmaceuticals, Inc. Phosphate-bearing prodrugs of sulfonyl hydrazines as hypoxia-selective antineoplastic agents. WO2006034266; 2006
97. Maity A, Tuttle SW. 2-Deoxyglucose and radiosensitization: teaching an old DOG new tricks? Cancer Biol Ther 2006;5:824-6
98. Coleman MC, Asbury CR, Daniels D, et al. 2-deoxy-D-glucose causes cytotoxicity, oxidative stress, and radiosensitization in pancreatic cancer. Free Radic Biol Med 2008;44:322-31
- Shows that in pancreatic tumour xenografts the combination of 2-Deoxy-D-glucose with RT results in greater inhibition of tumour growth and increased survival, relative to either agent alone. The inhibition of glucose metabolism in tumour cells may cause cytotoxicity through oxidative stress resulting from disruptions in thiol metabolism.
99. Threshold Pharmaceuticals. Treatment of cancer with 2-deoxyglucose. WO2006124573; 2006
100. Threshold Pharmaceuticals. Anti-cancer therapies. WO2007035961; 2007
101. Moeller BJ, Richardson RA, Dewhirst MW. Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. Cancer Metastasis Rev 2007;26:241-8
102. Zhang X, Kon T, Wang H, et al. Enhancement of hypoxia-induced tumor cell death in vitro and radiation therapy in vivo by use of small interfering RNA targeted to hypoxia-inducible factor-1alpha. Cancer Res 2004;64:8139-42
103. Santaris Pharmaceuticals SA. Potent LNA oligonucleotides for the inhibition of HIF-1a expression. WO2006050734; 2006
104. Prolex Pharmaceuticals Corp. Regulation of HIF protein levels via deubiquitination pathways. WO2005007828; 2005
105. Welsh S, Williams R, Kirkpatrick L, et al. Antitumor activity and pharmacodynamic properties of PX-478, an inhibitor of hypoxia-inducible factor-1alpha. Mol Cancer Ther 2004;3:233-44
106. Koh MY, Spivak-kroizman T, Venturini S, et al. Molecular mechanisms for the activity of PX-478, an antitumor inhibitor of the hypoxia-inducible factor-1alpha. Mol Cancer Ther 2008;7:90-100
- Study of the mechanism of PX-478 action showing that it inhibits HIF-1α in both normoxic and hypoxic tumour cells primarily at the level of translation.
107. Palayoor ST, Mitchell JB, Cerna D, et al. PX-478, an inhibitor of hypoxia-inducible factor-1alpha, enhances radiosensitivity of prostate carcinoma cells. Int J Cancer 2008;123:2430-7
- This paper shows that PX-478 acts as a radiosensitiser of prostate carcinoma cells under normoxic and hypoxic conditions *in vitro*.
108. Schwartz D, OJ, Williams R, et al. Molecular-genetic image guided studies of the antitumor HIF-1α inhibitor PX-478 in combination with radiation. AARC meeting 2008 [Abstr 2566]
- This abstract presents data demonstrating the radiosensitising activity of PX-478 *in vivo*.
109. Duke University. Inhibition of HIF-1 activation for antitumour and anti-inflammatory responses. WO2007123777; 2007
110. US Government. Tricyclic compounds as inhibitors of the hypoxic signaling pathway. WO2005118580; 2005
111. Creighton-gutteridge M, Cardellina JH, Stephen AG, et al. Cell type-specific, topoisomerase II-dependent inhibition of hypoxia-inducible factor-1alpha protein accumulation by NSC 644221. Clin Cancer Res 2007;13:1010-8
112. Rich JN. Cancer stem cells in radiation resistance. Cancer Res 2007;67:8980-4

Affiliation

Pierre Bischoff[†], Anaïs Altmeyer & Francis Dumont
[†]Author for correspondence
 Université de Strasbourg,
 Centre Régional de Lutte contre le Cancer Paul Strauss,
 Laboratoire de Radiobiologie EA-3430,
 3 rue de la porte de l'Hôpital,
 F-67065 Strasbourg, France
 Tel: +33 3 88 25 85 42; Fax: +33 3 88 25 85 00;
 E-mail: pbischoff@strasbourg.fnclcc.fr

Expert Opinion

1. Introduction
2. Targeting IR-induced DNA break repair
3. Targeting epidermal growth factor signalling
4. Targeting NF- κ B
5. Potentiating IR-induced apoptosis
6. Targeting histone deacetylases
7. Targeting Hsp90
8. Targeting tumour angiogenesis
9. Expert opinion

informa
healthcare

Radiosensitising agents for the radiotherapy of cancer: novel molecularly targeted approaches

Francis Dumont, Anais Altmeyer & Pierre Bischoff[†]

Université de Strasbourg, Laboratoire de Radiobiologie EA-3430, Centre Régional de Lutte Contre le Cancer Paul Strauss, 3 rue de la porte de l'Hôpital, F-67065 Strasbourg, France

Background: The efficacy of radiotherapy (RT) for cancer treatment is limited by normal tissue toxicity and by the intrinsic or acquired radioresistance of many tumours. Therefore, continuing efforts are conducted to identify radiosensitising agents that preferentially sensitise tumour cells to the cytotoxic action of RT. Recent progresses in molecular oncology have uncovered an array of novel targets, which may be exploited for RT enhancement. **Objective:** To survey the patent literature of the past 4 years pertaining to the development of molecularly targeted agents as potential tumour radiosensitisers. **Methods:** Patents were searched with a set of relevant keywords using several search engines. A Medline search on the same topics was performed in parallel. **Results/conclusion:** A total of 48 patents/applications were selected. These concerned agents target molecular components of pathways involved in DNA damage repair, cell growth and survival signalling, apoptosis modulation and tumour angiogenesis. Current trials of some of these agents may reveal their value as clinical radiosensitisers.

Keywords: angiogenesis, apoptosis, cancer, cell survival, DNA repair, intracellular signalling, kinases, molecular targets, radioresistance, radiosensitiser, radiotherapy

Expert Opin. Ther. Patents (2009) 19(6):1-25

1. Introduction

Radiotherapy (RT) is an important treatment modality in oncology, but the radioresistance of many tumours hampers its effectiveness. The combination of RT with chemotherapeutic agents that sensitise tumours to ionising radiation (IR) and reduce adverse effects on normal tissues has, thus, long been regarded as a promising strategy to enhance cancer therapy [1,2]. In a previous article, we reviewed the patent literature concerning recent advances in the use of conventional anticancer drugs as radiosensitising agents [3]. Here, we examine the patents of the past 4 years that are related to radiosensitisation approaches based on the rational design of drugs targeting some of the molecular entities of tumour radioresistance. As outlined in **Figure 1** and **Table 1**, these molecular targets include components of pathways involved in the repair of IR-induced DNA damage, signalling of tumour cell growth and survival, protection from IR-induced apoptosis and promotion of tumour angiogenesis.

2. Targeting IR-induced DNA break repair

Exposure of normoxic tumour cells to clinically relevant doses of IR causes a range of DNA lesions, including single strand breaks (SSBs) and highly lethal double strand breaks (DSBs) of varying complexity. These lesions elicit DNA damage response mechanisms that recruit pathways of DNA repair enabling the cells to maintain genomic stability [4]. As the balance in the degree of DNA

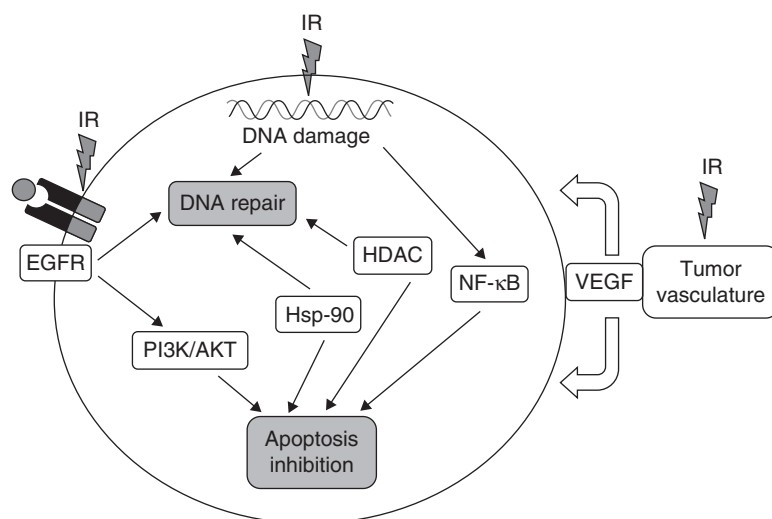


Figure 1. Targets for tumour radiosensitisation. The repair of IR-induced DNA lesions and the inhibition of apoptosis, a prominent mode of IR-induced cell death, represent two major mechanisms of both intrinsic and acquired tumour radioresistance. The molecular components that regulate these mechanisms may thus serve as targets for radiosensitisation. These are: i) components of the DNA repair pathways; ii) EGFR and its TK activity as well as its downstream intracellular PI3K/AKT signalling pathway, which influence both DNA repair and apoptosis induction; iii) the signal transduction pathway associated with the NF-κB transcription factor, which is activated by IR-induced damage and controls apoptosis; iv) the negative regulators that dampen the intrinsic mitochondria-dependent apoptotic pathway triggered by IR-induced DNA damage; v) HDACs, whose enzymatic activity modulates the function of several molecular elements of radioresistance; and vi) Hsp-90, a chaperone involved in the folding, transport and degradation of various proteins implicated in the radioresponse. In addition, molecular pathways that promote angiogenesis, for example, by the action of VEGF, and regulate the growth of integrity of the tumour vasculature also provide potential targets for radiosensitisation.

HDAC: Histone deacetylase; Hsp: Heat-shock protein; IR: Ionising radiation; PI3K: Phosphatidylinositol-3-kinase; TK: Tyrosine kinase.

damage and repair decides the fate of an irradiated cell, such pathways contribute to cellular radioresistance and offer molecular targets for increasing the sensitivity of cancer cells to RT [5,6]. The most promising of these targets are ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase, DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) and poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1), which play major roles in the detection and repair of IR-induced DNA lesions, as well as checkpoint kinase 1 (Chk1), which slows down cell cycle progression to allow for DNA repair (Figure 2) [5,6].

2.1 Inhibitors of ATM kinase

ATM kinase, a member of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) related kinase (PIKK) family, plays a key role in the detection of IR-induced DSBs and, once activated by these lesions, phosphorylates a series of effector proteins in a signalling cascade that coordinates cell cycle arrest and DNA repair (Figure 2) [5,7]. ATM also contributes to the repair of DSBs through homologous recombination [7]. Mutation of the ATM gene causes the disease ataxia telangiectasia, which is associated with multiple cellular defects, including an enhanced sensitivity to IR [5].

Relatively specific ATP-competitive inhibitors of ATM kinase activity were first identified by scientists at Kudos

Pharmaceuticals (now AstraZeneca) [8]. A selected compound, KU-55933 (1), exhibiting a 100-fold greater potency against ATM than against other PIKK family members could significantly enhance IR-induced cytotoxicity in tumour cells, but not in ATM-deficient fibroblasts, at concentrations devoid of intrinsic toxicity [9,10]. Recently, it was further demonstrated that ATM blockade by KU-55933, as well as by a newly identified inhibitor (CP466722, 2), is rapidly reversible in cell cultures and that a transient (4 h or less) inhibition of ATM is sufficient to radiosensitise tumour cells [11]. A patent application by Kudos Pharmaceuticals described another potent ATM inhibitor (3), which also proved capable of augmenting the cytotoxicity of IR toward tumour cells *in vitro*, and possessed good oral bioavailability, favourable tissue pharmacokinetics and low overall *in vivo* toxicity [12]. At the moment, it is unclear whether this compound will be further developed for clinical evaluation.

An alternative strategy to inhibit ATM-mediated DNA damage responses for tumour radiosensitisation was claimed by the Southern Research Institute [13]. It exploits the fact that IR-induced ATM activation requires an interaction of the enzyme with the Nijmegen breakage syndrome (NBS)-1 protein. Small peptides containing the conserved C-terminal sequence motif of NBS-1 (KEESLADDL), which is critical

Table 1. Molecular targets for tumour radiosensitisation.

Molecular target*	Role in tumour radioresistance	Potential drawbacks and side effects of targeting
ATM	Detection and repair of IR-induced DSBs	Risks of secondary malignancies
DNA-PK	NHEJ repair of IR-induced DSBs	Risks of secondary malignancies
Chk-1	Cell cycle arrest in S/G2 in p53-defective cells to allow time for DNA repair	Myelosuppression, inhibition of gastrointestinal epithelial cell proliferation and risks of secondary malignancies
PARP-1	Repair of IR-induced SSBs through BER and DSBs through backup NHEJ mechanisms	Potential to disrupt DNA repair in normal tissues
EGFR	Promotion of tumour cell growth and survival, and activation of DNA-PK after IR exposure	Tumour resistance, skin rashes and other cutaneous side effects
PI3K	Protection and survival of tumour cells after IR-exposure	Hyperglycaemia
AKT	Protection and survival of tumour cells after IR-exposure	Hyperglycaemia
NF-κB	Prosurvival pathway and prevention of apoptosis	Immunosuppression
P53	Inactivation results in defective IR-induced apoptosis	Myelosuppression
Bcl-2	Protection of tumour cells from IR-induced apoptosis	Thrombocytopenia and lymphopenia
XIAP	Protection of tumour cells from IR-induced apoptosis	Thrombocytopenia
Survivin	Protection of tumour cells from IR-induced apoptosis	Mucosal inflammation and neutropenia
HDAC	Modulation of several proteins involved in DNA repair and apoptosis	Mild multiple side effects
Hsp-90	Modulation of several proteins involved in DNA repair, apoptosis and hypoxia response	Mild multiple side effects
VEGFR	Tumour angiogenesis	Tumour resistance, inhibition of normal angiogenesis and kidney damage

*Strategies involve inhibiting the function of the indicated molecular targets, with the exception of p53, whose function is to be restored or upregulated for radiosensitisation.
ATM: Ataxia telangiectasia mutated kinase; BER: Base excision repair; DNA-PK: DNA-dependent protein kinase; DSB: Double strand break; IR: Ionising radiation; NHEJ: Non homologous end joining; SSB: Single strand break.

for this interaction, were shown to decrease the clonogenic survival of irradiated tumour cells [13]. Because this strategy does not target the kinase activity of ATM, it may allow for radiosensitisation without affecting the DNA-damage independent functions of ATM. However, non-peptidic mimetic compounds blocking the NBS-1/ATM interaction site will need to be designed for pharmaceutical use.

2.2 Inhibitors of DNA-PK

DNA-PK, whose catalytic subunit belongs to the PIKK family, is a heterotrimeric enzyme that crucially participates in the repair of DSB lesions through non homologous end joining (NHEJ). This process, which directly ligates the two

ends of the broken DNA molecule, does not require a homologous DNA template and can, therefore, theoretically operate throughout the cell cycle [5,7].

Support for the concept that pharmacologic blockade of DNA-PK activity provides a method for radiosensitisation was initially obtained using morpholin inhibitors identified by scientists at ICOS. Such compounds, exemplified by IC87361 (4), could markedly augment IR-induced cytotoxicity in various human tumour cell lines *in vitro* at concentrations that were not toxic *per se* and could also potentiate IR-induced tumour control in xenograft models without causing detectable systemic toxicity [14].

