

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE BESANÇON
PLACE SAINT-JACQUES – 25030 BESANÇON CEDEX – TELECOPIE : 03.81.66.55.29
ANNEE 2008 – N°25 08 29

**Mise en évidence de l'induction de la Thymidine
Phosphorylase : application à la recherche de potentielles
applications cliniques.**

Mémoire de Diplôme d'Etudes Spécialisées
-
Pharmacie Spécialisée

Présenté et soutenu publiquement

Le : 14 octobre 2008

Tenant lieu de THESE pour obtenir le Diplôme d'Etat de

DOCTEUR EN PHARMACIE

PAR

Damien MONTANGE

Né(e) le 28/10/1979 à Rhône (France)

Directeur de Thèse :	B. Royer	Praticien Hospitalier
Président :	J.P. Kantelip	Professeur
Juges :	S. Limat	Professeur
	C. Borg	Maître de Conférences
	P. Muret	Maître de Conférences
	B. Royer	Praticien Hospitalier
	C. Ferrand	Docteur es Sciences

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE BESANÇON

PLACE SAINT-JACQUES – 25030 BESANÇON CEDEX – TELECOPIE : 03.81.66.55.29

DOYEN

ASSESEURS MEDECINE

ASSESEURS PHARMACIE

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

Professeur Hugues BITTARD

Professeur Daniel **SECHTER**

Professeur Xavier **PIVOT**

Professeur Patrick **GARBUIO**

Professeur Emmanuel **SAMAIN**

Professeur Daniel **WENDLING**

Professeur Yves **GUILLAUME**

Professeur M-Christine **WORONOFF-LEMSI**

Professeur Estelle **SEILLES**

Mlle Aurélie **JOLIBOIS**

MEDECINE

PROFESSEURS

M.	Hubert	ALLEMAND	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
M.	Didier	AUBERT	CHIRURGIE INFANTILE
M.	François	AUBIN	DERMATOLOGIE
M.	Jean-Pierre	BASSAND	CARDIOLOGIE ET MALADIES VASCULAIRES
Mme	Yvette	BERNARD	CARDIOLOGIE ET MALADIES VASCULAIRES
M.	Hugues	BITTARD	UROLOGIE
M.	Paul	BIZOUARD	PEDOPSYCHIATRIE
Mme	Annie	BOILLOT	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
M.	Jean-François	BONNEVILLE	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
M.	Jean-François	BOSSET	RADIOTHERAPIE
M.	Hatem	BOULAHDOUR	BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
M.	Jean-Luc	BRESSON	BIOLOGIE DU DEVELOPPEMENT ET DE LA REPRODUCTION
M.	Gabriel	CAMELOT	CHIRURGIE VASCULAIRE
M.	Gilles	CAPELLIER	REANIMATION MEDICALE
M.	Jean-Claude	CARDOT	BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
M.	Jean-Marc	CHALOPIN	NEPHROLOGIE
M.	Jean-Claude	CHOBAUT	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
M.	Sidney	CHOCRON	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE
M.	Jean-Luc	CHOPARD	MÉDECINE LÉGALE
M.	Joël	COMBE	CHIRURGIE VASCULAIRE
M.	Alain	CZORNY	NEUROCHIRURGIE
M.	Jean-Charles	DALPHIN	PNEUMOLOGIE
M.	Benoît	DE BILLY	CHIRURGIE INFANTILE
M.	Eric	DECONINCK	HEMATOLOGIE
M.	Bernard	DELBOSC	OPHTALMOLOGIE
M.	Alain	DEPIERRE	PNEUMOLOGIE
M.	Vincent	DI MARTINO	GASTRO-ENTEROLOGIE
M.	François	DUMEL	MÉDECINE GENERALE (Professeur associé)
M.	Gilles	DUMOULIN	PHYSIOLOGIE

M.	Jean-Louis	DUPOND	MEDECINE INTERNE
M.	Joseph	ETIEVENT	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE
M.	Dominique	FELLMANN	HISTOLOGIE ET CYTOLOGIE
M.	Patrick	GARBUIO	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
M.	Jean-Pierre	GAUME	MEDECINE GENERALE (Professeur associé)
M.	Georges	HERBEIN	VIROLOGIE
M.	Patrick	HERVÉ	HÉMATOLOGIE
M.	Bruno	HEYD	CHIRURGIE GÉNÉRALE
M.	Bruno	HOEN	MALADIES INFECTIEUSES
M.	Philippe	HUMBERT	DERMATO-VENERELOGIE
Mme	Bernadette	KANTELIP	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
M.	Jean-Pierre	KANTELIP	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
M.	Bruno	KASTLER	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
M.	François	KLEINCLAUSS	UROLOGIE
Mme	Nadine	MAGY-BERTRAND	MEDECINE INTERNE
M.	Robert	MAILLET	GYNECOLOGIE ET OBSTETRIQUE
M.	Georges	MANTION	CHIRURGIE GÉNÉRALE
M.	Jacques	MASSOL	THERAPEUTIQUE
M.	Alain	MENGET	PEDIATRIE
M.	Christophe	MEYER	CHIRURGIE MAXILLO FACIALE ET STOMATOLOGIE
M.	Jean-Philippe	MIGUET	HEPATOLOGIE
Mme	Laurence	MILLON	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE
M.	Michel	MONTARD	OPHTALMOLOGIE
Mme	Christiane	MOUGIN	BIOLOGIE CELLULAIRE
M.	Thierry	MOULIN	NEUROLOGIE
M.	Georges	NARBONI	ENDOCRINOLOGIE ET MALADIES METABOLIQUES
Mlle	Sylvie	NEZELOF	PEDOPSYCHIATRIE
M.	Laurent	OBERT	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
M.	Bernard	PARRATTE	ANATOMIE
M.	Alfred	PENFORNIS	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES
M.	Xavier	PIVOT	CANCEROLOGIE
M.	Patrick	PLESIAT	BACTERIOLOGIE, VIROLOGIE
M.	Jacques	REGNARD	PHYSIOLOGIE
M.	Bernard	RICBOURG	STOMATOLOGIE ET CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE
M.	Didier	RIETHMULLER	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
M.	Pierre	ROHRLICH	PEDIATRIE
M.	Christophe	ROUX	BIOLOGIE DU DEVELOPPEMENT ET DE LA REPRODUCTION
M.	Lucien	RUMBACH	NEUROLOGIE
M.	Yves	SAINT-HILLIER	NEPHROLOGIE
M	Emmanuel	SAMAIN	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
M.	François	SCHIELE	CARDIOLOGIE ET MALADIES VASCULAIRES
M.	Daniel	SECHTER	PSYCHIATRIE D'ADULTES
M	Laurent	TATU	ANATOMIE
M.	Pierre	TIBERGHIE	IMMUNOLOGIE
M.	Yves	TROPET	CHIRURGIE PLASTIQUE, RECONSTRUCTIVE ET ESTHETIQUE
M.	Pierre	VANDEL	PSYCHIATRIE ADULTES
M.	Jean-François	VIEL	BIostatistiques ET INFORMATIQUE MEDICALE
M.	Daniel	WENDLING	RHUMATOLOGIE
Mme	Virginie	WESTEEL-KAULEK	PNEUMOLOGIE

PROFESSEURS ÉMERITES

Mme Dominique **VUITTON** IMMUNOLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	Clotilde	AMIOT	CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE
M.	Rémi	BARDET	MEDECINE GENERALE (MC associé)
Mme	Martine	BENEDINI	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
Mme	Véronique	BONNIAUD	MEDECINE PHYSIQUE & READAPTATION
M.	Christophe	BORG	CANCEROLOGIE
Mme	Malika	BOUHADDI	PHYSIOLOGIE
Mlle	Marie-Claire	CLAVEQUIN	HISTOLOGIE ET CYTOLOGIE
M.	Alain	COAQUETTE	VIROLOGIE
M.	Benoît	CYPRIANI	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
M.	Siamak	DAVANI	PHARMACOLOGIE
M.	Eric	DELABROUSSE	RADIOLOGIE
M.	Alain	DEVEVEY	PSYCHOLOGIE
M.	Emmanuel	HAFFEN	PSYCHIATRIE ADULTES
M.	Didier	HOCQUET	BACTERIOLOGIE
Mme	Katy	JEANNOT	BACTERIOLOGIE, VIROLOGIE
M.	Daniel	LEPAGE	ANATOMIE
M.	Frédéric	MAUNY	BIostatistiques
Mme	Elisabeth	MONNET	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
M.	Christian	MOUSSARD	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
M.	Patrice	MURET	PHARMACOLOGIE
M.	Uyen	NGUYEN NHU	PHYSIOLOGIE
M.	Sébastien	PILI-FLOURY	ANESTHESIOLOGIE & REANIMATION CHIRURGICALE
M.	Jean-Luc	PRETET	BIOLOGIE CELLULAIRE
Mme	Evelyne	RACADOT	HEMATOLOGIE
Mme	Elisabeth	RANFAING	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
M.	Daniel	TALON	BACTERIOLOGIE, HYGIENE
Mme	Isabelle	THAON	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL
M.	Fabrice	VUILLIER	ANATOMIE
M.	Jean-Pierre	WOLF	PHYSIOLOGIE

PHARMACIE

PROFESSEURS

M.	Michel	BAUD	BIOPHYSIQUE ET INFORMATIQUE
M.	Alain	BERTHELOT	PHYSIOLOGIE
M.	Xavier	BERTRAND	IMMUNOLOGIE - INFECTIOLOGIE
Mme	Françoise	BEVALOT	PHARMACOGNOSIE
Mme	Céline	DEMOUGEOT	PHARMACOLOGIE
M.	Yves	GUILLAUME	CHIMIE ANALYTIQUE
M.	Alf	LAMPRECHT	GALENIQUE

M.	Samuel	LIMAT	PHARMACIE CLINIQUE
M.	Dominique	MEILLET	PARASITOLOGIE – MYCOLOGIE (BACTERIOLOGIE)
Mme	Mariette	MERCIER	BIOMATHEMATIQUES ET BIOSTATISTIQUES
Mme	Lysiane	RICHERT	TOXICOLOGIE
M.	Bernard	REFOUVELET	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
M.	Philippe	SAAS	IMMUNOLOGIE
Mme	Estelle	SEILLES	IMMUNOLOGIE (VIROLOGIE)
Mme	Marie-	WORONOFF-LEMSI	PHARMACIE CLINIQUE

MAITRES DE CONFERENCES

M.	Arnaud	BEDUNEAU	GALENIQUE
M.	Laurent	BERMONT	BIOCHIMIE
M.	Oleg	BLAGOSKLONOV	BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MEDICALE
Mme	Oxana	BLAGOSKLONOV	GENETIQUE
M.	Eric	CAVALLI	CHIMIE PHYSIQUE ET MINERALE
M.	Jean-Patrick	DASPET	BIOPHYSIQUE ET INFORMATIQUE
Mlle	Claire	ANDRE	CHIMIE ANALYTIQUE
Mme	Sylvie	DEVAUX	PHYSIOLOGIE
Mme	Francine	GARNACHE-OTTOU	HEMATOLOGIE
Mme	Corinne	GIRARD	PHARMACOGNOSIE
M.	Lhassanne	ISMAILI	CHIMIE ORGANIQUE
Mme	Isabelle	LASCOMBE	BIOLOGIE CELLULAIRE
Mme	Carole	MIGUET ALFONSI	TOXICOLOGIE
M.	Jean-Louis	MOZER	BIOCHIMIE
M.	Frédéric	MUYARD	PHARMACOGNOSIE
Mme	Laurence	NICOD	BIOLOGIE CELLULAIRE
M.	Yann	PELLEQUER	PHARMACIE GALENIQUE
M.	Marc	PUDLO	CHIMIE THERAPEUTIQUE
Mme	Nathalie	RETEL	BIOMATHEMATIQUES ET BIOSTATISTIQUES
Mme	Marianne	SANDOZ	PHARMACODYNAMIE

PROFESSEUR AGREGÉ DU SECOND DEGRÉ, PROFESSEURS ASSOCIÉS A TEMPS PARTIEL

M.	Patrice	BLEMONT	DROIT
Mme	Sandra	CHAVIN	ANGLAIS
Mme	Frédérique	ROUSSEY	ANGLAIS

A mon Maître et Président de Thèse

Monsieur le Professeur Jean-Pierre Kantelip

Je vous prie d'agréer, monsieur le Professeur, toute ma gratitude pour avoir accepté de présider le Jury de ce travail. Je tiens également à vous remercier vivement de la confiance qui fut la vôtre lors des quatre années passées dans votre service.

A mon Maître et Juge

Monsieur le Professeur Samuel Limat

Vous me faites l'honneur, monsieur le Professeur, d'avoir accepté de juger ce travail. Je tiens à vous en remercier vivement tout comme je vous remercie pour le soutien que j'ai pu obtenir auprès de l'UCR lors de mes travaux.

A mon Maître et Juge

Monsieur le Docteur Christophe Borg

Merci d'avoir accepté de juger ce travail, Christophe. Je te remercie pour l'exceptionnelle passion de la recherche qui est la tienne et que tu n'hésites pas à partager avec nous.

A mon Maître et Juge

Monsieur le Docteur Patrice Muret

Patrice, merci. Merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Merci pour l'exemple que tu m'as donné durant ces quatre années, tant du point de vue professionnel que du point de vue humain.

A mon Maître et Juge et Directeur de Thèse

Monsieur le Docteur Bernard Royer

Merci pour Tout, Bernard. Merci pour ta présence, ta direction de ces travaux, les conseils et motivations lorsque nous nous heurtions à des difficultés. J'ai appris de toi énormément en quatre ans et je sais que j'en aie encore au moins autant à apprendre avant de pouvoir « croire avoir une chance ».

A mon Maître et Juge

Monsieur le Docteur Christophe Ferrand

Je te remercie vivement d'avoir accepté de juger mon travail et de participer à ce jury. Travailler avec toi est un plaisir tant du point de vue professionnel qu'humain.

Papa, Maman, vous êtes les solides fondations de mon « moi ». Sans vous, votre amour, votre confiance en moi et votre constante présence à mes côtés, je ne serais pas là où j'en suis aujourd'hui et je ne serais pas ce que je suis. Je vous aime.

Florent, Delphine, le grand frère que je suis sera toujours là pour vous. Vous comptez énormément pour moi et je vous souhaite pleins de (très) belles choses à venir.

Papy, Mamy. Vous êtes partis trop tôt et vous me manquez terriblement. Vous êtes dans les bons souvenirs de mon enfance passée en France.
Regardez-moi de là haut.

Papy, tu as été le premier parti. Ta grosse voix, ton côté « faux bougon » et ton grand coeur me manquent. Les circonstances de ton départ ont été de celles qui orientèrent mon choix vers la pharmacie et la recherche. Regarde-moi de là haut.

Mamy, tu es toujours là et pourvu que tu restes à nos côtés le plus longtemps possible, bon pied et bon œil. Mais je dois t'avouer à mon grand regret que tes interventions énergiques d'alors n'ont pas permis de résoudre mes soucis de réveil.

Parrain, tu es un des premiers qui, très tôt, a su m'intéresser à ta matière, la biologie.
C'est en partie grâce à toi que je suis arrivé là aujourd'hui : Merci.

Marraine, merci pour ta douceur, ta gentillesse et tes constants encouragements.

Aux amis de l'internat. Merci pour cette année passée avec vous. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble et pour me conserver votre amitié.

Aux amis de tout poil : ceux qui me subissent depuis la 1^{ère} S de Xavier Bichat, ceux rencontrés à la fac de Montpellier, ceux des « petits bonhommes en plomb » et tous les autres. Merci pour tous ces bons moments.

A vous tous du « labo de Pharmaco », merci de m'avoir accueilli parmi vous de façon si chaleureuse et de m'avoir supporté pendant tout ce temps. Spéciales pensées à notre Michel qui, au bout de quatre ans, aura enfin réussi à m'inculquer que « la chromatographie n'est pas une science exacte ». Je suis bien d'accord avec toi Michel.

Aux collègues et copains doctorants, merci pour les moments de détente entre deux manip et pour les conseils donnés lorsque je venais vers vous avec mes problèmes.

Enfin, last but not least, merci à tous ceux que j'ai été amené à rencontrer durant la conduite de ces expériences (Laurent, Hélène, Francine, Evelyne *et al.*) et qui auront apporté à mon travail toute leur compétence et leur expérience. Merci.

Sommaire

<i>Sommaire</i>	1
<i>Liste des Figures</i>	2
<i>Liste des Tableaux</i>	3
<i>Liste des Abréviations</i>	4
<i>Introduction</i>	6
<i>I – Etat de la question</i>	7
<i>II – Protocoles expérimentaux mis en place</i>	30
<i>III – Discussion et Perspectives</i>	61
<i>Conclusion</i>	66
<i>Bibliographie</i>	67
<i>Plan Détaillé</i>	72

Liste des Figures

Figure 1 : Réaction enzymatique médiée par la TP.

Figure 2 : Noms et formules des principaux nucléosides métabolisés par la TP.

Figure 3 : Activité de la TP dans différents organes.

Figure 4 : Hypothèse du mécanisme de la surexpression de la TP au niveau tumoral.

Figure 5 : Métabolisme de la Capécitabine.

Figure 6 : Schéma d'activation du 5-FU.

Figure 7 : Effet de l'irradiation sur l'expression de la TP au niveau de la xénogreffe WiDr.

Figure 8 : Evolution de la taille des tumeurs (WiDr) et de la masse des souris en fonction de l'association de cytotoxiques administrée.

Figure 9 : Principe du modèle pharmacologique d'étude *in vitro* de l'induction de la TP par les taxanes.

Figure 10 : Concentrations de 5-FU mesurées suite à l'incubation à différentes densités cellulaires de cellules de lignées du colon HT-29 (4 heures – 10 mg/L de 5'DFUR).

Figure 11 : Concentrations de 5-FU mesurées suite à l'incubation pendant 4 heures de cellules de lignées du sein (MCF-7 ; MDA-MB-231) en présence de 5'DFUR à la concentration de 10 mg/L et suite à différentes conditions de pré-incubation en présence de taxanes.

Figure 12 : Transcription du gène de la TP par des cellules MDA-MB-231 incubées en présence de taxanes (DTX à 80 ng/mL) et Taxoïde (100 ng/mL) pour des durées d'incubations de 1, 4 et 24 heures.

Figure 13 : Western Blot de cellules MCF-7 après incubation pendant 24 heures en présence de différentes concentrations de taxanes.

Figure 14 : Marquage de la TP par immunocytochimie.

Figure 15 : Marquage de la TP par microscopie confocale.

Figure 16 : Marquage de la TP par microscopie confocale de cellules MCF-7 non incubées en présence de taxanes.

Figure 17 : Survie cellulaire (lignées MCF-7 et MDA MB 231) à 24 ; 48 et 72 heures d'incubation en présence de différentes concentrations de 5-FU.

Figure 18 : Survie cellulaire lignées MCF-7 et MDA MB 231) après 72 heures d'incubation en présence de 5'DFUR (10 mg/L) suite à la pré-incubation des cellules avec différentes concentrations de taxanes.

Figure 19 : Chromatogramme caractéristique du dosage des fluoropyrimidines sur HPLC/MS-MS.

Liste des Tableaux

Tableau A : Résumé des essais cliniques menés sur des associations avec Fluoropyrimidines.

Tableau B : Concentrations de points de gamme pour le dosage du 5-FU en HPLC/UV.

Tableau C : Caractéristiques des étapes successives de la mise au point du modèle pharmacologique d'étude *in vitro* de l'induction de la TP.

Tableau D : Gradient d'élution.

Tableau E : Principales caractéristiques et transitions des molécules d'intérêt et des SI.

Tableau F : Concentrations des points de gammes.

Tableau G : Temps de rétention des composés.

Liste des Abréviations

2DDR : 2'Deoxy-D-Ribose

5'ClUrd : 5-Chloro-2'Deoxyuridine

5'DFUR : 5'Deoxy-5-FluoroUridine

5'FDCR : 5'Deoxy-5-FluoroCytidine

5-CU : 5-ChloroUridine

5-FC : 5-FluoroCytosine

5-FU : 5-Fluorouracile

5-FU-¹⁵N₂ : 5-Fluorouracile comportant 2 atomes d'azote 15.