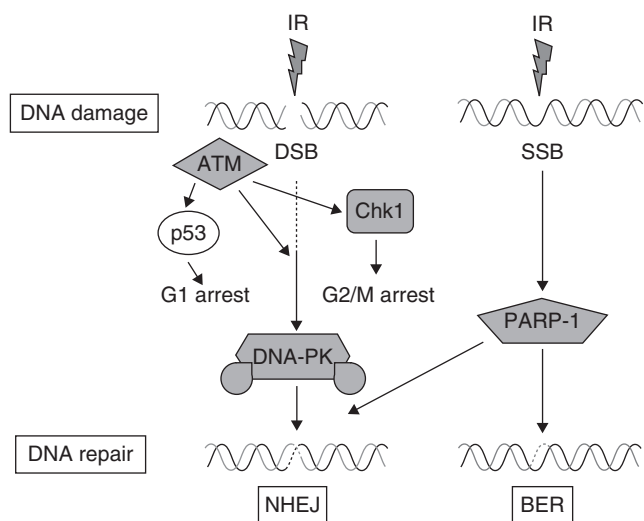


Figure 2. Simplified model of the cellular mechanisms for repair of IR-induced DNA lesions. IR induces directly or indirectly through reactive oxygen species generation, the production of very lethal DSBs, as well as less dangerous SSBs, which need to be repaired to maintain genomic integrity and prevent cell death. DSBs are detected by the ATM kinase (in conjunction with other molecules such as the NBS-1 protein), which phosphorylates a series of downstream effectors in a signalling cascade that coordinates cell cycle arrest and DNA repair. In cells with functional p53 tumour suppressor protein, cell cycle arrest occurs in G1. In cells where p53 is dysfunctional, ATM acts through Chk1 to induce a G2-M arrest. The repair of IR-induced DSBs occurs predominantly through the process of NHEJ mediated by the catalytic subunit of DNA-PK. The repair of SSBs occurs principally through the process of base excision repair achieved by PARP-1, an enzyme that also contributes to the repair of DSBs through a backup NHEJ mechanism. Note that DSBs may also be repaired in an ATM-dependent manner through the process of homologous recombination (not shown).

ATM: Ataxia telangiectasia mutated; BER: Base excision repair; Chk: Checkpoint kinase; DNA-PK: DNA-dependent protein kinase; DSB: Double strand DNA break; IR: Ionising radiation; NBS: Nijmegen breakage syndrome; NHEJ: Non-homologous end joining; PARP: Poly(ADP-ribose) polymerase; SSB: Single strand DNA break.

killed ATM-defective cells when used in combination with 142 IR or etoposide [17], Kudos Pharmaceuticals claimed that KU-0060648 could be clinically useful for sensitising ATM-deficient tumours to DNA-damaging cancer therapies [18]. 145

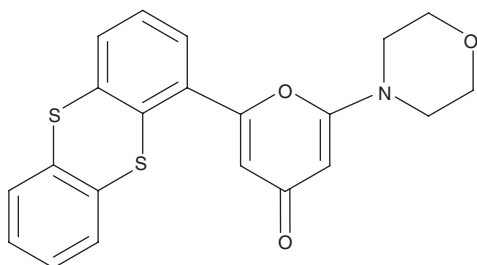
The use of exogenous short DNA molecules mimicking DSBs (Dbaits) has been proposed as an alternative method to disable the repair of IR-induced DNA lesions [19,20]. Such molecules, made up of 32bp dsDNA with one free end, were shown to be recognised by the DNA-PK complex and 150 to trigger activation of its catalytic subunit, and by doing so to hijack the complex away from chromosomal DSBs, thereby disrupting the radioprotective DNA damage response. Evidence was presented that Dbait could radiosensitise different types of radioresistant tumours both *in vitro* and in 155 xenograft models [19,20].

2.3 Inhibitors of Chk1

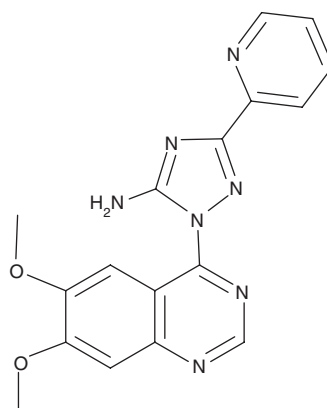
The repair of IR-induced DSBs requires an arrest of cell cycle progression to avoid further damage before commitment to S-phase or mitosis. Although cells responding to DNA damage are normally arrested in G1 through a checkpoint mediated by the p53 tumour suppressor, this protein is ineffective in a large proportion of human cancers [5,21]. Thus, only the subsequent S/G2 checkpoint provides 165 p53-defective cancer cells with the opportunity to repair their DNA after IR-induced damage. This checkpoint is mainly regulated by Chk1, a serine/threonine kinase that is activated by ATM in response to DSBs (Figure 2) [5,22].

A large variety of chemical inhibitors of Chk1 have 170 been discovered, of which several are in clinical development [22], but the radiosensitising ability of only a few of them has been documented so far. This is the case for urea-based Chk1 inhibitors identified by Abbott Laboratories [23]. Two of these compounds, A-690002 (7) and 175 A-641397 (8), which displayed little or no single-agent cytotoxic activity, were shown to potentiate the cytotoxicity of IR in p53-deficient cancer cells of different tissue origin but not in p53-proficient cancer cells or primary fibroblasts [24]. Likewise, Chir-124 (9), a quinolinone-based 180 Chk1 inhibitor described by Chiron (now Novartis) [25], was recently shown to abrogate G2/M arrest and to enhance the reduction of clonogenic survival induced by IR in p53 deficient human colon cancer cells [26]. The lead compound of a series of novel aminopyrazole Chk1 inhibi- 185 tors discovered by scientists at Pfizer [27], termed PF-477736 (10), was also found to markedly diminish G2 arrest and clonogenic survival in irradiated human carcinoma cells while exerting little intrinsic cytotoxicity [28]. Moreover, when combined with five daily 3 Gy radiation doses in 190 mice bearing carcinoma xenografts, PF-477736 treatment caused a 2.7-fold enhancement of antitumour efficacy compared to IR alone [28]. This compound has entered a Phase I clinical trial for safety in combination with gemcitabine in patients with advanced solid tumours 195 (NCT00437203) [29].

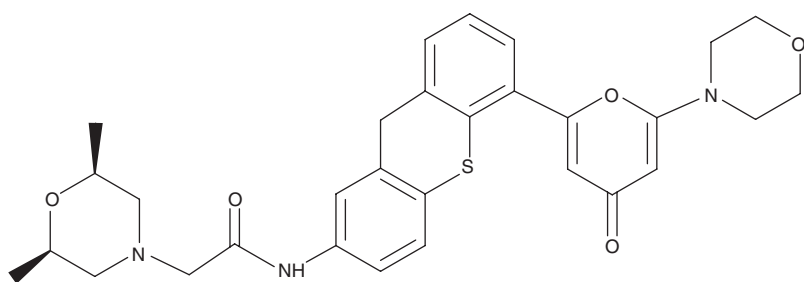
129 Selective inhibitors of DNA-PK were also described by
130 Kudos Pharmaceuticals and Cancer Research Technology [15].
The most potent of them, NU7441 (5), was shown to
radiosensitise several human colon cancer cell lines differing
in their p53 status by delaying DSB repair and causing a
G2-M arrest when added at non cytotoxic concentrations to
135 the cultures [16]. The search for an analogue with improved
pharmaceutical properties led to the identification of
KU-0060648 (6), which exhibits high selectivity for inhibition
of DNA-PK over related kinases and excellent oral
bioavailability [17]. This compound proved able to radiosensitise
140 human squamous carcinoma cells through disruption
of NHEJ-dependent DSB repair [17]. As it preferentially
141



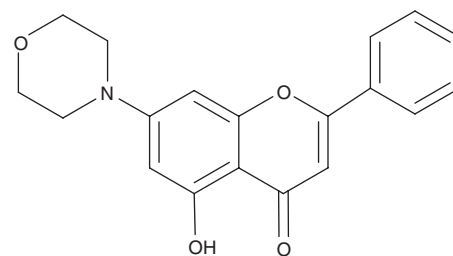
1



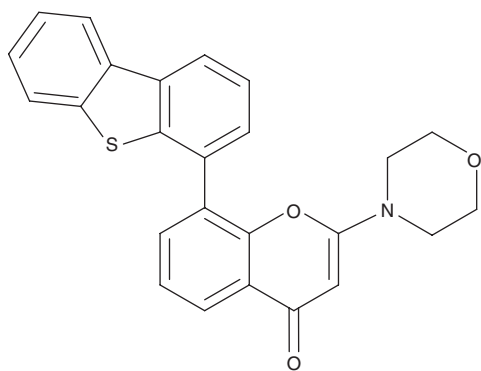
2



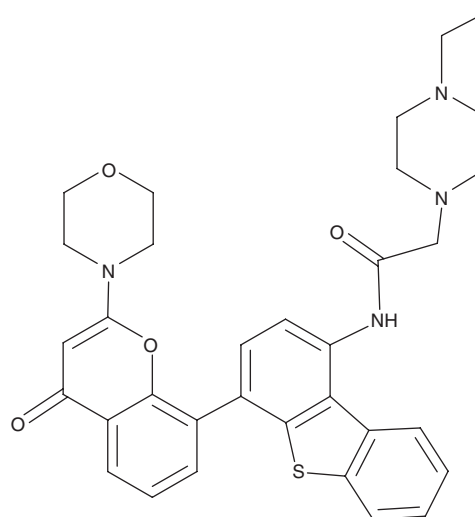
3



4



5



6

2.4 Inhibitors of PARP-1

PARP-1 is a nuclear enzyme that detects SSBs and promotes their repair by the process of base excision [5]. It also participates in the repair of more lethal DSBs through a backup NHEJ pathway in G2 [30]. Early experimental studies indicated that PARP-1 inhibition provides an approach for enhancing tumour radiosensitivity [31,32]. Over the past few years, highly selective and potent inhibitors of this enzyme have been developed [33].

One of the first high-potency PARP-1 inhibitors to be investigated for its radiosensitising activity is AG14361 (11), which proved able to significantly prevent the recovery from potentially lethal damage induced by IR in human colon carcinoma cells at a concentration devoid of intrinsic cytotoxic or growth inhibitory effect [34]. Subsequent characterisation of AG14361 analogues identified a fluorinated derivative, AG14447 (12), exhibiting superior radiosensitising activity *in vitro* [35]. This compound and its water soluble phosphate salt (AG14699) were claimed for use in combination with RT or chemotherapy for the treatment of cancer in a patent application by Pfizer and Cancer Research Technology Ltd [36].

Another potent PARP-1 inhibitor with good oral bioavailability and blood-brain barrier penetration is the benzimidazole-4-carboxamide derivative, ABT-888 (13), discovered by Abbott Laboratories [37]. It was shown to enhance the anticancer activity of IR in colon and lung cancer xenograft models [38] and to radiosensitise human prostate and NSCLC cell lines both under acute hypoxia and normoxic conditions *in vitro* [39]. Abbott Laboratories, therefore, claimed the combination of ABT-888 with RT or other chemotherapeutic agents for cancer treatment [40]. Clinical trials of ABT-888 have been initiated, including a Phase I study combining the compound with RT in patients with brain metastases (NCT00649207) [29]. Orally active PARP-1 inhibitors with adequate brain penetration were also claimed by MGI Pharmaceuticals [41], as exemplified by GPI 15427 (14). A related compound, GPI21016 (E7016, structure not disclosed), was recently shown to radiosensitise glioblastoma cells through inhibition of DNA repair in preclinical models [42].

Also noteworthy is a recent patent application by Cephalon claiming the utility of a proprietary PARP-1 inhibitor for RT enhancement in cancer [43]. This compound, designated CEP-9722 (15), was shown to markedly augment the efficacy of IR against radioresistant human glioblastoma cells growing as xenografts in nude mice [43]. Further studies using this model indicated that CEP-9722 increased the antitumour effect of fractionated RT without potentiating IR-induced toxicity toward bone marrow and intestinal mucosa [44].

3. Targeting epidermal growth factor signalling

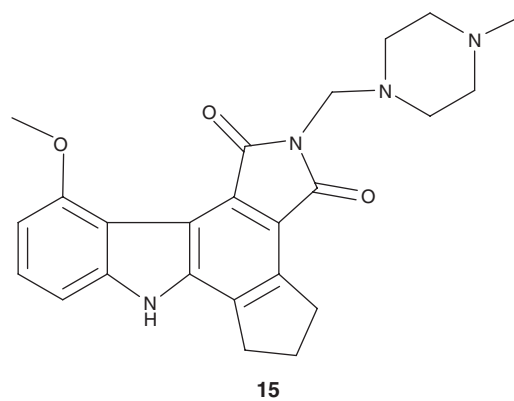
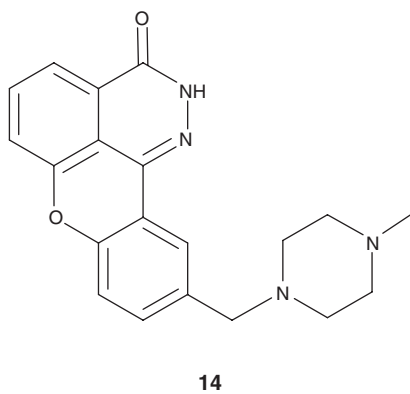
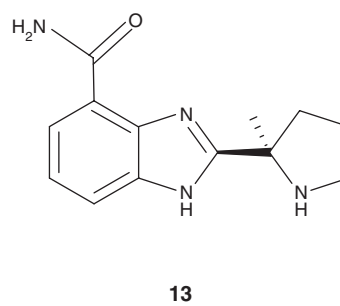
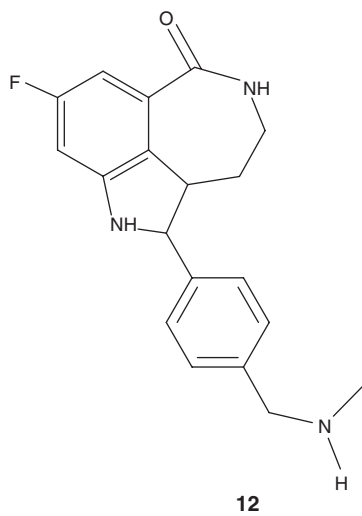
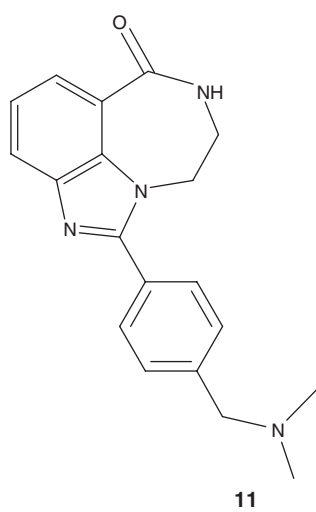
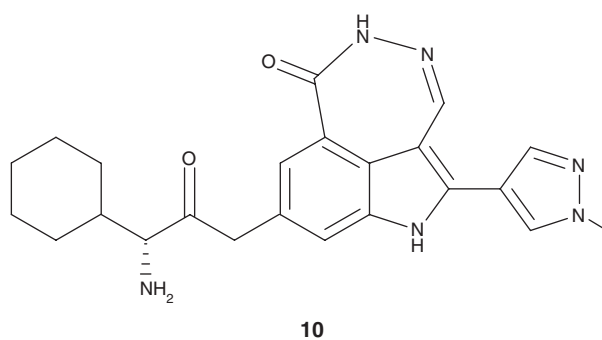
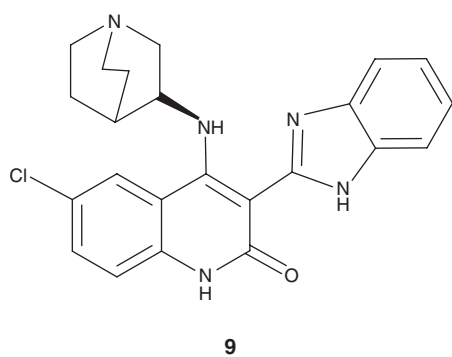
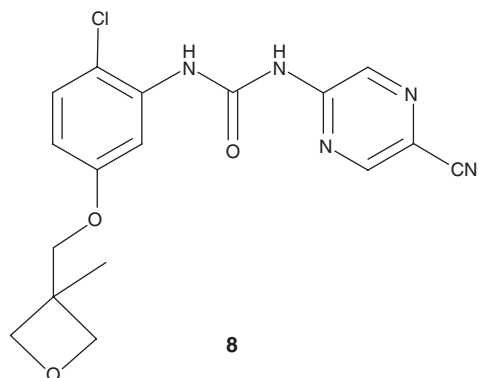
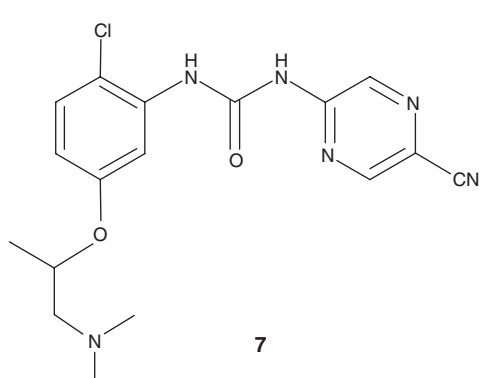
EGFR, a member of the ErbB (HER) family of tyrosine kinase (TK) transmembrane receptors, mediates intracellular