ADN : Acide Déoxyribo Nucléique

ADNc : Acide Déoxyribo Nucléique complémentaire

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

BCA : Acide BiCinchoninique

CE : Carboxyl Estérase

CyD : Cytidine Déaminase

DAB : 3,3'-Diaminobenzidine

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO : DiMéthyl Sulfoxyde

DPD : DiHydro Pyrimidine Déshydrogénase

DTX : Docétaxel

EC (numéro) : Enzyme Commission

EFS : Etablissement Français du Sang

elf-4E : eukaryotic Initiation factor

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ER α : Oestrogen Receptor α

F-dUMP : 5-Fluoro-2'Deoxy Mono Phosphate

F-dUrd : 5-Fluoro-2'DeoxyUridine

FITC : Fluoresceine Iso Thio Cyanate
F-UTP : 5-Fluorouridine Tri Phosphate
HIF1 α : Hypoxia Inductible Factor 1 α
HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance
IC50 : Concentration Inhibitrice 50%
IL1 : Interleukine 1
MCP : Macrophage Chemoattractant Protein
MMP : Matrix Metallo Protease
MS-MS : Spectromètre de Masse en tandem
mTOR : Mammalian Target Of Rapamycin
MTT : (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)
NF κ B : Nuclear Factor κ B
p38 MAPK : p38 Mitogen Activated Protein Kinase
PD-ECGF : Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor
PTX : Paclitaxel
Rapport [m/z] : Rapport [masse / charge]
RT-qPCR : Reverse Transcriptase – quantitative Polymerase Chain Reaction
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
SI : Standard Interne
SRB : Sulforhodamine B
SVF : Sérum de Veau Foetal
THU : Tétra Hydro Uridine
TNF α : Tumor Necrosis Factor α
TP : Thymidine Phosphorylase
TPI : Inhibiteur de la Thymidine Phosphorylase
TS : Thymidilate Synthase
UV : Ultra violet (détecteur)
VEGF : Vacular Endothelial Growth Factor
Vs : Versus

Introduction

Ce travail a pour but de compiler les expériences menées dans le cadre de la mise au point de l'investigation *in vivo* et *in vitro* de l'induction de la Thymidine Phosphorylase.

Après avoir exposé l'état de la question, les étapes successives menant à la mise au point des protocoles expérimentaux d'étude de l'induction de la Thymidine Phosphorylase seront ensuite présentés. Puis nous discuterons les résultats que nous avons obtenus en évoquant les perspectives ouvertes de travail.

I – Etat de la question

1 – Généralités

a – Historique

► Découverte de la Thymidine Phosphorylase

La Thymidine Phosphorylase (TP) est une enzyme impliquée dans le métabolisme des nucléosides. La TP porte d'autres dénominations ou abréviations : thymidine orthophosphate deoxyribosyltransferase ; pyrimidine nucleoside phosphorylase ; dThdPase et son numéro EC (Enzyme Commission number), le 2.4.2.4.

La TP a été isolée pour la première fois en 1954 à partir d'extraits de différents tissus de mammifères (lapin, cheval, rat, poulet, bœuf) et son activité mise en évidence par dosage spectrophotométrique des produits de la réaction enzymatique (synthèse de la thymine à partir de la thymidine) (1). En 1975, la TP a été purifiée à partir d'*Escherichia coli* (2). La structure homodimérique de la TP, dont chaque unité a une masse de 45 KiloDalton (KDa), a été mise en évidence en 1978 par cristallographie (3). La même année, la TP humaine a été isolée et purifiée à partir de cellules d'amniochorion. A noter qu'en fonction des études, le poids moléculaire des sous-unités de la TP varie de 47 KDa (4) à 55 KDa (5).

► Découverte du PD-ECGF

En 1987, un nouveau facteur angiogénique, le Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor (PD-ECGF), a été isolé à partir d'extraits de thrombocytes humains (6). L'Acide DéoxyriboNucléique complémentaire (ADNc) du PD-ECGF a ensuite été séquencé et le PD-ECGF cloné (7). Cette même étude a permis de confirmer le potentiel angiogénique du PD-ECGF ainsi que son potentiel chimiotactique sur des cellules endothéliales (7). En 1991, le gène du PD ECGF a été isolé (8). Il est situé sur le chromosome 22, composé de 10 exons dispersés sur une région de 4,3 Kilobase (Kb) et code pour une protéine comprenant 411 acides aminés.

► Identification de la TP au PD-ECGF

En 1992, l'équipe d'Usuki observe une homologie (39,2%) entre la séquence des aminoacides du PD-ECGF et celle de la TP isolée à partir d' *Escherichia coli* (9). De plus, ils mettent en évidence que le PD-ECGF humain recombinant présente une activité enzymatique similaire à celle de la TP (9). Un résultat similaire fut observé par une autre équipe la même année (10). En 1993, la structure protéique du PD-ECGF est déterminée par cristallographie et diffraction aux rayons X (11). La comparaison de la structure du PD-ECGF avec celle de la TP préalablement obtenue (3) a permis de confirmer que ces deux protéines étaient une seule et même entité.

b – Physiologie de la TP

► Localisation

La TP est une enzyme intracellulaire. Des études immunohistochimiques ont montré sa présence tant au niveau du cytoplasme que du noyau (12). La TP ne possède pas de signal de sécrétion dans sa séquence peptidique. Elle n'a aucun domaine hydrophobe qui permette sa fixation à la membrane cellulaire.

La TP est présente dans un grand nombre de tissus sains. Sa présence a été mise en évidence par détermination de son activité enzymatique à partir d'extraits tissulaires : colon (13), rectum (13), l'estomac (13), sein (13), utérus (col et corps) (13), ovaires (13), rein (13), vessie (13), thyroïde (13) et foie où elle a une activité enzymatique particulièrement importante (13). D'autres tissus ne semblent toutefois pas l'exprimer (mise en évidence par immunohistochimie) : les muscles lisses ; l'épithélium gastrointestinal et le poumon (12).

La TP a été observée par immunoblotting et immunohistochimie au niveau des lymphocytes périphériques (5), des hépatocytes (5), des macrophages (notamment ceux infiltrés au niveau des poumons) (5), des cellules stromales (12), des cellules gliales (12), de certaines cellules épithéliales (12) et des cellules stromales du placenta humain (14).

► Activité enzymatique

La TP est une enzyme impliquée dans le métabolisme des nucléosides et, plus précisément, dans le métabolisme des déoxy-nucléosides pyrimidiques (e.g. thymidine, uridine). La réaction enzymatique catalysée par la TP est présentée en Figure 1. Il s'agit d'une phosphorolyse du nucléoside avec obtention de la base azotée correspondante et d'un déoxy-ribose-1-phosphate (1).

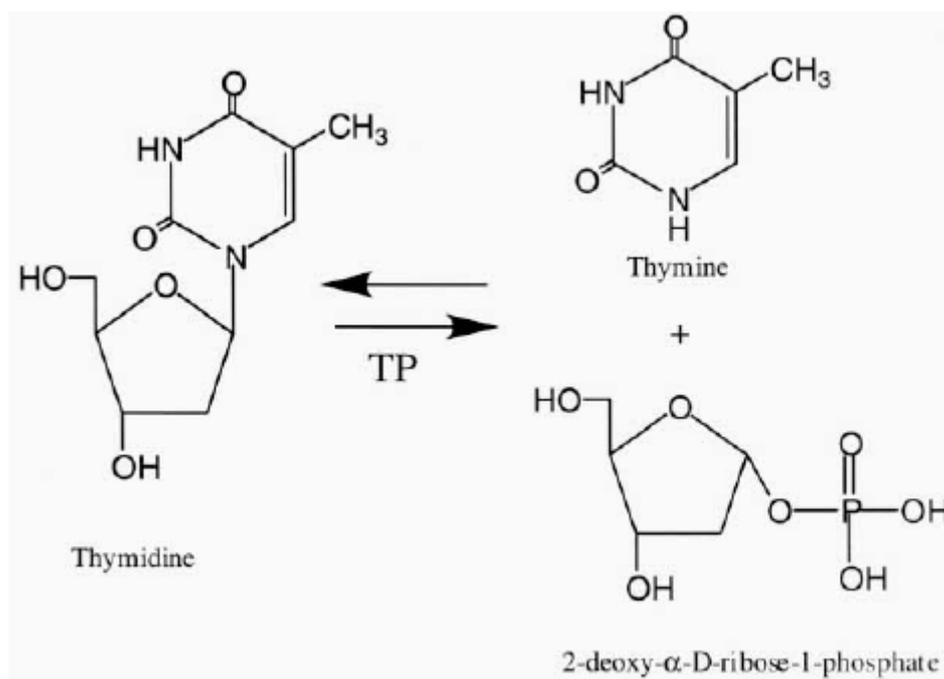


Figure 1 : Réaction enzymatique médiée par la TP. Le sens préférentiel de la réaction enzymatique correspond à la phosphorolyse du nucléoside (e.g. la Thymidine) et à la libération de la base nucléique correspondante et du Ribose-1-Phosphate

Cette réaction enzymatique est réversible mais, en conditions physiologiques dans des cellules eucaryotes, il semble qu'elle soit préférentiellement orientée vers le catabolisme des nucléosides et la synthèse de la base pyrimidique correspondante. En effet, la réaction enzymatique est déséquilibrée par la dégradation rapide du 2-déoxy-ribose-1-phosphate (15). De plus, la TP présente de nombreux sites de liaisons pour la thymine qui pourra inhiber l'enzyme (16). Devant ce résultat, d'autres auteurs ont émis l'hypothèse que la thymine est le produit « préférentiel » de la réaction enzymatique, puisqu'il peut exercer un rétro-contrôle négatif (17).

La TP joue un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie du pool de nucléosides triphosphates (18). Elle assure le maintien d'un nombre constant de nucléosides triphosphates afin de permettre la bonne réplication de l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) ou sa réparation. A noter qu'à la différence d'autres enzymes impliquées dans la synthèse des acides nucléiques, elle ne présente pas de variations de son activité au cours du cycle cellulaire (19).

Enfin, des études biochimiques ont démontré que la TP reconnaît un grand nombre de substrats différents (Figure 2) : la thymidine, l'uridine mais aussi la 2'déoxy-uridine (20) ainsi que d'autres dérivés pyrimidiniques dont des anticancéreux comme la 5'déoxy-5-fluorouridine (5'dFUrd ; 5'DFUR) et le 5-Fluorouracile (5-FU) (21, 22). A noter que le 5'DFUR est, *via* la TP, une prodrogue du 5-FU (23).