signalling events that contribute to tumour growth and progression (Figure 3) [45]. Elevation of the expression and activity of EGFR is often seen in human tumours of epithelial origin, and frequently correlates with poor clinical outcome and resistance to RT [45]. Furthermore, IR can induce the activation of EGFR as well as its nuclear translocation and interaction with DNA-PK (Figure 3), thereby initiating DNA repair mechanisms of radioprotection in tumour cells [46-48]. Targeting EGRF is thus considered as an attractive strategy for the treatment of cancer, especially in conjunction with RT [45,49].

3.1 Receptor blockade

The radiosensitising ability of EGFR blockade was demonstrated clinically in patients with head and neck squamous-cell carcinoma, where the combination of RT with cetuximab, a mAb directed to the extracellular domain of EGFR, significantly improved locoregional control and survival as compared to RT alone [50]. Currently, there are > 100 clinical studies being conducted to further evaluate cetuximab as an adjunct to RT with or without added chemotherapy for the treatment of a variety of cancers [29]. Using a small molecular weight inhibitor of EGFR TK activity was advocated as an alternative approach to disrupt EGFR signalling for RT enhancement in a patent by Harari and Chinnaiyan [51]. Supporting data showed that the orally active reversible TK inhibitor, erlotinib (16), could block IR-induced EGFR activation and enhance apoptosis in human carcinoma cell lines *in vitro*. When administered before IR, erlotinib also augmented the antitumour response toward human cancer xenografts in an additive or synergistic manner *in vivo* [51]. Numerous clinical trials of erlotinib have been conducted in various cancer types and are still ongoing [29,52]. Because some of the combination trials with standard RT provided little therapeutic gain, in part due to intrinsic or acquired resistance of the tumours to erlotinib, it seems that this approach needs to be supplemented by further anticancer drug treatment to be optimally efficacious [52]. Accordingly, combined treatment with erlotinib and the proteasome inhibitor, bortezomib (17), was claimed to be useful for the treatment of tumours with RT [53]. A patent by OSI Pharmaceuticals also claimed that cotreatment with erlotinib and an inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR), a PIKK enzyme that promotes cell growth and survival in response to growth factors [54], may be advantageous to enhance the efficacy of RT in cancer therapy [55].

An alternative strategy may be provided by irreversible EGFR inhibitors that also suppress the activity of other ErbB receptor family members involved in oncogenesis, such as HER2. One such dual inhibitor, BIBW-2992 (18), proved capable of inducing tumour regression in xenograft and lung cancer models with better efficacy than erlotinib [56]. Boehringer Ingelheim claimed the utility of BIBW-2992 given together with other chemotherapeutic agents and RT for



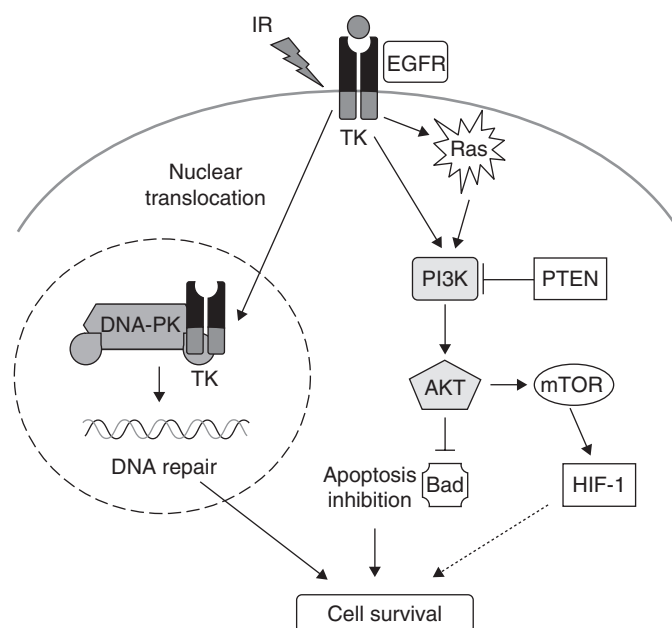


Figure 3. Simplified model of signalling through EGFR and the PI3K/AKT pathway. Stimulation of the transmembrane EGFR and its associated TK by ligand binding or by IR leads to increased PI3K activity, either directly or through Ras. PI3K phosphorylates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to generate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate that then phosphorylates and, thereby, activates the serine/threonine protein kinase AKT. This action of PI3K is opposed by the phosphatase PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10). Activated AKT phosphorylates and regulates the function of many cellular proteins involved in prosurvival processes, including the suppression of IR-induced apoptosis before or after cell cycle arrest. Note that mTOR is regulated by activated AKT and itself regulates the function of hypoxia inducible factor (HIF-1) known to be involved in tumour radioresistance. In addition, IR causes a rapid nuclear translocation of EGFR independently of growth factor binding, resulting in its interaction with DNA-PK and the promotion of DSB repair. The PI3K/AKT pathway can also be constitutively active owing to oncogenic mutations. Overall, activation of EGFR and/or downstream PI3K/AKT signalling, therefore, tends to protect tumour cells from the lethal action of IR.

DNA-PK: DNA-dependent protein kinase; DSB: Double strand DNA break; IR: Ionising radiation; mTOR: Mammalian target of rapamycin; PI3K: Phosphatidylinositol-3-kinase; TK: Tyrosine kinase.

cancer treatment [57]. However, when used alone, this compound exerted only a marginal radiosensitising effect toward human squamous carcinoma cells [58]. This concurs with a number of other studies indicating that the blockade of EGFR signalling by TK inhibitors is less efficacious at enhancing tumour radiosensitivity than antibody-mediated targeting of the receptor [49].

3.2 Disruption of downstream receptor signalling

Among the intracellular pathways recruited by the activation of EGFR and other TK receptors, the signalling cascade comprising PI3K and the serine/threonine kinase, AKT (Figure 3), provides a key cytoprotective and survival mechanism for cancer cells [46,48,54]. It is one of the most frequently altered pathways in solid tumours, owing to aberrant activation of receptor TK or Ras mutation, elevation of PI3K/AKT protein level/activity or loss of function of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10), a PI3K antagonist [54]. Since, as mentioned above, EGFR activity is inducible by IR even in the absence of ligand binding [46,48], PI3K/AKT signalling plays an important role not only in intrinsic but also in acquired tumour radioresistance [59].

Early studies using LY294002 and wortmannin indicated that blocking PI3K function can enhance tumour cell radiosensitivity [59]. More recently, a biologically stable wortmannin analogue, PX-866 (19), claimed as an inhibitor of several PI3K isoforms by Prolex Pharmaceuticals (now Oncothyreon), was shown to augment the antitumour activity of IR when administered for 5 days in a xenograft model of human ovarian cancer [60]. PX-866 has entered a dose escalation Phase I trial to determine its safety when administered orally in patients with advanced solid tumours (NCT00726583) [29]. Another inhibitor of class I PI3K isoforms designated PI-103 (20) [61] was demonstrated to radiosensitise tumour cells with EGFR overexpression or Ras mutations but not untransformed cells with low AKT activity [62]. This compound also increased IR-induced cytotoxicity preferentially in glioma cell lines expressing mutant PTEN as compared to wild-type PTEN [63]. Furthermore, although not efficacious as a single antitumour agent, PI-103 could enhance the antitumour effects of IR in PTEN-mutated glioma xenografts *in vivo* [63]. Current development of several other PI3K inhibitors may provide insight into their potential as clinical radiosensitisers [54,64].

Targeting AKT with small molecule antagonists has also been shown to radiosensitise tumour cell lines *in vitro* [65,66]. A recent study further demonstrated that P529 (21), an AKT inhibitor discovered by Paloma Pharmaceuticals [67], could enhance the antitumour effect of RT by reducing proliferation and increasing apoptosis in xenografts of human prostate cancer cells [68]. Moreover, a patent by the University of Pennsylvania claimed that the HIV protease inhibitor, nelfinavir (22), sensitises tumour cells to IR-induced cytotoxicity by decreasing the phosphorylation of AKT, and thereby its signalling function [69]. Other studies have confirmed the downregulation of AKT by nelfinavir [70], and this drug is now undergoing Phase I/II trials in combination with RT in patients with pancreatic cancer, lung cancer or glioblastoma [29]. It is worth noting that mTOR, an effector of AKT with prosurvival function (Figure 3) [54], may also provide a target for radiosensitisation [71,72].

4. Targeting NF- κ B

The transcription factor NF- κ B is involved in a variety of oncogenic mechanisms and participates in a prosurvival signalling network that contributes to cancer development and progression [73]. NF- κ B activation is characterised by translocation of the factor into the nucleus followed by modulation of gene transcription (Figure 4). It is constitutively elevated in many human cancers and is also upregulated upon irradiation in a pathway linked to ATM activation and through generation of reactive oxygen species leading to cytokine production [73]. As NF- κ B signalling may play a role in both intrinsic and adaptive tumour radioresistance, its inhibition represents an approach for RT enhancement [73]. This was claimed in a patent by Georgetown University showing that the suppression of IR-induced activation of NF- κ B with a dominant negative mutant of its p65 subunit could potentiate the clonogenic survival reduction and apoptotic response induced by IR in human squamous carcinoma cells [74]. Likewise, a patent by the University of California stated that dehydroxymethyl-epoxyquinomicin (23), a compound that blocks NF- κ B nuclear translocation and subsequent transcriptional activity, may be useful to enhance the sensitivity of tumours to anticancer therapies, including RT [75]. Evidence was obtained that a variety of other agents that inhibit NF- κ B activity can radiosensitise cancer cells [76-78]. The suppression of NF- κ B activation through proteasome blockade (Figure 4) may also partly account for the known radiosensitising effect of bortezomib, which is now being evaluated in combination with RT in several clinical trials [29]. Ongoing development of more selective disruptors of NF- κ B activation, such as compounds targeting the inhibitor of κ B kinase (IKK) (Figure 4) [79], is likely to help further define the clinical relevance of NF- κ B in the context of tumour radiosensitisation.

5. Potentiating IR-induced apoptosis

The failure to undergo apoptosis is one of the hallmarks of malignant cell transformation and accounts for the suboptimal response to RT in many cancer cell types [80]. This may reflect alterations in various key elements that control cell death within the intrinsic apoptosis pathway elicited by IR-induced DNA damage (Figure 5). For instance, frequent dysfunctions of p53 can abolish its ability to trigger apoptosis [21]. Moreover, as a consequence or in addition to their upregulation of PI3K/AKT or NF- κ B signalling, tumour cells commonly overexpress certain antiapoptotic proteins, such as members of the Bcl-2 family or of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family [80]. Along with p53, these endogenous apoptosis inhibitors offer potential targets for tumour radiosensitisation.

5.1 Modulators of p53 function

In about 50% of human cancers, the gene encoding p53 is either deleted or mutated, rendering the p53 protein inactive [21]. Several compounds that can reactivate mutant p53 proteins for specific DNA binding, transcriptional activity and induction of apoptosis in human tumour cells have been identified [21]. Among them is PRIMA-1^{met} (24) [81], which was recently demonstrated to radiosensitise prostate cancer cells *in vitro*, even under hypoxia [82].

In cancers bearing wild-type p53, the latter is often inhibited by negative regulators, the most important of which is the Mdm2 (mouse double minute 2) oncoprotein [21]. Agents that bind to Mdm2 and block its interaction with p53 can thus restore p53 function in these cells [21]. This is the case for nutlin-3 (25), the exemplary compound of a series of *cis*-imidazolines discovered by Hoffman La Roche [83], which proved capable of potentiating the cytotoxic effect of IR in human lung cancer cells expressing wild-type p53 by enhancing apoptosis and cell cycle arrest [84]. Nutlin-3 was further shown to radiosensitise prostate cancer cells under hypoxic conditions independently of p53 [85].

5.2 Inhibitors of antiapoptotic Bcl-2 proteins

Antiapoptotic Bcl-2 subfamily members (Bcl-2, Bcl-xl and Mcl-1) are upregulated in many cancers [80]. In recent years, a number of non-peptidic cell permeable small-molecule inhibitors of these proteins have been identified [80]. One such inhibitor, HA14.1 (26), was shown to sensitise radioresistant prostate cancer cells to the cytotoxicity of IR independently of their p53 status [86]. Likewise, the R(-) enantiomer of gossypol (27), a natural product from cotton seeds, which was claimed as an antagonist of Bcl-2 proteins by the University of Michigan, could radiosensitise human prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo* without augmenting systemic toxicity [87]. This compound, developed under the name AT-101 by Ascenta

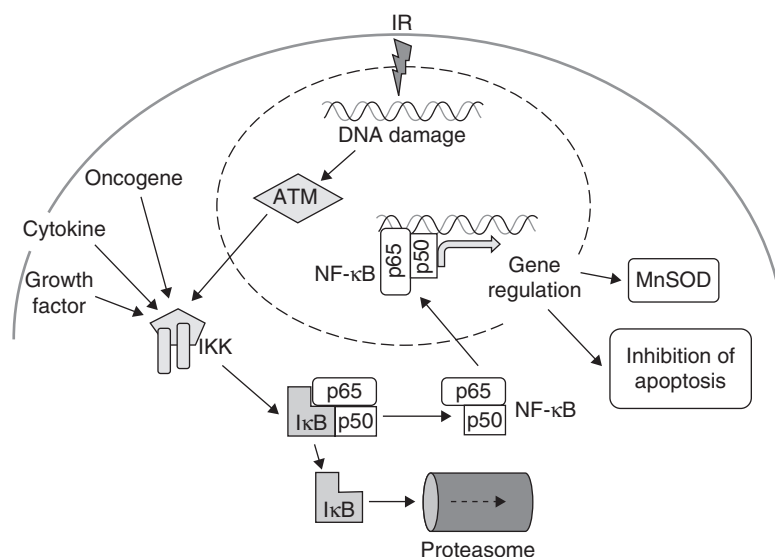


Figure 4. Simplified model of NF- κ B activation (canonical pathway) by IR. NF- κ B is a heterodimeric complex consisting of p50 and p65 subunits. Under resting conditions, this complex resides in the cytoplasm where it is bound to a protein inhibitor of κ B (I κ B) that blocks its nuclear localisation signal. Upon activation, I κ B is phosphorylated by the IKK complex and, thereby, marked for ubiquitination and proteasome degradation. This allows translocation of NF- κ B to the nucleus where it can interact with its target gene promoters, resulting in regulation of IR-effector genes that encode antiapoptotic and cell cycle elements as well as cytoprotective enzymes such as MnSOD. Stimulation of IKK to phosphorylate I κ B can occur through ATM signalling as a result of IR-induced DNA damage as well as by signals from oncogenes, cytokines or growth factor receptors.

ATM: Ataxia telangiectasia mutated; IKK: I κ B kinase; IR: Ionising radiation; MnSOD: Mn superoxide dismutase.

Therapeutics, is being evaluated in several clinical trials, including one in conjunction with RT and temozolomide in glioblastoma patients [29].

Small molecules that mimic the Bcl-2 homology 3 domains of the proapoptotic Bcl-2 family members and thereby act as potent and specific antagonists of Bcl-2/Bcl-xl by binding to their surface hydrophobic grooves have also been synthesised [80]. Among these are compounds discovered by Abbott Laboratories [88], including ABT-737 (28), which was shown to markedly enhance the anticancer effect of IR toward solid tumours in preclinical studies [89], and an orally available analogue, ABT-263 (29), which has entered clinical trials [29].

5.3 IAP antagonists

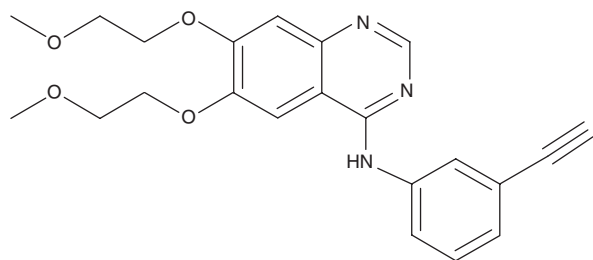
IAP family proteins operate at the downstream effector phase of apoptosis by neutralising caspases through three functional regions referred to as baculovirus IAP repeat (BIR)-1, -2 and -3 domains [80]. The most potent member of this family is X-linked IAP (XIAP), whose overexpression in cancer cells has been correlated with resistance to RT and poor clinical outcome [80].

One way to abolish XIAP activity for RT enhancement in cancer treatment is by means of XIAP antisense oligonucleotides, as claimed in a patent by AVI Biopharma demonstrating that one such oligonucleotide could enhance the cytotoxic effect of IR on human prostate cancer cells *in vitro* [90]. Aegera Therapeutics also described various XIAP antisense

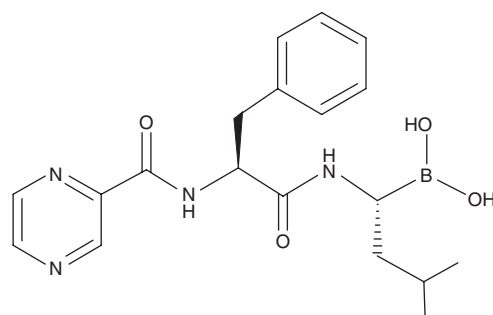
oligonucleotide sequences for use in anticancer therapy [91], one of which (AEG35156) is undergoing clinical trials in patients with solid tumours [29]. XIAP knockdown using siRNA was also shown to enhance apoptosis induced by IR in pancreatic carcinoma cells [92,93].

An alternate approach to target XIAP is based on the existence of a naturally occurring endogenous XIAP inhibitor, called Smac (second mitochondria-derived activator of caspase), a mitochondrial protein that is released into the cytosol upon apoptotic stimuli and blocks the BIR-3 and BIR-2 domains of XIAP [80]. Small molecules mimicking Smac have been designed, knowing that its 4 – 7 N-terminal amino acids are necessary and sufficient for binding to the BIR-3 pocket and preventing XIAP from inhibiting caspase-9 [80]. Of particular interest is SH-130 (30), the lead of a series of such XIAP antagonists discovered by researchers at Michigan University [94,95]. This compound was shown to potently sensitise prostate cancer cells overexpressing XIAP to IR-induced apoptosis *in vitro*. Importantly, it also significantly augmented the efficacy of IR against prostate tumour xenografts without increasing systemic toxicity in mice [96].

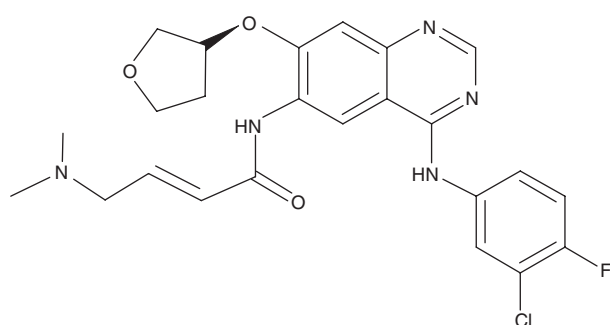
Another type of XIAP inhibitor is represented by polyphenylurea compounds that block the BIR-2 domain of XIAP, resulting in elevated activity of caspase-3 and caspase-7, as discovered by researchers at the Burnham Institute [97]. One such inhibitor, exemplified by 1396 – 11 (31), was shown to potently synergise with IR in killing pancreatic cancer cells *in vitro* [98].



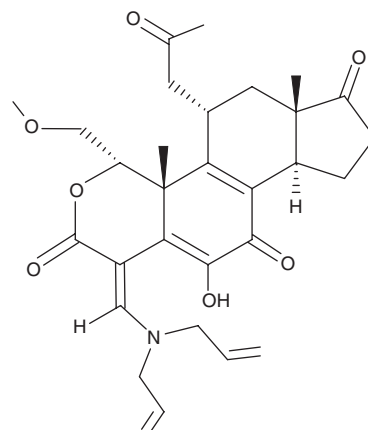
16



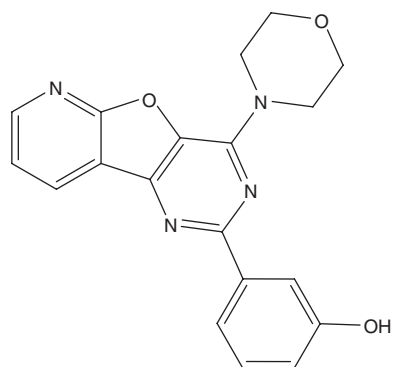
17



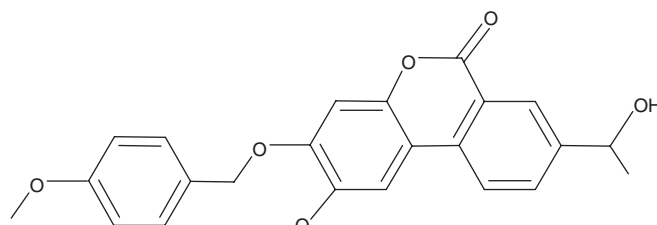
18



19



20



21

5.4 Survivin inhibitors

Survivin is a structurally unique member of the IAP family that acts as a suppressor of apoptosis and also plays a central role in cell division [80,99]. Owing to its massive upregulation in human tumours and its absence in terminally differentiated normal cells, survivin represents an attractive anticancer therapeutic target with potential for RT enhancement [100].

Oligonucleotides inhibiting survivin expression were designed and claimed for the treatment of cancer by Isis Pharmaceuticals and Eli Lilly Co. [101]. The lead compound, LY2181308, which is undergoing clinical evaluation [29], was shown to enhance the antitumour effect of IR in a murine xenograft model of colorectal cancer [102]. A 16-mer locked

nucleic acid oligonucleotide with nuclease stability and high potency for survivin mRNA inhibition (SPC3042), claimed by Santaris Pharma AS, may also provide a tool for tumour radiosensitisation [103].

Because of its structural properties, survivin is not susceptible to Smac-based targeting with small molecule inhibitors [99]. Nevertheless, a compound that ablates the biosynthesis of survivin, YM155 (32), was discovered by scientists at Yamanouchi Pharma (now Attellas Pharma) using a survivin gene promoter assay [104]. YM115 could enhance the antitumour effect of single or fractionated IR in human non-small lung cancer xenografts without causing significant toxicity in mice [105]. Clinical studies of YM115 are being conducted in prostate and lung cancer patients [29].

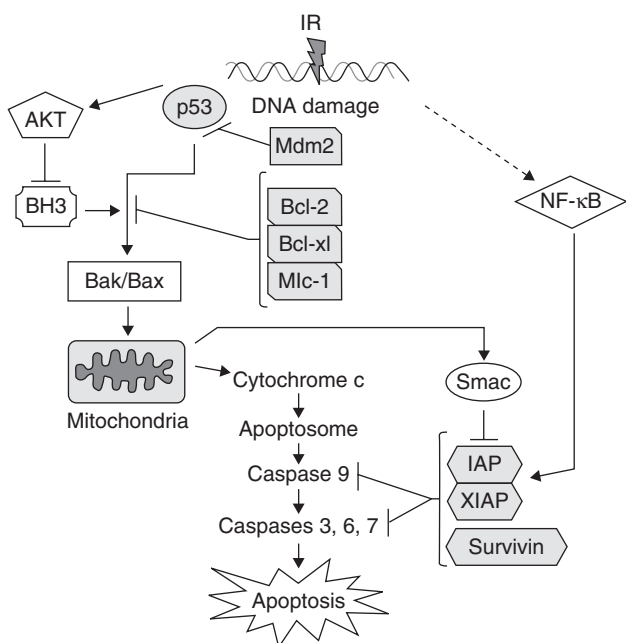


Figure 5. Simplified model of the intrinsic pathway of apoptosis induced by IR. This pathway is mediated by interactions between antiapoptotic and proapoptotic proteins on the mitochondrial surface. It is usually activated following p53-dependent transduction of cellular stress signals such as IR-induced DNA damage and depends on the release of mitochondrial-derived cytochrome c by the proapoptotic Bcl-2 subfamily members Bak (Bcl-2 antagonist killer 1) and Bax (Bcl-2-associated X protein). Entry of cytochrome c into the cytosol results in formation of the apoptosome, a multi-protein complex that serves as a platform for assembly and activation of caspase-9. This, in turn, triggers the downstream effector caspases 3, 6 and 7, leading to apoptosis. Several mechanisms may prevent induction of apoptosis through this pathway. These include a dysfunction of p53 as a result of mutations or of inhibition by the Mdm2 oncoprotein. Upregulation of antiapoptotic Bcl-2 subfamily proteins, including Bcl-2, Bcl-2 related x gene long isoform (Bcl-xl) and myeloid leukaemia cell differentiation protein (Mcl-1), can also inhibit the release of cytochrome c by interacting with Bak and Bax. These antiapoptotic proteins are counteracted by proapoptotic Bcl-2 subfamily members that bear the BH3 domain, such as Bad and Bim. Another level of regulation operates through members of the IAPs, including XIAP and survivin, which block caspase activity. IAPs are themselves regulated by the Smac protein released from the mitochondria, which promotes apoptosis by directly interacting with IAPs and disrupting their ability to inactivate the caspase enzymes.

BH3: Bcl-2 homology 3; IAP: Inhibitor of apoptosis protein; IR: Ionising radiation; Mdm2: Mouse double minute 2; Smac: Second mitochondria-derived activator of caspase.

6. Targeting histone deacetylases

Histone deacetylase (HDAC) enzymes are responsible for deacetylating core nucleosomal histones and other proteins [106]. Cellular treatment with HDAC inhibitors causes histone hyperacetylation, which leads to changes in gene expression influencing cell growth and differentiation, and also modulates the acetylation and activity of numerous

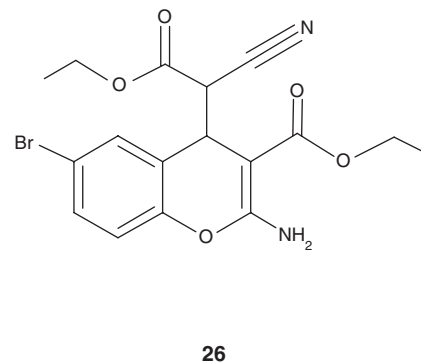
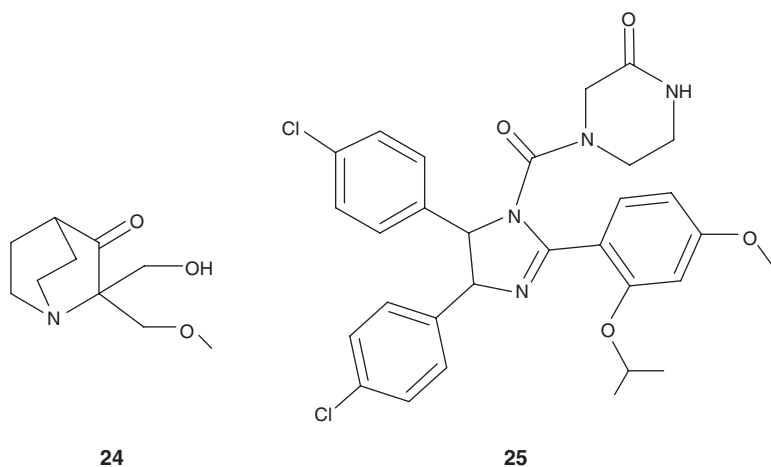
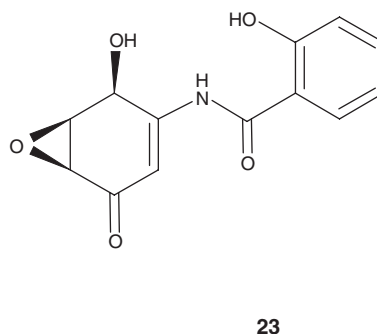
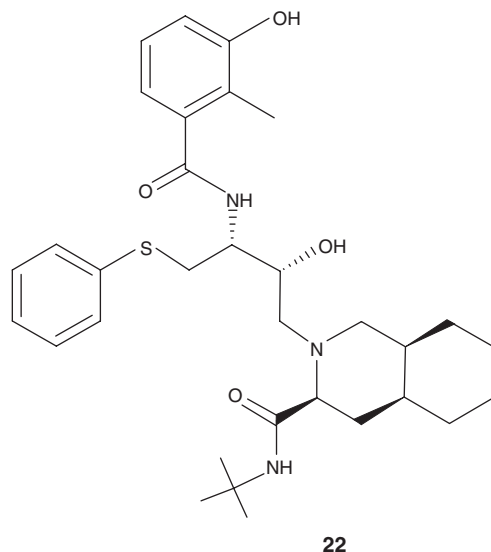
nonhistone targets such as gene transcription factors and key proteins involved in cell cycle progression and cell death induction [106]. As such effects are more pronounced in malignant cells than in normal cells, HDAC inhibitors exert anticancer actions when delivered as single agents or in combination with conventional chemotherapeutics [107]. In addition, mounting preclinical evidence has indicated that HDAC inhibitors can act as effective tumour radiosensitisers by impeding the repair of IR-induced DNA damage and promoting apoptosis [108].