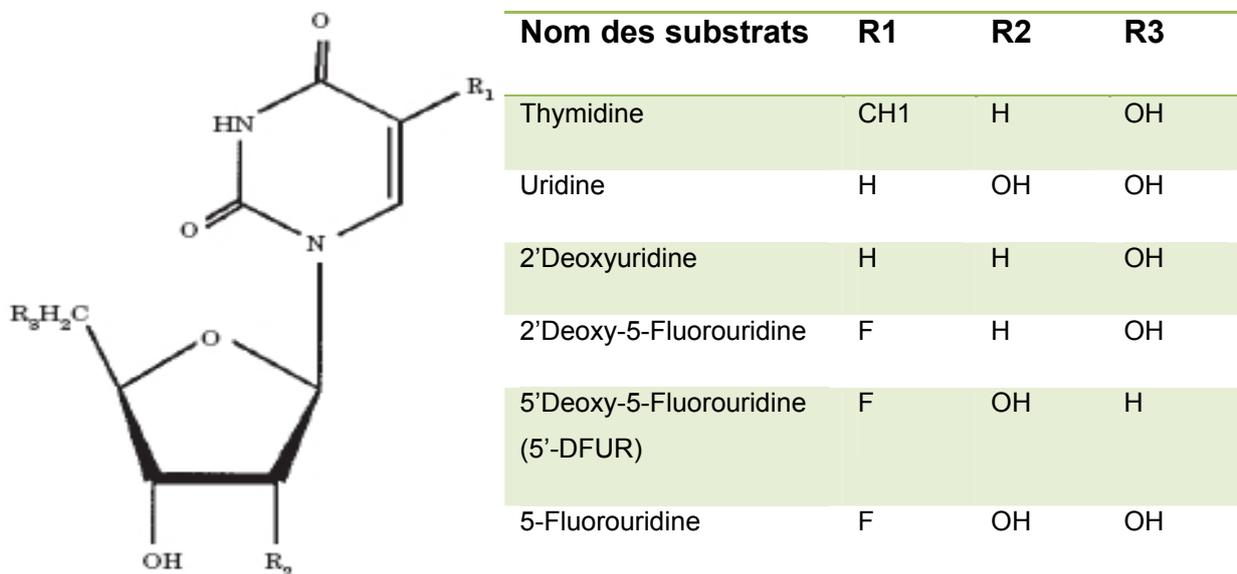


Figure 2 : Noms et formules des principaux nucléosides métabolisés par la TP.

► Activité angiogénique

L'effet angiogénique de la TP a été mis en évidence *in vivo*. La TP possède un effet (dose dépendant) de chimiotaxie vis-à-vis des cellules endothéliales *in vitro*. Ainsi, des cellules endothéliales d'aorte de bœuf en présence de TP (concentration supérieure à 10 ng/mL) ont une migration accrue en chambre de Boyden (modèle d'étude *in vitro* de la migration cellulaire) (7, 24).

En 1995, Moghaddam et son équipe ont montré une amélioration de la vascularisation et de l'angiogénèse pour des rats traités par la TP *versus* (Vs) des

rats contrôles traités par un tampon phosphate. Ils ont de plus déterminé que la TP ne possède pas d'activité mitogénique *in vitro* (24).

Cependant la TP présente d'autres caractéristiques inhabituelles pour un facteur angiogénique. Ainsi, son activité enzymatique est indispensable pour observer un effet angiogénique *in vivo* (24, 25). Une autre particularité de la TP est qu'elle ne peut pas être sécrétée par les cellules puisque la protéine ne comprend aucun signal de sécrétion (17).

Il est donc fort probable que la TP exerce son effet angiogénique de façon indirecte. Brown, en 1998, émet l'hypothèse que cet effet passe par la synthèse du 2'déoxy-D-ribose-1-phosphate (Figure 1) (17). En effet, au niveau intra-cellulaire le 2'déoxy-D-ribose-1-phosphate est rapidement déphosphorylé en 2'déoxy-D-ribose (20). Il peut alors diffuser librement à travers la membrane cellulaire et passer au niveau extra-cellulaire (26). Il pourrait alors stimuler la migration des cellules endothéliales selon le même mécanisme qui a été décrit pour le glucose. Le glucose qui, en tant que nutriment, attire les cellules de façon passive, selon son gradient de concentration (27).

2 – Implications de la TP dans la pathologie tumorale

a – Surexpression au niveau des tissus cancéreux

Dans les années 1970, il a été montré que des patients atteints de cancer présentaient des concentrations plasmatiques de TP plus élevées par rapport aux sujets sains (28).

En 1990, Yoshimura *et al.* ont mis en évidence, par immunoblotting et immunohistochimie, sa surexpression au niveau des zones tumorales par rapport aux zones non tumorales dans les tissus de l'estomac, du colon et des ovaires (5).

Moghaddam *et al.* ont travaillé sur des cancers du sein et ont mis en évidence, tant par Western Blot que par immunohistochimie, une surexpression de la TP au niveau des tissus cancéreux (32 prélèvements) par rapport aux tissus sains (16 prélèvements). A noter que lors de l'étude immunohistochimique, la localisation de la TP semblait varier entre les différents prélèvements de tissus cancéreux avec, sur

certaines coupes, une expression plus importante au niveau des cellules cancéreuses et pour d'autres, une expression de la TP au niveau des cellules stromales et des cellules inflammatoires infiltrées au niveau de la tumeur (24).

O'Brien *et al.* ont examiné 105 excrèses complètes de cancers de la vessie (cancers à différents stades lors de l'inclusion des patients dans l'étude). L'expression de la TP de ces 105 prélèvements a été comparée (par Western Blot et immunohistochimie) à l'expression de 7 prélèvements de vessies saines. La TP était de 5 à 15 fois plus élevée au niveau des tissus cancéreux par rapport aux tissus sains. Là encore, les études d'immunohistochimie ont démontré que différents types cellulaires pouvaient surexprimer la TP. Ainsi, les cellules exprimant la TP étaient néoplasiques dans 27% des cancers testés ; dans 72% des cas, des cellules inflammatoires infiltrées et dans 30% des cas, des cellules stromales (29).

Takebayashi *et al.* ont travaillé sur 163 échantillons de cancers colorectaux. Pour chacune des tumeurs, un double prélèvement était effectué : un pour des tissus cancéreux et un pour des tissus sains adjacents. Par immunohistochimie, ils ont mis en évidence une augmentation significative de la TP au niveau tumoral par rapport aux tissus sains, respectivement 42,9% Vs 6,7% (30).

Des résultats similaires ont été obtenus pour les cancers gastriques (158 doubles prélèvements) : 43,4% Vs 7,6% (31).

Enfin, en 1998, dans une étude comparative de l'activité de la TP entre tissus cancéreux et tissus sains de mêmes organes (détermination de l'activité enzymatique d'extraits de prélèvements tissulaires), l'activité de la TP était, pour tous les organes explorés, 3 à 10 fois plus importante au niveau des tumeurs que pour les tissus sains (Figure 3) (13).

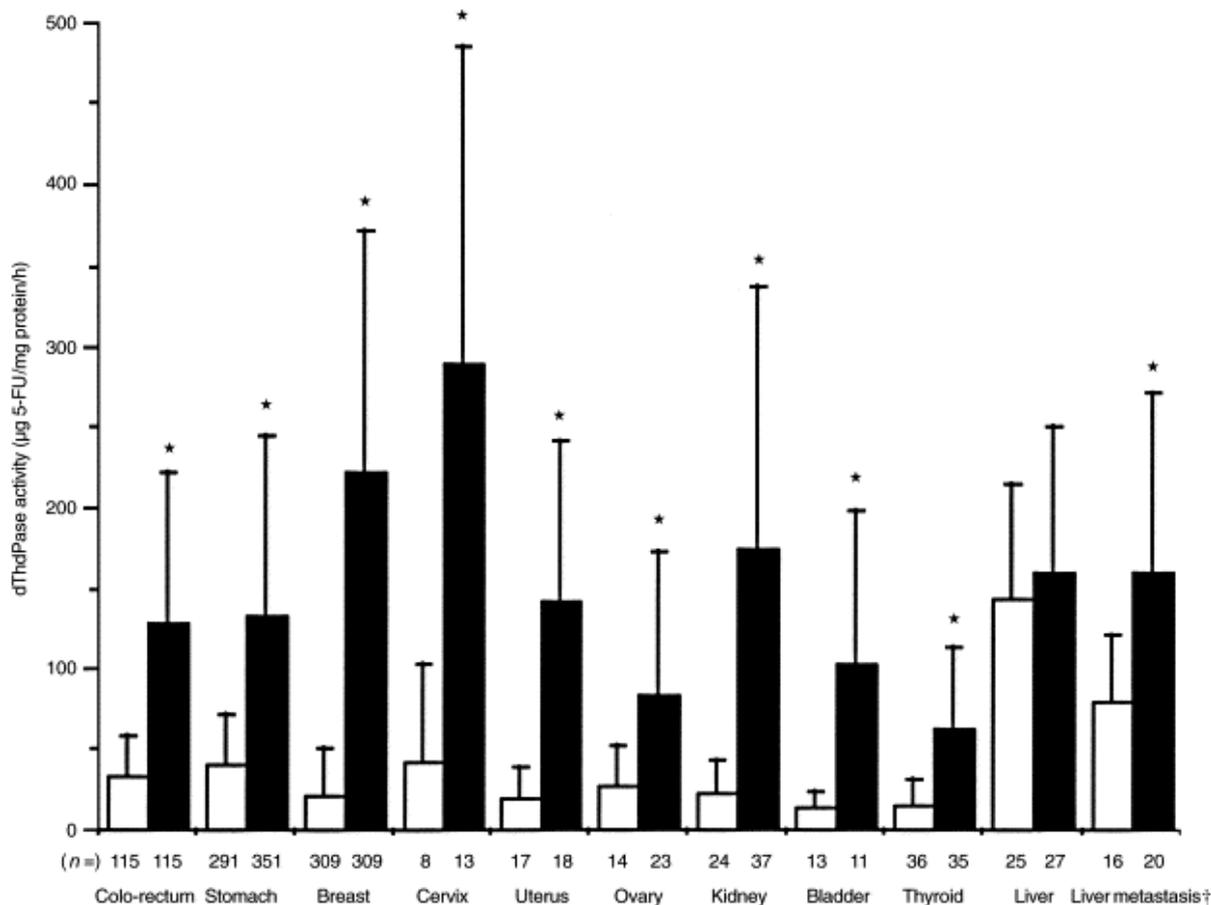


Figure 3 (13) : Activité de la TP dans différents organes. Représentation de la moyenne \pm écart-type. Histogrammes blancs : tissus sains ; histogrammes noirs : tumeurs. * $p < 0,05$.

Ainsi, d'une façon générale, l'expression de la TP est fortement augmentée dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus sains (augmentation de 10 à 260 fois en fonction des tumeurs considérées) (32).

b – Mécanisme de la surexpression de la TP tumorale

Pendant longtemps, le mécanisme de cette surexpression au niveau des tumeurs est demeuré inexpliqué et reste, à ce jour, incomplètement maîtrisé.