Early studies showing that trichostatin A (33) and other HDAC inhibitors enhance the radiosensitivity of human squamous carcinoma cells led Georgetown University to claim the utility of these compounds as synergistic agents in cancer RT [109]. A similar claim was made by the Sloan Kettering Cancer Institute based on the finding that suberoylanilide hydroxamic acid (34) augments the antiproliferative effect of IR in human prostate cancer cells grown as spheroids [110]. This compound (vorinostat, Merck), which has been approved by the FDA for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma, is undergoing Phase I/II trials in combination with RT alone or with other chemotherapeutics in patients with lung cancer, pelvic cancer or glioblastoma [29]. More recently, Novartis also claimed the combination of a HDAC inhibitor with RT for the treatment of cancer [111]. Supporting data demonstrated that the cinnamic hydroxamic acid analogue, LBH589 (35), could enhance the cytotoxicity of IR in radioresistant human NSCLC cell lines and augment the effect of IR in a xenograft tumour model [111]. Further analysis showed that LBH589 synergised with IR to induce apoptosis in association with increased levels of caspase-3 cleavage and prolonged the duration of IR-induced γ -H2AX foci [112]. A Phase I study of LBH589 in combination with external beam RT has been initiated in patients with prostate, esophageal or head and neck cancer [29].

It is worth noting that differences have been observed in the ability of various HDAC inhibitors to radiosensitise human cancer cells [113]. Although HDAC inhibitors with a broad spectrum of action exhibit substantial radiosensitising activity, the relative contribution of targeting different HDAC classes in this activity remains unclear [113]. Further development and testing of isoform specific HDAC inhibitors may help design more selective radiosensitisers [114].

7. Targeting Hsp90

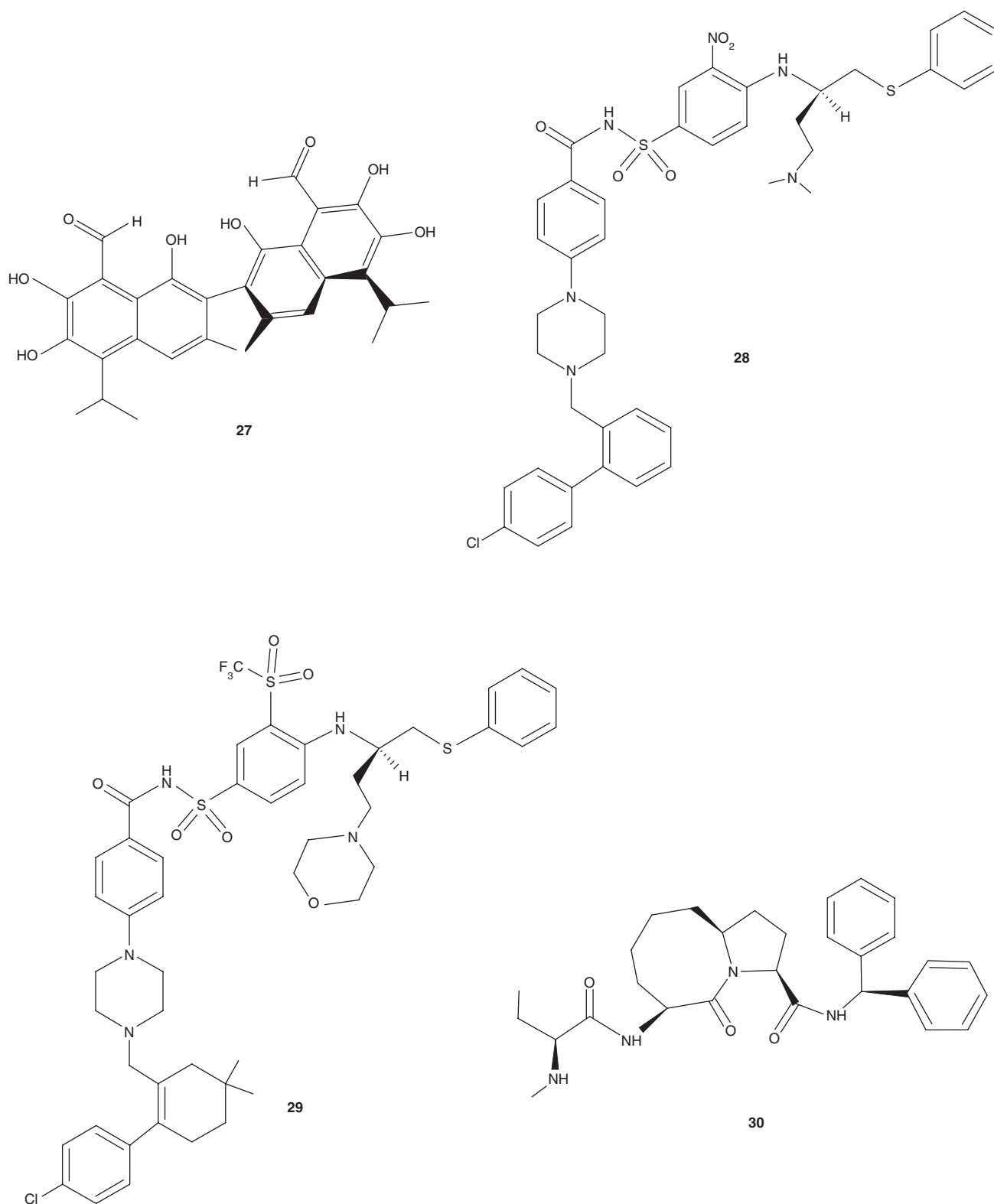
Heat-shock protein (Hsp)90 is an abundant ATP-dependent molecular chaperone that it is overexpressed in malignant cells and plays a critical role in the stabilisation and regulation of a wide variety of proteins implicated in cycle control, gene transcription and apoptotic signalling [115,116]. Hsp90 holds potential as a target for tumour radiosensitisation, as a number of its client proteins have been associated with the radioresponse [117]. Efficient blockade of Hsp90 can be achieved with geldanamycin and analogues, and the use of

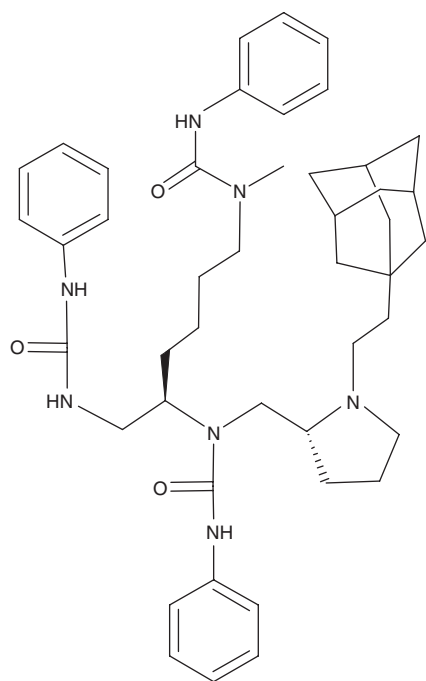


such agents for cancer treatment in combination with RT was first proposed in a patent application by the Van Andel Research Institute [118]. More recent studies showed that the potent Hsp90 antagonist, 17-dimethylethylamino-17-demethoxygeldanamycin (36), could radiosensitize human cancer cells by reducing ATM and DNA-PK activities, thereby inhibiting the repair of IR-induced DSBs [117]. In contrast, this compound did not affect the radiosensitivity of normal fibroblasts [117]. Although geldanamycin analogues have shown promise as anticancer drugs in current clinical trials, they suffer from a number of pharmacologic limitations, which has justified substantial medicinal chemistry efforts to discover alternative structures with potent Hsp90 antagonist properties [119]. Among these are purine-scaffolded derivatives of adenine, such as compound (37), which proved able to radiosensitize glioma cells *in vitro* and to cross the blood-brain barrier and, thus, might be suitable for enhancing RT of brain tumours [120].

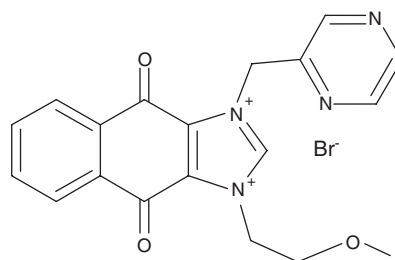
8. Targeting tumour angiogenesis

The vascular system of growing tumours represents an attractive target for anticancer therapy owing to its role in nutrient and oxygen delivery as well as metastasis [121]. It may be attacked either with angiogenesis inhibitors, which interfere with the formation of new blood vessels, or with vascular disrupting agents, which damage established blood vessels [121]. Although angiogenesis inhibitors showed limited success when used alone for advanced malignancy in clinical trials [122], pre-clinical evidence indicated that they may be particularly useful when combined with RT [121,123]. Such inhibitors seem to decrease overall tumour radioresistance not only by breaking the codependent cycle of tumour growth and angiogenesis but also, paradoxically, by improving tumour oxygenation due to elimination of ineffective tumour vessel networks [121,123].

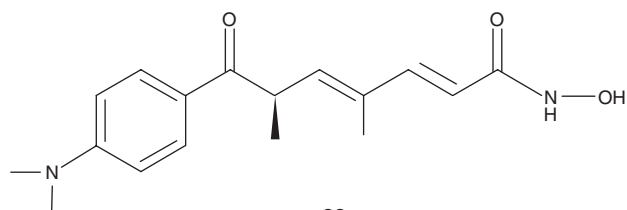




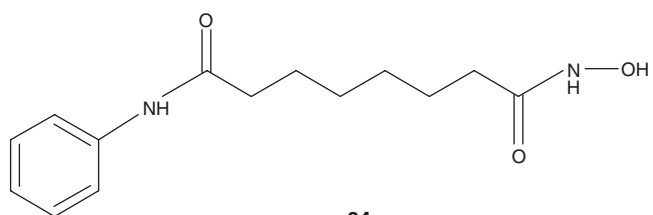
31



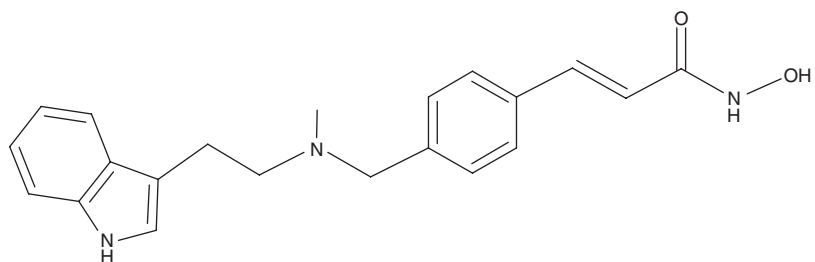
32



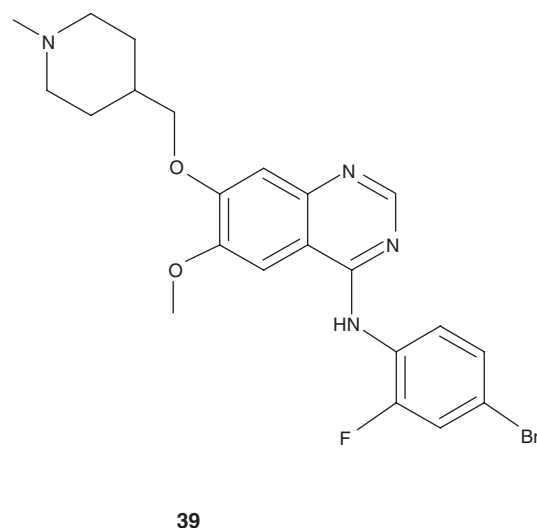
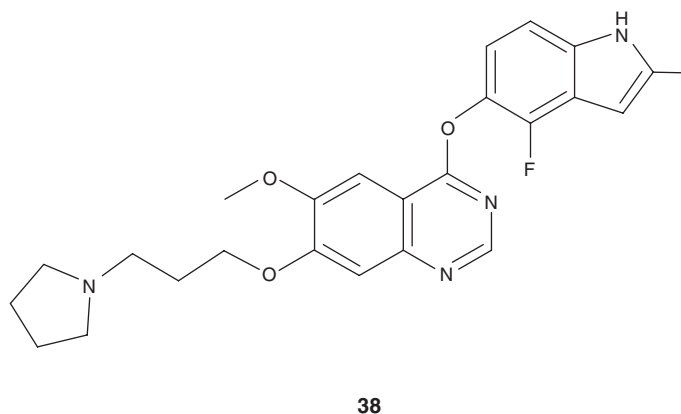
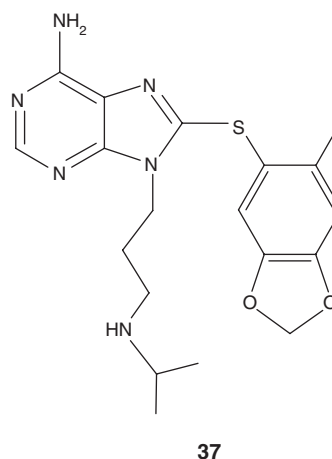
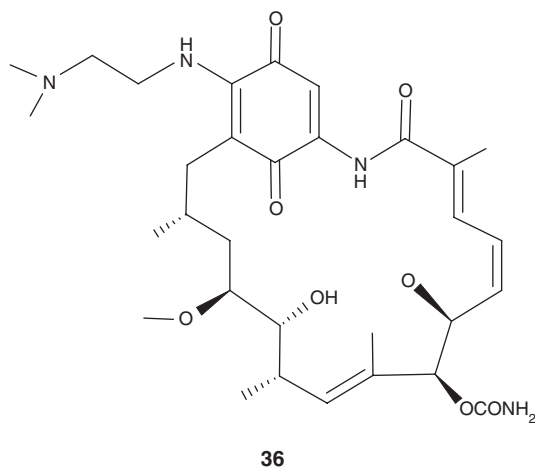
33



34



35



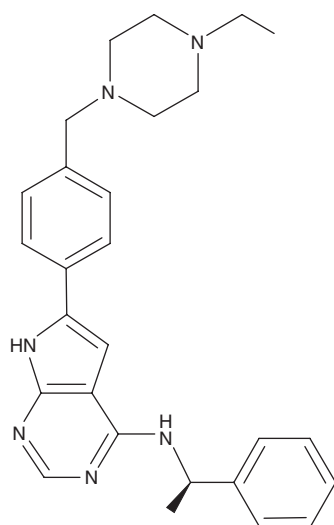
8.1 VEGF inhibitors

One of the best known mediators of tumour angiogenesis is VEGF that acts through its receptor (VEGFR) present in endothelial cells [124]. VEGF is produced by tumour cells in many cancer types, its expression being upregulated by hypoxia through the hypoxia-inducible factor-1 [125] and by EGFR signalling [124]. Exposure of tumour cells to IR also induces the production and release of VEGF, which results in acquired radioresistance [126].

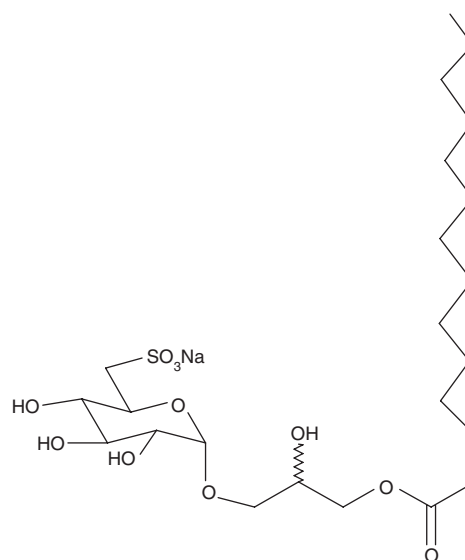
Blocking VEGF action with a soluble antagonist made up of VEGFR extracellular domains fused to the human IgG Fc region (VEGF-Trap) was claimed to be useful for enhancing the efficacy of RT in the treatment of cancer by Regeneron Pharma [127]. Improved control of the growth of human U87 glioblastoma xenografts was demonstrated when single or fractionated doses of IR were administered together with a low dose of VEGF-Trap in mice [128]. VEGF-Trap is undergoing several clinical trials in cancer patients, one of which, a Phase I study initiated in glioblastoma, is to evalu-

ate the compound in combination with RT and temozolomide treatment (NCT00650923) [29]. The humanised anti-VEGF mAb, bevacizumab, was also shown to increase the antitumour effect of IR toward human cancer xenografts in mice [129]. It is now tested for the treatment of cancer in association with RT in several clinical studies [29].