Une hypothèse a été émise par Toi en 2005. Selon cet auteur, les cellules tumorales sont des cellules exprimant fortement des cytokines pro-inflammatoires et, par définition, prolifèrent de façon incontrôlée. De plus, l'angiogénèse tumorale étant anarchique et déficiente, l'apport en nutriments et en oxygène est réduit (33). Des

conditions de stress physiques (hypoxie, diminution des nutriments, cytokines) s'exercent donc au sein du micro-environnement tumoral. Or, en 1997, une étude *in vitro* et *in vivo* menée par Griffiths sur des cellules tumorales MDA-MB-231 (lignée tumorale du sein) démontre que des conditions environnementales telles que l'hypoxie induite *in vitro* et *in vivo* (sur un modèle de xénogreffe murine) ou une diminution du pH (pH *in vitro* = 6,3 – 6,7) conduisent à une augmentation de l'expression et de l'activité de la TP (34). De plus, il a été démontré que certaines cytokines peuvent induire l'expression de la TP : le Tumor Necrosis Factor α (TNF α) via son récepteur R2 (35) ; l'interleukine 1 (IL1); l'interféron α et l'interféron γ (36-38).

Ainsi, Toi, dans son hypothèse, suppose que l'action des cytokines pro-inflammatoires ainsi que le stress subit par les cellules au sein de la tumeur conduit à une modification phénotypique des cellules cancéreuses et des cellules stromales. Ces cellules seraient alors capables d'exprimer de façon très importante des cytokines et certaines protéines (dont la TP). Elles seraient alors en mesure d'auto-entretenir le stress et les fortes concentrations de cytokines au sein du micro-environnement tumoral (39). Ce mécanisme expliquant la surexpression de la TP au niveau tumoral est illustré par la Figure 4.

A noter qu'en 2000, Brown *et al.* ont observé que l'addition de thymidine (substrat de la TP) dans le milieu de culture de cellules tumorales RT-112 (vessie) transfectées afin de surexprimer la TP entraînait un stress oxydatif cellulaire important (mis en évidence par la synthèse d'Hème Oxygénase-1). L'hypothèse émise par Brown était la suivante : le 2-Deoxy-D-Ribose-1-Phosphate (produit par la dégradation de la thymidine par la TP) entraînerait une production de radicaux oxygénés libres, générateurs de stress oxydant (40).

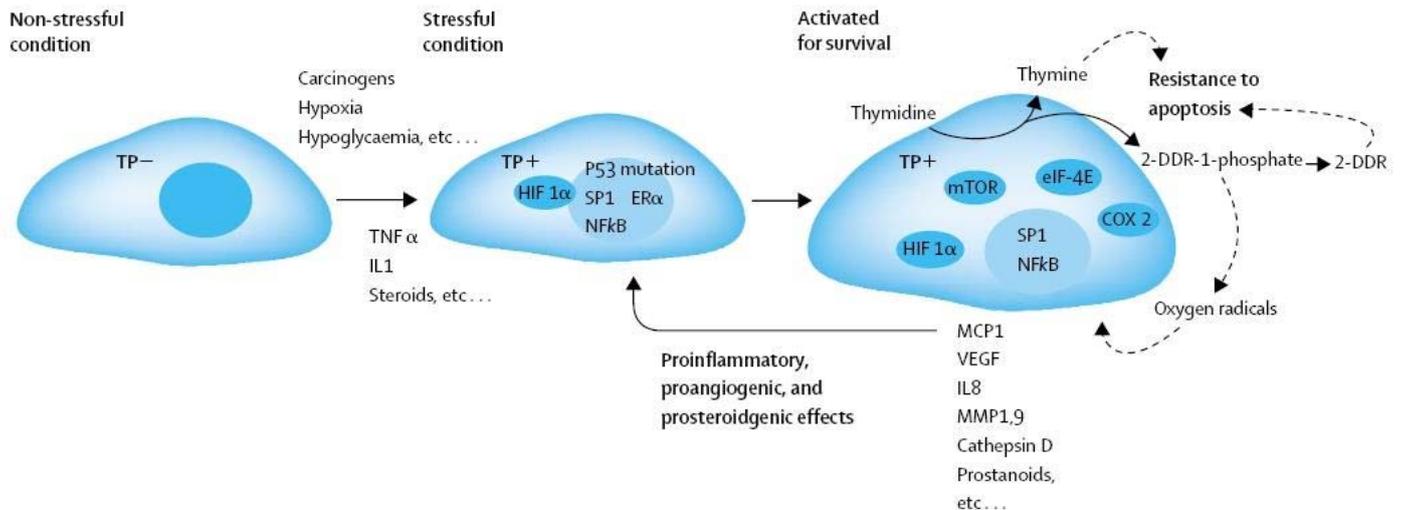


Figure 4 (39) : Hypothèse du mécanisme de la surexpression de la TP au niveau tumoral. TNF α : Tumor Necrosis Factor α ; IL1 (Interleukine 1) ; HIF1 α : Hypoxia Inducible Factor 1 α ; ER α : Oestrogen Receptor α ; NF κ B : Nuclear Factor ; mTOR : mammalian Target of Rapamycin ; eIF-4E : eukaryotic Initiation factor ; 2-DDR : 2 Deoxy-D-Ribose ; MCP : Macrophage chemoattractant protein ; VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor ; MMP : Matrix Metalloprotease

Le contrôle de la transcription du gène de la TP est encore méconnu.

En 2002, des études menées sur des cellules de la lignée tumorale WiDr (colon) ont démontré que son induction par le TNF α passait par une augmentation de la transcription des Acides Ribo Nucléiques messagers (ARNm) (41) *via* le facteur de transcription Sp1 (41). A noter par ailleurs que Sp1 est aussi impliqué dans la régulation de l'expression du gène du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (42).

L'ARNm de la TP présente, à son extrémité 3', une séquence riche en pyrimidines qui est similaire à celle impliquée dans l'augmentation de la stabilité des ARNm d'autres gènes. La présence de cette séquence laisse supposer que l'ARNm de la TP pourrait aussi être régulé à un niveau post-transcriptionnel (43). Néanmoins, une étude ultérieure n'a pas mis en évidence d'augmentation de la stabilité des ARNm lors de l'induction de la TP par le TNF α (41).

c – Surexpression et croissance tumorale

Moghaddam *et al.* a travaillé en 1995 sur des cellules de lignée cellulaire de cancer du sein (MCF-7). Ces cellules ont été transfectées par un plasmide contenant le gène de la TP et les clones surexprimant la TP ont été isolés. Ces clones n'ont pas montré de croissance *in vitro* plus importante que celle de cellules non transfectées. En revanche, des xénogreffes de ces clones sur des souris BALB/c *nu/nu* présentaient une croissance tumorale plus rapide que pour les cellules MCF-7 de phénotype sauvage (24).

d – Surexpression et vascularisation tumorale

En 1996, Takebayashi *et al.* ont publié une étude sur des cancers colorectaux. La densité moyenne de micro-vaisseaux est plus élevée pour les tissus cancéreux exprimant la TP que celle des tissus cancéreux n'exprimant pas la TP (30).

La même équipe a mis en évidence que la densité moyenne de micro-vaisseaux était significativement plus élevée pour les cancers gastriques exprimant la TP que celle des cancers n'exprimant pas la TP. De plus, le pourcentage de cellules cancéreuses exprimant la TP était significativement corrélé à la densité de micro-vaisseaux (31).

e – Surexpression et apoptose

Afin de mettre en évidence un éventuel effet de la surexpression de la TP sur l'apoptose, des cellules de la lignée KB ont été transfectées avec le gène de la TP et cultivées *in vitro* en conditions hypoxiques pendant 72 heures. A 24, 48 et 72 heures, la croissance cellulaire était déterminée ainsi que la population de cellules en sub G1 (population correspondant aux cellules apoptotiques). Les clones surexprimant la TP et cultivés en conditions hypoxiques, présentent, dès 48h une croissance deux fois plus rapide que les cellules KB non transfectées. A noter qu'en conditions normales de culture, la différence de croissance entre les deux types cellulaires n'était pas significative. Afin de déterminer l'apoptose induite par les conditions d'hypoxie, la détermination des cellules en phase sub G1 a été faite aux mêmes temps et selon les mêmes conditions de culture que précédemment (détermination par cytométrie de flux). Dès 48 heures de culture en conditions hypoxiques, les cellules KB sur-

exprimant la TP présentent des pics Sub G1 moins importants que les cellules non transfectées. Ainsi, une inhibition de l'apoptose induite par l'hypoxie est observée chez les clones sur-exprimant la TP (44).

Il a été aussi mis en évidence que la TP peut inhiber l'apoptose induite par des cytotoxiques : Cisplatine (45) ; Vincristine (46) ; Vinblastine (46) et Paclitaxel (46). Des cellules de la lignée Jurkatt (leucémie), de la lignée HCT-15 (colon) et HL-60 (leucémie) ont été utilisées. Pour chacune de ses lignées, des clones sur-exprimant la TP ont été créés par transfection. L'effet de la TP sur l'apoptose induite par les cytotoxiques était mis en évidence de deux façons : la sensibilité des cellules aux cytotoxiques (sensibilité représentée par l'IC50, la concentration de cytotoxique nécessaire pour obtenir l'inhibition de 50% de la croissance cellulaire) et la proportion de cellules en apoptose (population cellulaire en subG1). Tous les cytotoxiques testés lors de ces deux études avaient une efficacité moindre vis-à-vis des cellules sur-exprimant la TP que des cellules contrôles de phénotype sauvage ou transfectées par le vecteur seul.

Les mécanismes de cet effet anti-apoptotique de la TP sont encore mal cernés. L'équipe d'Ikeda a déterminé que la résistance à l'apoptose induite par l'hypoxie passe par le 2'Deoxy-D-Ribose, produit secondaire de la TP (47). En 2006, des études complémentaires ont mis en évidence que le 2'Déoxy-D-ribose permettait l'inhibition de la phosphorylation (et donc de l'activation) des p38 Mitogen-activated Protein Kinase (p38 MAPK), protéines de signalisation impliquées dans le déclenchement de l'apoptose induite par l'hypoxie (48). En revanche, en ce qui concerne l'apoptose induite par les cytotoxiques, sa diminution et celle de la mortalité étaient observées aussi bien pour des cellules surexprimant une TP fonctionnelle que pour celles surexprimant une TP inactivée par mutation sélective au niveau de son site enzymatique (45, 46). Ainsi, il semblerait que la TP exerce un effet anti-apoptotique *via* ses métabolites mais aussi de par un effet direct (45).

3 – Utilisations thérapeutiques de la TP

a – Implication dans le métabolisme de la Capécitabine.

Les laboratoires Roche ont développé un cytotoxique novateur, la Capécitabine (Xélo[®]). La capécitabine est un dérivé fluoropyrimidinique (N4-pentyloxycarbonyl-5'-deoxy-5-fluorocytidine) qui présente l'intérêt de pouvoir être administré au patient *per os*. Cet anticancéreux a les indications suivantes : traitement des cancers gastriques, des cancers du sein et des cancers colo-rectaux (49).

C'est une prodrogue non cytotoxique métabolisée en trois étapes enzymatiques pour aboutir au cytotoxique actif : le 5-fluorouracile (5-FU). La cascade enzymatique d'activation de la Capécitabine est illustrée Figure 5.

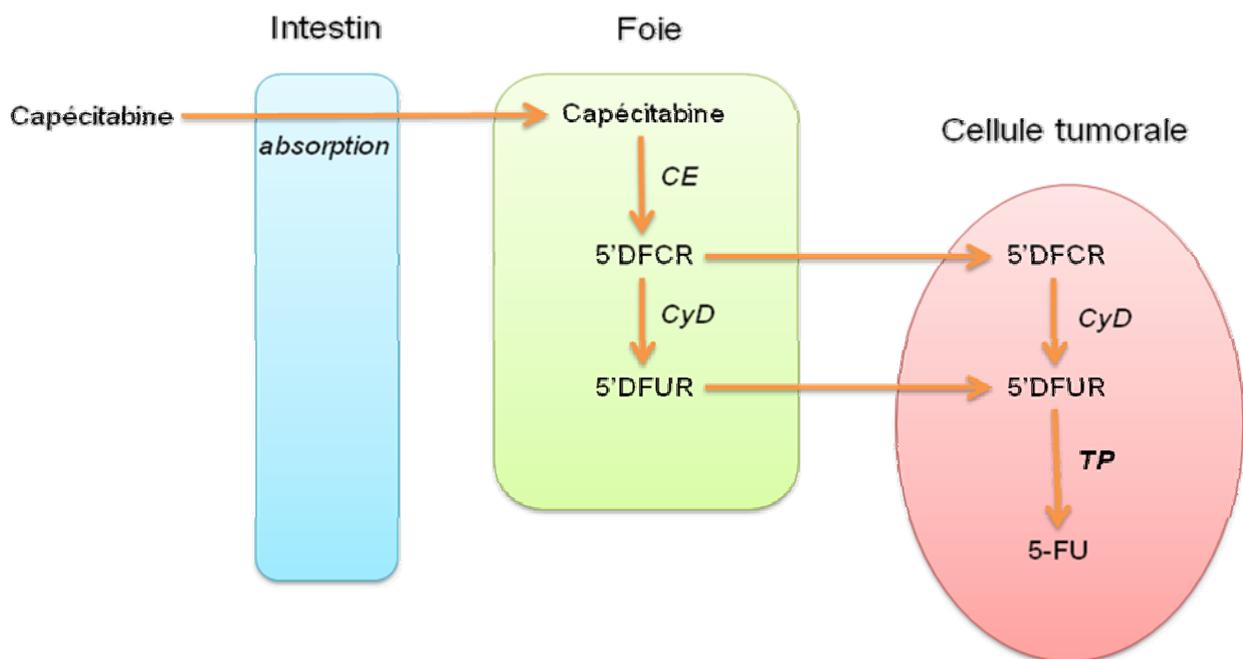


Figure 5 : Métabolisme de la Capécitabine. 5'DFCR : 5'Déoxy-5-fluorocytidine ; 5'DFUR : 5'Déoxy-5-fluorouridine ; CE : Carboxylestérase ; CyD : Cytidine déaminase ; TP : Thymidine Phosphorylase.

Après une absorption rapide et importante par le tractus digestif, la Capécitabine est métabolisée dans le foie par la Carboxylestérase (CE) en 5'Déoxy-5-fluorocytidine (5'DFCR) lui-même métabolisé (au niveau hépatique ou tumoral) par

la Cytidine déaminase (CyD) en 5'Deoxy-5-fluorouridine (5'DFUR). Le 5'DFUR est quant à lui, un substrat de la TP qui le métabolisera en 5-FU (13).

L'intérêt de la cascade d'activation enzymatique de la Capécitabine réside dans la localisation sélective des enzymes impliquées (13). Ainsi, comme nous l'avons vu, la TP est sur-exprimée au niveau des tumeurs ce qui fait que théoriquement, la conversion de la prodrogue 5'DFUR en 5-FU se fera de façon préférentielle et sélective au niveau des cellules tumorales (13, 50). De plus, parce qu'elle est administrable *per os*, à la différence du 5-FU, la Capécitabine est plus simple à utiliser en pratique pour le personnel soignant et pour les patients.

Le mécanisme d'activation du 5-FU est illustré en Figure 6.

Le 5-FU est lui-même une prodrogue dont les métabolites possèdent une activité cytotoxique. Plusieurs mécanismes d'activation ont été décrits (51). Le 5-FU peut être métabolisé en 5-Fluoro-2'déoxyuridine mono phosphate (F-dUMP) qui inhibe la Thymidilate Synthase (TS). La TS est l'enzyme clé impliquée dans la synthèse *de novo* des bases pyrimidiques (thymidine) et son inhibition par le 5-FU induit un déséquilibre dans le pool de nucléosides tri-phosphates, empêchant la bonne réplication de l'ADN. L'inhibition de la TS se fait par la formation d'un complexe ternaire inactif composé de l'enzyme, du F-dUMP et d'un cofacteur de l'enzyme, l'acide folinique. Une autre voie métabolique d'activation du 5-FU conduit à la synthèse du 5-fluorouridine tri phosphate (F-UTP) qui, intégré dans l'ARN, conduit à la mauvaise transcription du génome.

Il est important de noter que la TP peut aussi jouer un rôle important dans l'activation du 5-FU puisqu'elle est capable de synthétiser la 5-Fluoro-2'déoxyUridine (F-dUrd) à partir du 5-FU, F-dURd métabolisée ensuite par une Thymidine kinase en F-dUMP (32).

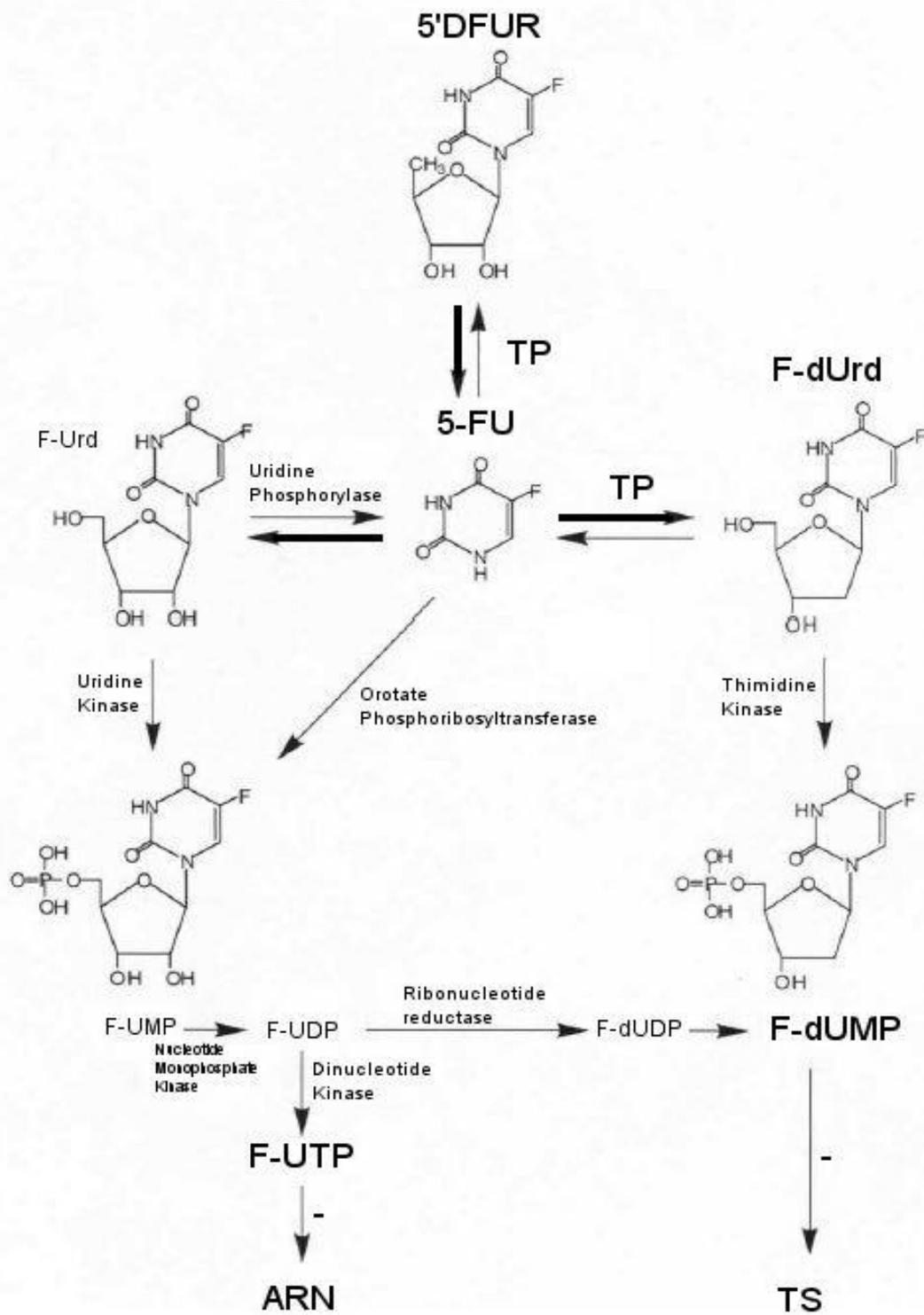


Figure 6 : Schéma d'activation du 5-FU. 5'DFUR : 5'Deoxy-5-fluorouridine ; 5-FU : 5-Fluorouracile ; F-dUrd : 5-Fluoro-2'déoxyUridine ; F-dUMP : 5-Fluoro-2'déoxyuridine mono phosphate ; F-Urd : Fluoro-Uridine ; F-Urd-5-P : 5-fluorouridine mono phosphate ; F-UDP : 5-fluorouridine di phosphate ; F-UTP : 5-fluorouridine tri phosphate ; F-dUDP : 5-fluoro-2'deoxyuridine di phosphate ; TP : Thymidine Phosphorylase ; TS : Thymidilate synthase ; ARN : Acide Ribo Nucléique.

b – Expression de la TP au niveau tumoral et meilleure efficacité des Fluoropyrimidines

La TP est une enzyme clé dans le métabolisme (et l'activation) de la Capécitabine. De nombreuses études ont mis en évidence une surexpression de cette enzyme au sein des tumeurs. L'expression de la TP au niveau tumoral influence-t-elle l'efficacité d'un traitement par les dérivés fluoropyrimidiniques ?