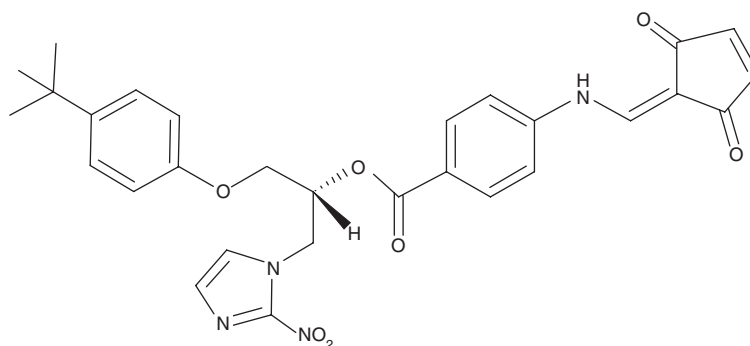
There are also experimental data indicating that pharmacologic inhibitors of VEGFR signalling may provide radiosensitising benefits. In particular, the potent orally active inhibitor of VEGFR TK, cediranib (38), was shown to increase tumour growth delay when given with fractionated RT in lung and colorectal tumour xenograft models [130]. Vandetanib (39), an orally available inhibitor that suppresses the TK activities of both VEGFR and EGFR, was also claimed to be useful for reinforcing the efficacy of RT in the treatment of cancer by AstraZeneca [131]. This compound could radiosensitise lung tumour xenografts in mice, especially when administered sequentially rather than concomitantly with RT [131]. It also potentiated the antitumour



40



41



42

effect of IR in an orthotopic model of human non-small-cell lung adenocarcinoma [132]. Vandetanib is being evaluated in combination with RT for this application in several clinical trials [29]. It is noteworthy that the rationale for concomitant blockade of VEGFR and EGFR to achieve optimal radiosensitisation was further supported by studies using the dual TK inhibitor AEE788 (40) [133] or bevacizumab together with erlotinib [134].

Importantly, similar to EGFR and other TK receptors, prosurvival signalling events downstream of VEGFR involve the PI3K/AKT pathway. Hence, pharmacologic inhibitors of this pathway may radiosensitise not only the malignant cells, as mentioned above, but also the endothelial cells of tumour tissue. Accordingly, a patent by Vanderbilt University disclosed that inhibition of PI3K could augment the cytotoxicity of RT on the tumour vasculature in a glioma model in mice [135]. In addition, inhibition of mTOR was found to

augment the vasculature damage induced by IR in tumour xenografts [72].

8.2 Other angiogenesis inhibitors

Among the newly identified antiangiogenic molecules [122], a few have been claimed as potential radiosensitisers in the recent patent literature.

The sulfoglycolipid, α -sulfoquinovosylmonoacylglycerol (α -SQMG) (41), discovered by scientists at Toyo Suisan Kaisha Ltd [136], was shown to synergistically inhibit angiogenesis when combined with IR by inducing a senescence-like phenotype in vascular endothelial cells [137]. Although treatment of nude mice with α -SQMG at 1 mg/kg did not inhibit the growth of human tumour xenografts when given alone, it produced a pronounced synergistic antitumour effect without any sign of systemic toxicity when combined with various IR dosages [137]. Evidence was obtained that

Table 2. Molecularly targeted agents with documented radiosensitising activity.

Molecular target	Targeting agents	Anticancer activity as single agent	Current development	Related patents
ATM	KU-55933 (1) CP466722 (2) ATM inhibitor (3) NBS-1 peptide	None or little	Preclinical	[8,12,13]
DNA-PK	IC87361 (4) NU7441 (5) KU-0060648 (6) Dbait	None or little	Preclinical	[15,18,19]
Chk-1	A-690002 (7) A-641397 (8) Chir-124 (9) PF-477736 (10)	None or little	PF-477736 in Phase I with gemcitabine	[23,25,27]
PARP-1	AG14361 (11) AG14447 (12) ABT-888 (13) GPI 15427 (14) GPI21016 CEP-9722 (15)	Little to moderate	Phase I of ABT-888 combined with RT in patients with brain metastases	[36,37,40,41,43]
EGFR	Cetuximab Erlotinib (16) BIBW-2992 (18)	Little to moderate	Numerous clinical trials of cetuximab or erlotinib combined with RT	[51,53,55,57]
PI3K	PX-866 (19) PI-103 (20)	Moderate	PX-866 in dose escalation Phase I trial	[60,61,134]
AKT	P529 (21) Nelfinavir (22)	Moderate	Nelfinavir combined with RT in Phase I/II trials	[67,69]
NF-κB	Bortezomib (17) DHMEQ (23)	Moderate	Bortezomib combined with RT in several trials	[74,75]
P53	PRIMA-1 ^{met} (24) Nutlin-3 (25)	Moderate	Preclinical	[81,83]
Bcl-2	HA14.1 (26) R(-)-gossypol (27) ABT-737 (28) ABT-263 (29)	Moderate	ABT-263 in Phase I trials	[87,88]
XIAP	AEG35156 SH-130 (30) 1396-11 (31)	Moderate	AEG35156 in patients with solid tumours	[90,91,94,95,97]
Survivin	LY2181308 SPC3042 YM155 (32)	Moderate	LY2181308 and YM155 are both undergoing clinical evaluation	[101,103,104]
HDAC	Trichostatin A (33) SAHA (34) LBH589 (35)	Moderate	LBH589 combined with RT in Phase I trial	[109-111,114]
Hsp-90	17-DMAG (36) Purine-scaffold inhibitor (37)	Moderate	Geldanamycin analogues are undergoing clinical evaluation. Trials in combination with RT are planned	[118,120]
VEGFR	Bevacizumab VEGF-Trap Cediranib (38) Vandetanib (39) AEE788 (40)	Little to moderate	Vandetanib combined with RT in several clinical trials	[127,131]

RT: Radiotherapy.

Table 3. Overall patent activity related to the molecular targets discussed in this review and possible trends in future development.

Molecular target	Number of related patent applications (2005 – 2008)*	Possible trends in future development of targeting agents
ATM	7	More selective inhibitors, non ATP-competitive inhibitors
DNA-PK	4	More selective inhibitors, non ATP-competitive inhibitors
Chk-1	26	More selective inhibitors, non ATP-competitive inhibitors
PARP-1	43	More selective inhibitors
EGFR	65	TK inhibitors targeting several related receptors
PI3K	35	Isoform specific, allosteric inhibitors
AKT	50	Isoform specific, allosteric inhibitors
NF-κB	19	Selective inhibitors of IKK
P53	29	Activators with improved pharmaceutical properties
Bcl-2	26	More selective inhibitors
XIAP	43	More selective inhibitors
Survivin	9	More selective inhibitors
HDAC	78	Isoform specific inhibitors
Hsp-90	72	Inhibitors selective for activated Hsp-90, agents acting on Hsp-90 cochaperones
VEGFR	31	TK inhibitors targeting several related receptors

*WIPO applications only.

Hsp-90: Heat-shock protein 90; IKK: Inhibitor of κB kinase; TK: Tyrosine kinase.

this remarkable activity of α-SQMG may be linked to a downregulation of the angiopoietin-1 receptor gene [138].

An angiostatic 33mer peptide with an antiparallel β-sheet structure, called anginex, was claimed to be useful as a radiosensitiser for cancer therapy by the University of Minnesota [139]. Its target was identified as galectin-1, a protein crucial for tumour angiogenesis [140]. Anginex synergised with a suboptimal dose of IR in causing the regression of human ovarian carcinoma xenografts in mice [141]. Similar to bevacizumab, it transiently normalised the tumour vasculature to improve oxygen delivery and enhanced the tumour growth delay caused by single dose or fractionated RT administered within this oxygenation window [129].

Another novel antiangiogenic molecule with radiosensitising potential was claimed by Chiba University and Kringle Pharmaceuticals [142]. This molecule, designated NK4, is

composed of the N-terminal hairpin and subsequent four kringle domains of hepatocyte growth factor [143]. It functions both as a competitive antagonist of hepatocyte growth factor binding to its receptor, the c-Met TK, and as an angiogenesis inhibitor [143]. In experimental models of distinct types of cancers, NK4 protein administration or NK4 gene therapy inhibited tumour invasion, metastasis and angiogenesis-dependent tumour growth [143].

An interesting concept that is worth mentioning here, although there is no associated patent publication, concerns the design of hypoxic cell radiosensitisers with antiangiogenic activity as described by Uto *et al.* [144]. A selected 2-nitroimidazole derivative exhibiting such a profile, TX-2036 (42), which behaved as a potent inhibitor of EGFR kinase *in vitro* [144], warrants further *in vivo* evaluation for RT enhancement.

9. Expert opinion

Progresses in molecular oncology have uncovered a plethora of novel therapeutic targets, many of which might be exploited for RT enhancement (Tables 1 and 2). Numerous patents related to these targets have been published during the past 4 years (3), although only a subset of them is examined here. The ability to target well-defined molecular entities should, in principle, increase the specificity of radiosensitisation approaches and mitigate their possible side effects. Because several of these approaches exert suboptimal anticancer effects in absence of IR (Table 2), they bring us closer to the ideal non-toxic radiosensitiser. Many of the agents so far developed are, however, still imperfect. One may anticipate that future efforts aimed at ameliorating the pharmaceutical properties of molecularly targeted drugs (Table 3) will boost their potential utility as clinical radiosensitisers.

Although strategies targeting DNA repair enzymes seem particularly attractive, the possibility that they may alter DNA repair in normal tissues leading to risks of secondary malignancies remains a concern. It is nevertheless encouraging that PARP-1 inhibitors have now reached clinical evaluation that will enable to define their potential role in RT enhancement. Future developments in this area are likely to focus on improving the target selectivity and pharmacodynamic features of the other DNA repair disabling drugs.

A multiplicity of approaches have also been identified toward the promotion of apoptosis, an important form of IR-induced tumour cell demise. The current clinical evaluation of some of them may shape future development efforts and further patent activity. It is worth noting, however, that alternative forms of cell death, such as senescence, mitotic catastrophe and autophagy may also play a role in IR-induced cytotoxicity. Continuing research should determine whether these processes are amenable to pharmacologic modulation for RT enhancement, which might be reflected in future patent activity.

Agents that disrupt signal transduction pathways mediating tumour radioresistance also seem promising. Many of these are kinase inhibitors that may enhance IR effects not only in tumour cells but also in the tumour vasculature. However, because their target molecules often exert pleiotropic functions in a variety of other cell types, this may result in mechanism-based toxicities. Furthermore, most currently available kinase inhibitors act by blocking the ATP-binding pockets of the enzymes, which can be structurally similar in different kinases, and thus suffer from a lack of specificity associated with cross-reactivity and potential off-target side effects. Efforts to develop antagonists acting allosterically at sites distant from the catalytic domain may help achieve greater selectivity against isoforms or mutated versions of the enzymes that are preferentially expressed in malignant cells. Paradoxically, however, current data indicate that in the case of TK inhibitors, crossreactivity may be desirable so as to concurrently inactivate related members of growth factor receptors, given the redundancy of these

factors in promoting tumour cell survival and radioresistance. Therefore, both highly specific and multitargeted kinase inhibitors may prove advantageous for RT enhancement depending on the cancer type.

Owing to their roles in regulating the function of several molecules involved in tumour radioresistance, both HDAC and Hsp-90, as well as p53, represent appealing targets for RT enhancement (Table 1). Their pharmacologic modulation may help accomplish what many other molecularly targeted drugs do not, namely the simultaneous disruption of several pathways of radioresistance. Although drugs directed at these master regulators may produce unwanted side effects when used at effective doses for monotherapy, their use as adjuncts to RT may allow for dose reduction that minimises such side effects. Clinical trials need to be designed to specifically address this possibility. While it is likely that advances in pharmacogenomics will help tailor specific therapies according to the mutational status of tumour cells, economic considerations may favour reagents with the broadest spectrum of radiosensitising activity, as might be provided by these multitarget approaches.

It is also important to note that, so far, few preclinical studies of molecularly targeted agents have been conducted in hypoxic cells [39,82,85]. Yet, there is evidence that hypoxia can affect DNA repair pathways and also select for p53-deficient cells capable of withstanding apoptotic stimuli [145]. Moreover, acute versus chronic hypoxia may lead to different biology within the tumour microenvironment, which may affect the response to targeted drugs [145]. Therefore, further studies to address these issues are clearly needed. This may lead to new ways for depleting tumours of radioresistant hypoxic cells. Novel agents merging the older methodologies of hypoxic cell radiosensitisers or bioreductive cytotoxins with molecularly targeted approaches may prove particularly useful in this context. On the other hand, the potential utility of these approaches as adjuncts to heavy-ion RT, which is known to alleviate hypoxia-driven tumour radioresistance [146], also deserves to be investigated in future studies.

Finally, it must be appreciated that clinical trials for radiosensitisers face the challenge of appropriate scheduling to adjust the timing of single dose or fractionated IR with the drug's pharmacokinetic/pharmacodynamic profile. Preclinical *in vivo* models that evaluate such parameters, as well as surrogate tests of efficacy, therefore need to be developed for more accurate selection of clinical candidates. Notwithstanding these difficulties, one may hope that among the many therapeutic options now offered by molecularly targeted approaches, a few will succeed in the clinics such that novel radiosensitisers that are both efficacious and safe as well cost-effective may become available in the near future.

Declaration of interest

This study was supported in part by a grant from Électricité de France (Comité de Radioprotection, RB 2009-04).

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as either of interest (•) or of considerable interest (••) to readers.

1. Wardman P. Chemical radiosensitizers for use in radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2007;19:397-417
2. Oehler C, Dickinson DJ, Broggin-Tenzer A, et al. Current concepts for the combined treatment modality of ionizing radiation with anticancer agents. *Curr Pharm Des* 2007;13:519-35
3. Bischoff P, Altmeyer A, Dumont F. Radiosensitizing agents for the radiotherapy of cancer: advances in traditional and hypoxia targeted radiosensitizers. *Expert Opin Ther Patents* 2009;19(5):643-662
4. Jeggo P, Löbrich M. Radiation-induced DNA damage responses. *Radiat Prot Dosimetry* 2006;122:124-7
5. O'Connor MJ, Martin NM, Smith GC. Targeted cancer therapies based on the inhibition of DNA strand break repair. *Oncogene* 2007;26:7816-24
- Overview of anticancer therapeutic strategies targeting molecular components of DNA strand break repair that may be applicable to tumour radiosensitisation.
6. Helleday T, Petermann E, Lundin C, et al. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2008;8:193-204
7. Cann KL, Hicks GG. Regulation of the cellular DNA double-strand break response. *Biochem Cell Biol* 2007;85:663-74
8. Kudos Pharmaceuticals Ltd. Aminopyrones and their use as ATM inhibitors. WO2005016919; 2005
9. Hickson I, Zhao Y, Richardson CJ, et al. Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Res* 2004;64:9152-9
10. Cowell IG, Durkacz BW, Tilby MJ. Sensitization of breast carcinoma cells to ionizing radiation by small molecule inhibitors of DNA-dependent protein kinase and ataxia telangiectasia mutated. *Biochem Pharmacol* 2005;71:13-20
11. Rainey MD, Charlton ME, Stanton RV, et al. Transient inhibition of ATM kinase is sufficient to enhance cellular sensitivity to ionizing radiation. *Cancer Res* 2008;68:7466-74
- Demonstrates that short-term (4 h or less) pharmacological inhibition of ATM kinase activity at the time of irradiation is sufficient to radiosensitise tumour cells *in vitro*.
12. Kudos Pharmaceuticals Ltd. ATM inhibitor. WO2007026157; 2007
13. Southern Research Institute. Targeting NBS1-ATM interaction to sensitize cancer cells to radiotherapy and chemotherapy. WO2008054726; 2008
14. Shinohara ET, Geng L, Tan J, et al. DNA-dependent protein kinase is a molecular target for the development of noncytotoxic radiation-sensitizing drugs. *Cancer Res* 2005;65:4987-92
15. Kudos Pharmaceuticals Ltd, Cancer Rec Tech Ltd. DNA-PK inhibitors. WO2006109081; 2006
16. Zhao Y, Thomas HD, Batey MA, et al. Preclinical evaluation of a potent novel DNA-dependent protein kinase inhibitor NU7441. *Cancer Res* 2006;66:5354-62
17. Albertella MR, Slade A, Shea KE, et al. Potent *in vitro* and *in vivo* radiosensitisation by the selective DNA-dependent protein kinase inhibitor KU-0060648 [abstract 4080]. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2008;49
18. Kudos Pharmaceuticals Ltd, Cancer Rec Tech Ltd. Use of DNA-PK inhibition to sensitise ATM-deficient cancers to DNA-damaging cancer therapies. WO2006126010; 2006
19. Institut Curie, Centre National de la Recherche Scientifique. Dbait and uses thereof. WO2008034866; 2008
20. Quanz M, Berthault N, Roulin C, et al. Small-molecule drugs mimicking DNA damage: a new strategy for sensitizing tumors to radiotherapy. *Clin Cancer Res* 2009;15:1308-16
- Demonstrates that short dsDNA molecules (DBaits) that mimic DSBs could inhibit DNA repair after IR exposure and could effectively radiosensitise different types of radioresistant tumours grown as xenografts in mice.
21. Beretta GL, Gatti L, Benedetti V, et al. Small molecules targeting p53 to improve antitumor therapy. *Mini Rev Med Chem* 2008;8:856-68
22. Janetka JW, Ashwell S, Zabudoff S, et al. Inhibitors of checkpoint kinases: from discovery to the clinic. *Curr Opin Drug Discov Dev* 2007;10:473-86
- Reviews the large diversity of chemical inhibitors of Chk1 currently identified and discusses their potential use for sensitising tumours to DNA-damaging agents.
23. Abbott Laboratories. Urea derivatives as kinase inhibitors. EP1534692; 2005
24. Chen Z, Xiao Z, Gu WZ, et al. Selective Chk1 inhibitors differentially sensitize p53-deficient cancer cells to cancer therapeutics. *Int J Cancer* 2006;119:2784-94
25. Chiron Corporation. Combination therapy with CHK1 inhibitors. US2005256157; 2005
26. Tao Y, Leteur C, Yang C, et al. Radiosensitization by Chir-124, a selective CHK1 inhibitor: Effects of p53 and cell cycle checkpoints. *Cell Cycle* 2009;8:1196-205
27. Pfizer Inc. Aminopyrazole compounds and use as Chk1 inhibitors. WO2005009435; 2005
28. Cullinan C, Raleigh J, Anderes K, et al. Mechanisms of radiation enhancement by the CHK1 inhibitor PF-477736 [abstract 5386]. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2007;48
29. Clinical Trials. Available from: www.clinicaltrials.gov.
30. Wu W, Wang M, Wu W, et al. Repair of radiation induced DNA double strand breaks by backup NHEJ is enhanced in G2. *DNA Repair* 2008;7:329-38
31. Weltin D, Holl V, Hyun JW, et al. Effect of 6(5H)-phenanthridinone, a poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor, and ionizing radiation on the growth of cultured lymphoma cells. *Int J Radiat Biol* 1997;72:685-92
32. Chalmers AJ. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and ionizing radiation: sensor, signaller and therapeutic target. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2004;16:29-39
- Reviews the role of PARP-1 in the detection and repair of DNA strand breaks and outlines the rationale for therapeutic application of PARP-1 inhibitors in tumour radiosensitisation.
33. Ratnam K, Low JA. Current development of clinical inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase in oncology. *Clin Cancer Res* 2007;13:1383-8
34. Calabrese CR, Almassy R, Barton S, et al. Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:56-67

35. Thomas HD, Calabrese CR, Batey MA, et al. Preclinical selection of a novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor for clinical trial. *Mol Cancer Ther* 2007;6:945-56
- Shows that *in vitro* evaluation of PARP inhibitors needs to be complemented by *in vivo* xenograft studies to select for the most efficacious compound in terms of its ability to sensitise tumour cells to DNA-damaging therapies, including RT. This screening protocol led to the identification of the phosphate salt of AG14361 (AG014699) as a clinical trial candidate.
36. Pfizer, Cancer Research Technology Ltd. Therapeutic combinations comprising poly(ADP-ribose) polymerases inhibitor. WO2006033006; 2006
37. Abbott Laboratories. 1H-benzimidazole-4-carboxamides substituted with a quaternary carbon at the 2-position are potent PARP inhibitors. WO2006110816; 2006
38. Donawho CK, Luo Y, Luo Y, et al. ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models. *Clin Cancer Res* 2007;13:2728-37
- Provides experimental evidence that ABT-888 potentiated the antitumour effect of IR in a colon carcinoma xenograft model.
39. Liu SK, Coackley C, Krause M, et al. A novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, ABT-888, radiosensitizes malignant human cell lines under hypoxia. *Radiother Oncol* 2008;88:258-68
- Shows that ABT-888 was able to radiosensitise human prostate and lung cancer cell lines under condition of acute hypoxia *in vitro*.
40. Abbott Laboratories. Combination therapy with PARP inhibitors. WO2007084532; 2007
41. MGI GP Inc. Compounds, methods and pharmaceutical compositions for inhibiting PARP. US2008058325; 2008
42. Russo AL, Kwon HC, Burgan WE, et al. In vitro and in vivo radiosensitization of glioblastoma cells by the poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor E7016. *Clin Cancer Res* 2009;15:607-12
43. Cephalon Inc. Method of radio-sensitizing tumors using a radio-sensitizing agent. WO2008063644; 2008
44. Burd R, Limesand K, Lavorgna S, et al. The selective PARP inhibitor, CEP-9722, exhibits significant radiosensitization against radioresistant U87 human glioblastoma xenografts and does not potentiate radiation-induced normal tissue toxicity [abstract 42114]. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2008;49
45. Bianco R, Gelardi T, Damiano V, et al. Rational bases for the development of EGFR inhibitors for cancer treatment. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:1416-31
46. Valerie K, Yacoub A, Hagan MP, et al. Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in. *Mol Cancer Ther* 2007;6:789-801
- This review summarises the current knowledge on the mechanisms through which IR can activate EGFR and other TK receptors, leading to activation of cytoprotective downstream signalling pathways that mediate apoptosis inhibition and tumour cell survival/proliferation.
47. Chen DJ, Nirodi CS. The epidermal growth factor receptor: a role in repair of radiation-induced DNA damage. *Clin Cancer Res* 2007;13:6555-60
- Discusses the evidence that IR induces the nuclear translocation of EGFR and its interaction with DNA-PK, thereby promoting the repair of IR-induced DNA damage.
48. Rodemann HP, Dittmann K, Toulany M. Radiation-induced EGFR-signaling and control of DNA-damage repair. *Int J Radiat Biol* 2007;83:781-91
49. Baumann M, Krause M, Dikomey E, et al. EGFR-targeted anti-cancer drugs in radiotherapy: preclinical evaluation of mechanisms. *Radiother Oncol* 2007;83:238-48
- Reviews preclinical data suggesting that antibody-mediated blockade of EGFR is more efficient at enhancing local tumour control by fractionated RT than is the targeting of EGFR TK activity by a chemical inhibitor.
50. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006;354:567-78
51. Harari PM, Chinnaiyan P. Combined treatment with radiation and an epidermal growth factor receptor kinase inhibitor. WO2006110176; 2006
52. Magné N, Chargari C, Castadot P, et al. The efficacy and toxicity of EGFR in the settings of radiotherapy: Focus on published clinical trials. *Eur J Cancer* 2008;44:2133-43
53. Piperdi B. Combined treatment with bortezomib and an epidermal growth factor receptor inhibitor. WO2006110175; 2006
54. LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat* 2008;11:32-50
55. OSI Pharmaceuticals Inc. Combined treatment with an EGFR kinase inhibitor and an agent that sensitizes tumor cells to the effects of EGFR kinase inhibitors. WO2007106503; 2007
56. Li D, Ambrogio L, Shimamura T, et al. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* 2008;27:4702-11
57. Boehringer Ingelheim Int, Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals. Combination treatment of cancer comprising EGFR/HER2 inhibitors. WO2007054551; 2007
58. Schütze C, Dörfler A, Eicheler W, et al. Combination of EGFR/HER2 tyrosine kinase inhibition by BIBW 2992 and BIBW 2669 with irradiation in FaDu human squamous cell carcinoma. *Strahlenther Onkol* 2007;183:256-64
59. Bussink J, van der Kogel AJ, Kaanders JH. Activation of the PI3-K/AKT pathway and implications for radioresistance mechanisms in head and neck cancer. *Lancet Oncol* 2008;9:288-96
60. Prox Pharmaceuticals Corp, University of Arizona, University of Pittsburgh. Wortmannin analogs and methods of using same in combination with chemotherapeutic agents. WO2007008200; 2007
61. Hayakawa M, Kaizawa H, Morimoto H, et al. Fused heterolaryl derivatives. US7173029; 2007
62. Prevo R, Deutsch E, Sampson O, et al. Class I PI3 kinase inhibition by the pyridinylfuranopyrimidine inhibitor PI-103 enhances tumor radiosensitivity. *Cancer Res* 2008;68:5915-23
- Demonstrates that the PI3K inhibitor, PI-103, could sensitise various tumour cell lines to the cytotoxicity of IR by increasing the persistence of IR-induced DNA damage.

63. Chen JS, Zhou LJ, Entin-Meer M, et al. Characterization of structurally distinct, isoform-selective phosphoinositide 3'-kinase inhibitors in combination with radiation in the treatment of glioblastoma. *Mol Cancer Ther* 2008;7:841-50
- Shows that PI-103 could enhance the antitumour effect of IR against glioblastoma xenografts.
64. Ihle NT, Powis G. Take your PIK: phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors race through the clinic and toward cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 2009;8:1-9
65. Fujiwara K, Iwado E, Mills GB, et al. Akt inhibitor shows anticancer and radiosensitizing effects in malignant glioma cells by inducing autophagy. *Int J Oncol* 2007;31:753-60
66. Toulany M, Kehlbach R, Florczak U, et al. Targeting of AKT1 enhances radiation toxicity of human tumor cells by inhibiting DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair. *Mol Cancer Ther* 2008;7:1772-81
67. Paloma Pharmaceuticals, Inc. Compositions and methods to treat skin diseases characterized by cellular proliferation and angiogenesis. WO2007133249; 2007
68. Diaz R, Nguewa PA, Diaz-Gonzalez JA, et al. The novel Akt inhibitor Palomid 529 (P529) enhances the effect of radiotherapy in prostate cancer. *Br J Cancer* 2009;100:932-40
- Shows that P529 potentiated IR-induced growth arrest in an aggressive prostate cancer cell line mainly through AKT inhibition and enhanced the antitumour effect of RT *in vivo* by reducing proliferation and promoting apoptosis.
69. Trustees of the University of Pennsylvania. The use of nelfinavir as a radiation sensitizer. WO2006044808; 2006
70. Plastaras JP, Vapiwala N, Ahmed MS, et al. Validation and toxicity of PI3K/Akt pathway inhibition by HIV protease inhibitors in humans. *Cancer Biol Ther* 2008;7:628-35
71. Albert JM, Kim KW, Cao C, et al. Targeting the Akt/mammalian target of rapamycin pathway for radiosensitization of breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2006;5:1183-9
72. Murphy JD, Spalding AC, Somnay YR, et al. Inhibition of mTOR radiosensitizes soft tissue sarcoma and tumor vasculature. *Clin Cancer Res* 2009;15:589-96
73. Ahmed KM, Li JJ. NF-kappa B-mediated adaptive resistance to ionizing radiation. *Free Radic Biol Med* 2008;44:1-13
- This review discusses the role of NF-kB in mediating tumour radioresistance and how activation of this transcription factor by IR leads to NF-kB activation. Key elements within the NF-kB prosurvival network may thus represent novel targets for radiosensitisation of tumour cells.
74. Georgetown University. The p65 subunit of NF-KB for the radiosensitization of cells US2005287158; 2005
75. University of California. DHMEQ as a sensitizing agent for chemotherapy and immunotherapy of resistant cancer cells. WO2006060819; 2006
76. Sun Y, St Clair DK, Fang F, et al. The radiosensitization effect of parthenolide in prostate cancer cells is mediated by nuclear factor-kappaB inhibition and enhanced by the presence of PTEN. *Mol Cancer Ther* 2007;6:2477-86
77. Tamatani T, Azuma M, Motegi K, et al. Cepharanthin-enhanced radiosensitivity through the inhibition of radiation-induced nuclear factor-kappaB activity in human oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol* 2007;31:761-8
78. Xu Y, Fang F, St Clair DK, et al. SN52, a novel nuclear factor-kappaB inhibitor, blocks nuclear import of RelB:p52 dimer and sensitizes prostate cancer cells to ionizing radiation. *Mol Cancer Ther* 2008;7:2367-76
- Shows that a cell permeable peptide (SN52) could inhibit IR-induced NF-kB activation and radiosensitize prostate a clinically relevant IR doses *in vitro*.
79. Lee DF, Hung MC. Advances in targeting IKK and IKK-related kinases for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2008;14:5656-62
80. Call JA, Eckhardt SG, Camidge DR. Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment. *Lancet Oncol* 2008;9:1002-11
- Provides an overview of the mechanisms through which tumour cells may elude apoptosis and of the various molecular components of these mechanisms that may serve as targets for enhancing IR-induced apoptosis.
81. Aprea AB. 1-Azabicyclo [2,2,2] octan-3-one derivatives. US2005090540; 2005
82. Supiot S, Zhao H, Wiman K, et al. PRIMA-1(met) radiosensitizes prostate cancer cells independent of their MTP53-status. *Radiother Oncol* 2008;86:407-11
- Shows that PRIMA-1met could radiosensitize p53-deficient prostate cancer cells under both normoxic and hypoxic conditions *in vitro*.
83. Hoffmann La Roche. Novel cis-imidazolines. WO2005110996; 2005
84. Cao C, Shinohara ET, Subhawong TK, et al. Radiosensitization of lung cancer by nutlin, an inhibitor of murine double minute 2. *Mol Cancer Ther* 2006;5:411-7
85. Supiot S, Hill RP, Bristow RG. Nutlin-3 radiosensitizes hypoxic prostate cancer cells independent of p53. *Mol Cancer Ther* 2008;7:993-9
- Similar to PRIMA-1met, Nutlin-3 could radiosensitize prostate cancer cells under both normoxia and hypoxia independently of their p53 status.
86. An J, Chervin AS, Nie A, et al. Overcoming the radioresistance of prostate cancer cells with a novel Bcl-2 inhibitor. *Oncogene* 2007;26:652-61
- Demonstrates that treatment of radioresistant prostate cancer cells with a minimally cytotoxic concentration of the Bcl-2 inhibitor HA14-1 markedly enhanced their apoptotic response to IR, regardless of their p53 status.
87. University of Michigan, University of Georgetown Medical Center. Small molecule antagonists of Bcl-2 family proteins. WO2005069771; 2005
88. Abbott Laboratories. Apoptosis promoters. WO2006127364; 2006
89. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 2005;435:677-81
90. AVI Biopharma Inc. Method and antisense compound for potentiating anti-cancer agents. WO2005047465; 2005
91. Aegera Therapeutics Inc. Antisense IAP nucleobase oligomers and uses thereof. US7091333; 2006
92. Giagkousiklidis S, Vellanki SH, Debatin KM, et al. Sensitization of pancreatic carcinoma cells for gamma-irradiation-induced apoptosis by XIAP inhibition. *Oncogene* 2007;26:7006-16