In vitro, sur des cellules d'un carcinome hépatocellulaire SMMC-7721, Zhou *et al.* ont transfecté l'ADNc de la TP afin que les clones sur-expriment l'enzyme. Après incubation des cellules en présence de 5'DFUR pendant 5 jours, des essais de survie cellulaire (Tests au (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) ou MTT) ont mis en évidence une toxicité plus importante du 5'DFUR sur les cellules sur-exprimant la TP ($IC_{50} = 56,81 \pm 9,85 \mu M$) par rapport aux cellules contrôles ($IC_{50} = 162,25 \pm 11,03 \mu M$). A noter également que le milieu de culture des cellules sur-exprimant la TP favorise la migration des cellules endothéliales (52).

Temmink *et al.* ont travaillé sur des cellules tumorales de lignée de cancer du colon (Colo320 et Colo320TP1). Colo320TP1 est une lignée Colo320 transfectée qui sur-exprime la TP. Des essais *in vitro* de survie cellulaire (Test au sulforhodamine B (SRB)) menés avec le 5'DFUR (durée d'incubation de 72h en présence du cytotoxique) ont mis en évidence une augmentation de la sensibilité des cellules Colo320TP1 vis-à-vis du 5'DFUR ($IC_{50} = 1,4 \pm 0,5 \mu M$). Cette sensibilité était environ 50 fois plus importante que la sensibilité observée pour les cellules contrôles ($IC_{50} = 64,0 \pm 3,1 \mu M$). Cette augmentation était inhibée lorsque les cellules Colo320TP1 étaient incubées avec du 5'DFUR en présence d'un inhibiteur de la TP, le Thyrosine Phosphorylase Inhibitor (TPI) (53).

Ainsi, au vu de son rôle clé dans l'activation des fluoropyrimidines (5'DFUR et Capecitabine), ces essais *in vitro* ont confirmé une plus grande efficacité de ces cytotoxiques contre les cellules sur-exprimant la TP.

c – Induction de la TP par les traitements anti-cancéreux.

A la fin des années 1990, des études *in vivo* menées sur des modèles de xénogreffes ont démontré que l'expression de la TP au niveau des tumeurs pouvait être induite par différents traitements anticancéreux.

En 1998, Sawada *et al.* ont testé différents cytotoxiques sur un modèle de xénogreffes murines (souris BALB/c *nu/nu*) avec la lignée WiDr (colon). Les cytotoxiques testés étaient : le Paclitaxel ; le Docétaxel ; la Mitomycine C ; la Doxorubicine ; le Cyclophosphamide ; la Vincristine ; la Vindésine ; la Vinblastine ; le Cisplatine et le Méthotrexate. La TP était déterminée par Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), l'anticorps monoclonal anti TP utilisé ne reconnaissant pas la TP murine. Les prélèvements de tumeurs furent effectués 8 jours après l'administration aux souris d'une dose donnée de cytotoxique. Par rapport aux souris non traitées, la TP a été fortement augmentée au niveau des souris traitées par le Paclitaxel, le Docétaxel et la Mitomycine C alors qu'elle était légèrement augmentée dans le cas des souris traitées par le Cyclophosphamide, la Vinblastine et la Vindésine. Les autres cytotoxiques n'ont pas donné de résultats significativement différents par rapport aux animaux contrôles non traités (54).

Enda *et al.* ont travaillé sur le même modèle murin avec des cellules de la lignée MX-1 (sein) et avec le Paclitaxel, le Docétaxel ; la Mitomycine C, la Doxorubicine, le Méthotrexate et le Cyclophosphamide. Les résultats obtenus étaient comparables à ceux de Sawada *et al.* : forte sur-expression de la TP par les taxanes (Paclitaxel et Docétaxel) ; la Mitomycine C et le Cyclophosphamide quatre jours après l'administration du cytotoxique aux souris (55).

En 1999, Sawada *et al.* ont testé l'effet d'une irradiation sur l'expression de la TP au sein de xénogreffes tumorales (souris BALB/c *nu/nu*). Les lignées tumorales utilisées étaient WiDr et HT-29 (Colon) ; SIHA (col de l'utérus) ; MKN-45 (cancer gastrique) et MX-1 (sein). Les xénogreffes étaient irradiées localement au jour J0 à des doses de 2,5 ou 5 Gy et l'expression de la TP était ensuite déterminée à J+6 et J+9 par ELISA. A l'exception des xénogreffes SIHA, toutes les tumeurs irradiées présentaient une sur-expression de la TP significative par rapport aux tumeurs non irradiées et ce dès le 6^{ème} jour (J+6) (56).

Lors de la même étude (56), les auteurs ont également voulu déterminer si, à la suite d'une irradiation globale des souris (dose d'irradiation = 5 Gy), la TP hépatique murine était induite. La mesure de la TP hépatique n'a pas été effectuée par une méthode ELISA du fait de l'absence d'un Anticorps spécifique de la TP murine. Elle a été déterminée à partir d'extraits de tissus hépatiques par une méthode enzymologique avec détermination de la synthèse de 5-FU à partir de 5'DFUR. A J+6, l'irradiation globale des souris induisait une augmentation de la TP tumorale de 9,4 fois ($7,5 \pm 0,7$ unités TP / mg de protéines) par rapport aux souris contrôles non irradiées : ($0,8 \pm 0,0$ unités TP / mg de protéines). En revanche, il n'a pas été mis en évidence d'effet de l'induction sur l'activité de la TP hépatique : (souris irradiées : $5,3 \pm 0,6$ μ g 5-FU synthétisés/mg protéine/h Vs souris non irradiées : $5,5 \pm 0,7$ μ g 5-FU synthétisés/mg protéine/h) (56).

La même équipe a également exploré la cinétique d'induction de la TP après une irradiation (2,5 et 5 Gy) sur des xénogreffes WiDr. Ainsi, l'induction a débuté aux alentours de J+3 et se maintient au delà de J+18 (Figure 7) (56).

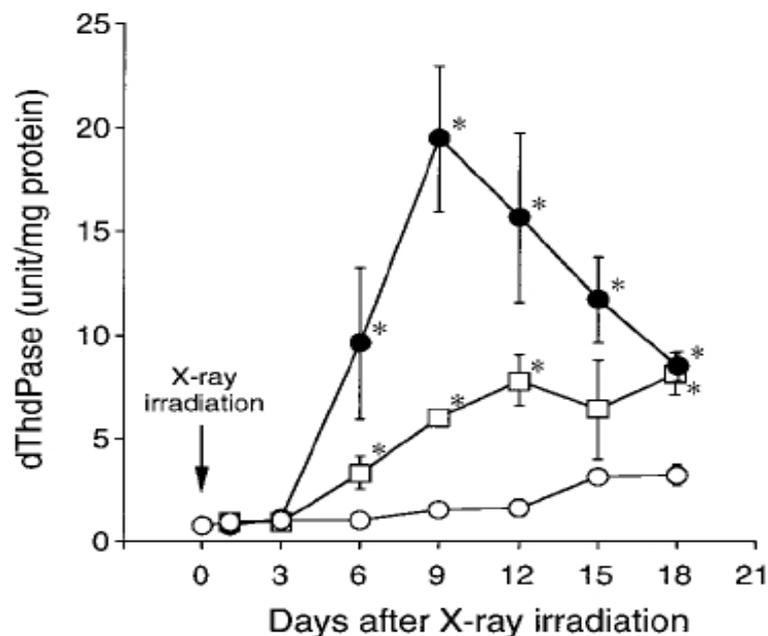


Figure 7 (56) : Effet de l'irradiation sur l'expression de la TP au niveau de la xénogreffe WiDr. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart type. * différence significative $p < 0,05$. ○ contrôle non irradié ; ● irradiation : 5 Gy ; □ irradiation 2,5 Gy.

L'induction de la TP par les anti-cancéreux a aussi été déterminée sur des modèles *in vitro*. Ainsi, en 2003, l'équipe de Milano a travaillé sur des cellules de la lignée CAL133 (tête et cou) et ont testé le Gefitinib (Iressa®). Le point intéressant de cette étude est que l'expression de l'enzyme (déterminée par RT-PCR quantitative) et son activité (déterminée par méthode enzymologique sur des lysats cellulaires : synthèse de 5-FU à partir de 5'DFUR) étaient explorées après 24 à 72 heures d'exposition des cellules au Gefitinib. Il a ainsi été mis en évidence, par rapport aux cellules contrôles non exposées au cytotoxique, une augmentation de l'expression de la TP ainsi que de son activité avec un maximum observé pour 48 heures d'exposition des cellules CAL133 au Gefitinib. Ces deux augmentations (expression et activité) étant corrélées l'une à l'autre (57).

Enfin, la surexpression de la TP induite par les cytotoxiques a aussi été observée lors d'essais cliniques.

En 2000, une étude clinique a été menée avec l'inclusion de huit patientes atteintes de cancer du sein avancé. Chez ces patientes un traitement néo-adjuvant par Docétaxel était administré et la détermination de la TP était effectuée par immunohistochimie avant et après ce traitement. 5 prélèvements sur 8 étaient positifs à la TP au début du traitement et, à la fin du traitement, 6 prélèvements présentaient une augmentation significative du marquage de la TP (58).

En 2004, Toi *et al.* a étudié 92 patientes atteintes de cancer du sein primaire (grade T2-4N0-1M0). Différents groupes de patientes ont été constitués afin d'administrer différents traitements anti-cancéreux :

- Adriamycine (ou Epirubicine) + Cyclophosphamide (14 patientes) ;
- 5-FU + Adriamycine (ou Epirubicine) + Cyclophosphamide (58 patientes) ;
- 5-FU + Adriamycine (ou Epirubicine) + Cyclophosphamide + Docétaxel (20 patientes).

L'expression de la TP a été déterminée par une technique d'immunohistochimie et l'induction était déterminée par la comparaison entre un prélèvement tumoral réalisé avant la chimiothérapie et un prélèvement tumoral effectué après la chimiothérapie.

Différentes corrélations ont exploré la relation entre l'évolution de l'expression de la TP et d'autres facteurs (ménopause ; présence de récepteurs aux oestrogènes ; taille de la tumeur, type de chimiothérapie). Les seules corrélations significatives trouvées l'ont été entre l'expression de la TP et les traitements anti-cancéreux.

La TP était particulièrement augmentée pour les patientes traitées par :

- « Adriamycine (ou Epirubicine) + Cyclophosphamide » (augmentation de la TP chez 92,9% des patientes)
- « 5-FU + Adriamycine (ou Epirubicine) + Cyclophosphamide + Docétaxel » (augmentation de la TP chez 65,0% des patientes).