93. Ohnishi K, Nagata Y, Takahashi A, et al. Effective enhancement of X-ray-induced apoptosis in human cancer cells with mutated p53 by siRNA targeting XIAP. *Oncol Rep* 2008;20:57-61
94. University of Michigan. Smac peptidomimetics and uses thereof. WO2005069888; 2005
95. University of Michigan. Conformationally constrained Smac mimetics and the uses thereof. WO2006010118; 2006
96. Dai Y, Liu M, Tang W, et al. Molecularly targeted radiosensitization of human prostate cancer by modulating inhibitor of apoptosis. *Clin Cancer Res* 2008; 14:7701-10
 - **Shows that the IAP antagonist SH-130 markedly enhanced IR-induced apoptosis in radioresistant prostate cancer cells overexpressing IAP and potentially radiosensitised the same cells grown as xenografts in mice without increasing systemic toxicity.**
97. Burnham Institute, Torrey Pines Institute for Molecular Studies. Methods and compositions for derepression of IAP-inhibited caspase. US20050119176; 2005
98. Karikari CA, Roy I, Tryggstad E, et al. Targeting the apoptotic machinery in pancreatic cancers using small-molecule antagonists of the X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Mol Cancer Ther* 2007;6:957-66
 - **Demonstrates that an XIAP antagonist (1396-11) could synergise with IR in markedly reducing the clonogenic survival of pancreatic cancer cells *in vitro*.**
99. Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer* 2008;8:61-70
100. Capalbo G, Rödel C, Stauber RH, et al. The role of survivin for radiation therapy. Prognostic and predictive factor and therapeutic target. *Strahlenther Onkol* 2007;183:593-9
 - **This review discusses the rationale for targeting survivin as a strategy to improve the effectiveness of RT in the treatment of cancer.**
101. Isis Pharmaceuticals Inc, Eli Lilly Co. Modulation of survivin expression. WO2005002507; 2005
102. Rödel F, Frey B, Leitmann W, et al. Survivin antisense oligonucleotides effectively radiosensitize colorectal cancer cells in both tissue culture and murine xenograft models. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008;71:247-55
 - **Demonstrates that antisense oligonucleotide-mediated inhibition of survivin expression could augment IR-induced apoptosis and tumour growth delay in colorectal carcinoma cells.**
103. Santaris Pharma AS. LNA oligonucleotides and the treatment of cancer. WO2006050732; 2006
104. Yamanouchi Pharma Co Ltd. Fused imidazolium derivatives. US6734203; 2004
105. Iwasa T, Okamoto I, Suzuki M, et al. Radiosensitizing effect of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2008;14:6496-504
 - **Shows that YM155 could down-regulate the expression of survivin and enhance synergistically IR-induced apoptosis in lung cancer cells. YM155 also potentiated the tumour growth delay caused by RT in lung cancer xenografts.**
106. Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 2007;26:5541-2
107. Rasheed WK, Johnstone RW, Prince HM. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Expert Opin Invest Drugs* 2007;16:659-78
108. Camphausen K, Tofilon PJ. Inhibition of histone deacetylation: a strategy for tumor radiosensitization. *J Clin Oncol* 2007;25:4051-6
 - **Reviews the preclinical evidence indicating that HDAC inhibitors from structurally diverse classes can enhance both the *in vitro* and *in vivo* radiosensitivity of various types of human tumour cell lines.**
109. Georgetown University. Methods for the use of inhibitors of histone deacetylase as synergistic agents in cancer therapy US2005222013; 2005
110. Sloan Kettering Institute for Cancer Research. Combination therapy for the treatment of cancer. EP1501489; 2005
111. Novartis Pharmaceuticals GmbH. Combination of histone deacetylase inhibitors and radiation. WO2007050655; 2007
112. Geng L, Cuneo KC, Fu A, et al. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor LBH589 increases duration of gamma-H2AX foci and confines HDAC4 to the cytoplasm in irradiated non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2006;66:11298-304
 - **Shows that pretreatment of lung cancer cells with LBH589 increased the persistence of DSBs and the level apoptosis induced by IR and potentiated the antitumour effect of IR *in vivo* in a synergistic manner.**
113. Kim IA, Shin JH, Kim IH, et al. Histone deacetylase inhibitor-mediated radiosensitization of human cancer cells: class differences and the potential influence of p53. *Clin Cancer Res* 2006;12:940-9
114. Georgetown University. Isoform-selective HDAC inhibitors. WO2008019025; 2008
115. Xu W, Neckers L. Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 provides a multifaceted effect on diverse cell signaling pathways of cancer cells. *Clin Cancer Res* 2007;13:1625-9
116. Pearl LH, Prodromou C, Workman P. The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. *Biochem J* 2008;410:439-53
117. Camphausen K, Tofilon PJ. Inhibition of Hsp90: a multitarget approach to radiosensitization. *Clin Cancer Res* 2007;13:4326-30
 - **This paper outlines the rationale for inhibiting Hsp90 as a multitarget radiosensitisation method, based on the evidence that a number of Hsp90 client proteins contribute to tumour cell radioresistance, and summarises preclinical data indicating that Hsp90 blockade compromises the repair of IR-induced DNA damage in tumour cells without affecting the radiosensitivity of normal fibroblasts.**
118. Van Andel Research Institute. Geldanamycin and derivatives inhibit cancer invasion and identify novel targets. WO2005095347; 2005
119. Taldone T, Sun W, Chiosis G. Discovery and development of heat shock protein 90 inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2009;17:2225-35
120. Sloan-Kettering Institute for Cancer Research. Small-molecule Hsp90 inhibitors. WO2006084030; 2006
121. Patterson DM, Rustin GJ. Vascular damaging agents. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2007;19:443-56

- Reviews the current approaches for targeting the tumour vasculature, comprising angiogenesis inhibitors and vascular disrupting agents, which may be utilised to potentiate the efficacy of RT.
- 122. Cao Y. Molecular mechanisms and therapeutic development of angiogenesis inhibitors. *Adv Cancer Res* 2008;100:113-31
- 123. Shannon AM, Williams KJ. Antiangiogenics and radiotherapy. *J Pharm Pharmacol* 2008;60:1029-36
- Discusses the rationale for targeting the tumour vasculature with antiangiogenic agents to sensitise endothelial cells to the effect of IR and paradoxically increase tumour oxygenation, and thereby enhance the efficacy of RT.
- 124. Roskoski RJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;62:179-213
- 125. Liao D, Johnson RS. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:281-90
- 126. Brieger J, Kattwinkel J, Berres M, et al. Impact of vascular endothelial growth factor release on radiation resistance. *Oncol Rep* 2007;18:1597-601
- 127. Regeneron Pharmaceuticals. Use of a VEGF antagonist in combination with radiation therapy. WO2005016369; 2005
- 128. Wachsberger PR, Burd R, Cardi C, et al. VEGF trap in combination with radiotherapy improves tumor control in U87 glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;67:1526-37
- 129. Dings RP, Loren M, Heun H, et al. Scheduling of radiation with angiogenesis inhibitors anginex and Avastin improves therapeutic outcome via vessel normalization. *Clin Cancer Res* 2007;13:3397-402
- Shows that anginex and bevacizumab were both capable of increasing the oxygenation of tumour xenografts during the first 4 days of treatment and that such a transient effect enhanced the antitumour activity of single dose or fractionated RT in mice.
- 130. Williams KJ, Telfer BA, Shannon AM, et al. Combining radiotherapy with AZD2171, a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor signaling: pathophysiologic effects and therapeutic benefit. *Mol Cancer Ther* 2007;6:599-606
- Shows that cediranib (AZD2171) could enhance the RT response of human tumour xenografts independently of whether the compound was administered concomitantly or sequentially with IR.
- 131. Astrazeneca AB. Combination of ZD6474, an inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor, with radiotherapy in the treatment of cancer. EP1534287; 2005
- 132. Shibuya K, Komaki R, Shintani T, et al. Targeted therapy against VEGFR and EGFR with ZD6474 enhances the therapeutic efficacy of irradiation in an orthotopic model of human non-small-cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;69:1534-43
- The dual inhibitor of VEGFR and EGFR, ZD6474 (Vandetanib) blocked pleural effusion formation and angiogenesis and enhanced the antivasculature and antitumour effects of RT in an orthotopic human lung cancer model in mice.
- 133. Oehler-Jänne C, Jochum W, Riesterer O, et al. Hypoxia modulation and radiosensitization by the novel dual EGFR and VEGFR inhibitor AEE788 in spontaneous and related allograft tumor models. *Mol Cancer Ther* 2007;6:2496-504
- 134. Bozec A, Sudaka A, Fischel JL, et al. Combined effects of bevacizumab with erlotinib and irradiation: a preclinical study on a head and neck cancer orthotopic model. *Br J Cancer* 2008;99:93-9
- 135. Vanderbilt University. PI3K antagonists as radiosensitizers. US2006084697; 2006
- 136. Toyo Suisan Kaisha. Radiosensitizer. EP1734046; 2006
- 137. Sakimoto I, Ohta K, Yamazaki T, et al. Alpha-sulfoquinovosylmonoacyl-glycerol is a novel potent radiosensitizer targeting tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2006;66:2287-95
- 138. Mori Y, Sahara H, Matsumoto K, et al. Downregulation of Tie2 gene by a novel antitumor sulfolipid, 3'-sulfoquinovosyl-1'-monoacylglycerol, targeting angiogenesis. *Cancer Sci* 2008;99:1063-70
- 139. University of Minnesota. Tumor treatment using beta-sheet peptides and radiotherapy. CA2528635; 2007
- 140. Thijssen VL, Postel R, Brandwijk RJ, et al. Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:15975-80
- 141. Dings RP, Williams BW, Song CW, et al. Anginex synergizes with radiation therapy to inhibit tumor growth by radiosensitizing endothelial cells. *Int J Cancer* 2005;115:312-9
- 142. National Institute of Radiological Sciences, Kringle Pharmaceuticals Inc. Radiotherapy enhancing agent in radiotherapy for tumor. WO2007091681; 2007
- 143. Matsumoto K, Nakamura T, Sakai K, et al. Hepatocyte growth factor and Met in tumor biology and therapeutic approach with NK4. *Proteomics* 2008;8:3360-70
- 144. Uto Y, Nagasawa H, Jin CZ, et al. Design of antiangiogenic hypoxic cell radiosensitizers: 2-Nitroimidazoles containing a 2-aminomethylene-4-cyclopentene-1,3-dione moiety. *Bioorg Med Chem* 2008;16:6042-53
- Provides an example of rationally designed bifunctional agent incorporating a 2-nitroimidazole moiety and a TK inhibitory group, which may prove useful as an antiangiogenic hypoxic cell tumour radiosensitiser for RT enhancement.
- 145. Bristow RG, Hill RP. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer* 2008;8:180-92
- 146. Hamada N. Recent insights into the biological action of heavy-ion radiation. *J Radiat Res (Tokyo)* 2009;50:1-9

Affiliation

Francis Dumont, Anais Altmeyer & Pierre Bischoff†

†Author for correspondence

Université de Strasbourg,
Laboratoire de Radiobiologie EA-3430,
Centre Régional de Lutte Contre le Cancer
Paul Strauss,
3 rue de la porte de l'Hôpital,
F-67065 Strasbourg, France
Tel: +33 3 88 25 85 42; Fax: +33 3 88 25 85 00;
E-mail: pbischoff@strasbourg.fnclcc.fr

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

Feasibility and Reliability of Pancreatic Cancer Staging Using Fiberoptic Confocal Fluorescence Microscopy in Rats

MIHAELA IGNAT, MARC APRAHAMIAN, VERONIQUE LINDNER, ANAÏS ALTMAYER, SILVANA PERRETTA, BERNARD DALLEMAGNE, DIDIER MUTTER, and JACQUES MARESCAUX

Gastroenterology, 2009, vol. 137, n° 5, Pages 1584-1592.e1

Pages 227-236 :

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

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2009.07.045>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://scd.unistra.fr/services/peb/>

Résumé :

A l'heure actuelle, les protocoles de chimio-radiothérapie concomitante font preuve d'une grande efficacité dans la prise en charge des tumeurs. En revanche, le traitement de certaines tumeurs reste parfois très limité en raison de leur localisation critique ou de leur faible radiosensibilité aux radiations « conventionnelles ». Une manière de contourner ce problème est l'utilisation de radiations à transfert linéique d'énergie (TLE) élevé ou hadronthérapie. Cependant, son utilisation seule peut encore s'avérer insuffisante, d'où l'intérêt de lui associer des agents radiosensibilisateurs.

Au cours de cette thèse, nous avons évalué les effets radiosensibilisateurs de différentes molécules sur des lignées cellulaires humaines radiorésistantes, et plus particulièrement sur la lignée SK-Hep1, issue d'un carcinome hépatocellulaire. Nous avons ainsi pu démontrer qu'après un traitement combinant une irradiation à TLE élevé par neutrons rapides et de l'oxaliplatine, le pourcentage d'autophagie dans les cellules SK-Hep1 in vitro augmentait de manière considérable, tandis que le taux d'apoptose restait très faible dans ces cellules. Il avait déjà été démontré précédemment que des irradiations à TLE élevé avaient pour conséquence une induction de la mort cellulaire autophagique dans la lignée cellulaire U-87 in vitro, issue d'un glioblastome humain.

Nous avons ensuite voulu étudier les effets in vivo d'une irradiation par neutrons rapides. Pour cela, nous avons développé un modèle orthotopique de carcinome hépatocellulaire, obtenu par l'implantation chirurgicale de fragments tumoraux au niveau du foie de souris nude. Après analyse par microscopie confocale à fibres optiques et microscopie électronique à transmission, nous avons pu confirmer les observations faites in vitro, à savoir que la mort cellulaire prédominante après une telle irradiation était la mort cellulaire autophagique.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse démontrent l'importance du phénomène autophagique induit par des radiations à TLE élevé. Après une analyse mécanistique plus approfondie de ce phénomène, ces recherches pourraient, à terme, déboucher sur l'élaboration de nouveaux protocoles thérapeutiques dans le cas de cancers radiorésistants.