Pour le traitement « 5-FU + Adriamycine (ou Epirubicine) + Cyclophosphamide », ces résultats étaient moins significatifs avec une augmentation de la TP chez 41,4% des patientes (59).

Ainsi, il semblerait que la TP ne soit pas induite selon la même intensité par tous les traitements cytotoxiques. Notamment, les traitements à base de 5-FU n'induisent pas une surexpression de la TP aussi importante que d'autres traitements anti-cancéreux. De plus, on observe parfois une diminution de l'expression de la TP chez des patientes traitées avec du 5-FU (59). Une hypothèse pour cette observation serait que de fortes concentrations de 5-FU puissent inhiber la TP, comme ce qui a été démontré pour certains produits synthétisés par la TP (e.g. la thymine) (16).

Concernant le mécanisme d'induction de la TP par les différentes thérapies cytotoxiques (irradiation, chimiothérapie), une des hypothèses serait que les traitements cytotoxiques induisant une mortalité importante au sein de la tumeur, le micro-environnement tumoral serait le lieu d'une intense réaction inflammatoire avec une augmentation de l'infiltration par les cellules immunitaires (notamment les macrophages). Cette infiltration conduirait à l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires qui induiraient à leur tour l'expression de la TP.

d – L'association Capecitabine et traitements inducteurs de la TP entraîne une amélioration de l'efficacité cytotoxique

Au vu de ces résultats, l'intérêt de l'association de deux cytotoxiques : l'un induisant la TP et l'autre étant un des dérivés fluoropyrimidiniques (5'DFUR ; Capécitabine) s'est posé.

Des études *in vivo* sur des modèles murins de xénogreffes (souris BALB/c *nu/nu*) avec des lignées WiDr (colon) et MX-1 (sein) ont été menées par les équipes de Sawada et de Endo. Ils ont testé l'efficacité anti-tumorale *in vivo* de plusieurs combinaisons de cytotoxiques : celles de traitements inducteurs de la TP (Docétaxel (54), Paclitaxel (54), Cyclophosphamide (55) avec des fluoropyrimidines (5'DFUR ou Capécitabine). Ces associations permettaient une régression de la tumeur significativement plus importante que lors de l'administration d'un seul des cytotoxiques de l'association (Figure 8).

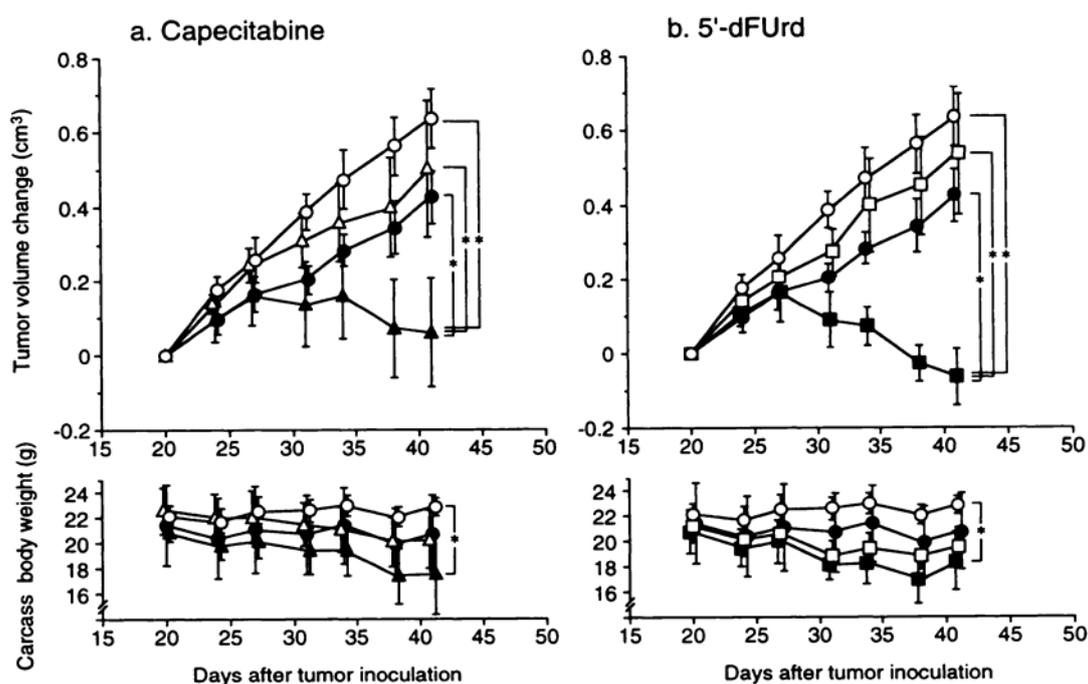


Figure 8 (54) : Evolution de la taille des tumeurs (WiDr) et de la masse des souris en fonction de l'association de cytotoxiques administrée. a. Capécitabine + Paclitaxel. b. 5'DFUR + Paclitaxel. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart type. * différence significative $p < 0,05$. o contrôle ; ● Paclitaxel seul ; ▲ Capécitabine+Paclitaxel ; △ Capécitabine seule ; □ 5'DFUR seul ; ■ 5'DFUR+Paclitaxel.

Des études cliniques ont également confirmé ces résultats chez des malades atteints de cancer du sein et de cancer colo-rectal à des stades plus ou moins avancés et traités par différentes associations de cytotoxiques (Tableau A).

Stade Cancer	Type étude	Traitements	Nombre de Patients	Résultats			Réf
				Médiane Temps sans Progression (mois)	Médiane Survie globale (mois)	Réponse objective au traitement %	
CANCER DU SEIN							
avancé / métastatique	Phase III	Docétaxel	256	4,2	11,5	30	(60)
		Docétaxel + Capecitabine	255	6,1	14,5	42	
avancé / métastatique / résistant aux anthracyclines	Phase II	Paclitaxel	20	3,1	9,4	26	(61)
		Cépacitabine	22	3,0	7,6	36	
avancé / métastatique / résistant aux anthracyclines	Phase II	Paclitaxel + Capécitabine	73	8,1	16,5	52	(62)
avancé / métastatique	Phase II	Paclitaxel + Capécitabine	47	10,6	29,9	51	(63)
CANCER COLO-RECTAL							
avancé / métastatique	Phase III	Capécitabine	>1200	4,6	12,9	25,7	(64)
		5-FU + Leucoveurine		4,7	12,8	16,0	
avancé / métastatique	Phase II	Capecitabine + Oxaliplatine	96	7,7	19,5	55	(65)

Tableau A : Résumé des essais cliniques menés sur des associations avec Fluoropyrimidines.

Ainsi, de façon globale, ces études cliniques ont permis de confirmer que l'association de fluoropyrimidines avec des anticancéreux inducteurs de la TP (Paclitaxel ; Docétaxel ; Cyclophosphamide ; Oxaliplatine ; Mitomycine C) permet d'obtenir une amélioration des taux de réponse tumorale ; de la durée sans progression de la maladie et de la survie globale des patients par rapport à l'administration d'un seul cytotoxique de l'association.

Ces résultats ont d'ailleurs permis d'envisager d'autres protocoles cliniques. Ainsi, récemment, une étude clinique de phase II a été mise en place afin de déterminer l'efficacité de l'association de la Capécitabine avec le Docétaxel. Cette association a été administrée comme traitement de première intention à des patientes atteintes de cancer du sein métastatiques. La particularité de ce protocole résidait dans le fait que les posologies de la Capécitabine comme celles du Docétaxel étaient faibles (respectivement 750 mg 2 fois par jour durant 14 jours (jours 1 à 14 du cycle) et 25 mg/m² aux jours 1 et 8 du cycle de 21 jours). Le but de cette association étant d'améliorer le rapport entre l'efficacité du traitement et la survenue d'effets indésirables (66).

e – L'expression de la TP tumorale est-elle un facteur prédictif de réponse aux traitements par les fluoropyrimidines ?

La question de l'efficacité de l'expression de la TP au niveau tumoral en tant que marqueur pronostic de bonnes réponses aux traitements par les fluoropyrimidines s'est rapidement posée.

En 2005, Han *et al.* ont publié les résultats d'une étude clinique de phase II menée chez 30 patients atteints de cancer du poumon avancés non à petites cellules. Ces patients étaient traités par l'association Docétaxel et Capécitabine et la TP était évaluée par immunohistochimie. Ils ont déterminé que l'expression de la TP au niveau des cellules tumorales était corrélée de façon significative à la bonne réponse au traitement (67).

Meropol *et al.* ont publié en 2006 des résultats d'une étude clinique de phase II. Les 67 patients inclus dans l'étude étaient atteints de cancers du colon métastatiques et le traitement (de première intention) était l'association Capécitabine

et Irinotécan. La TP était déterminée par immunohistochimie et par RT-PCR effectuée à partir des prélèvements tumoraux. La réponse objective au traitement ainsi que la survie globale des patients étaient corrélées à l'expression de la TP dans les tumeurs (68).

Récemment, au cours d'une étude de phase II menée sur 47 patientes atteintes de cancer du sein métastatique, le traitement était l'association de la Capécitabine avec le Docétaxel. La TP était déterminée par immunohistochimie et par RT-PCR quantitative. Chez les patientes dont la tumeur primaire exprimait la TP, il a été observé une plus longue durée sans progression de la maladie (69).

II – Protocoles expérimentaux mis en place

1 – Avant-Propos : les taxanes

La plupart de ces protocoles expérimentaux ont été mis en place afin de pouvoir étudier l'induction de la TP par les taxanes. Les taxanes sont des molécules cytotoxiques qui inhibent la dépoliarisation des microtubules, bloquant les cellules au cours de leur cycle cellulaire et entraînant ainsi la mort cellulaire. Le premier taxane commercialisé en 1993 par Bristol-Myers Squibb[®] a été le Paclitaxel (Taxol[®] ; PTX). Le Paclitaxel est un composé extrait de l'écorce de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*). Il est indiqué dans les cancers du sein avancés ou métastatiques, les cancers des ovaires et les cancers du poumon non à petites cellules (49). Le second taxane commercialisé est le Docétaxel (Taxotère[®] ; DTX), développé par Sanofi-Aventis[®] et mis sur le marché en 1995. Il s'agit d'un dérivé hémisynthétique issu d'extraits d'aiguilles de l'if européen (*Taxus bacatta*). Ses indications sont les cancers du sein, les cancers gastriques avancés, les cancers de la prostate et les cancers bronchiques non à petites cellules (49).

L'efficacité de ces molécules ainsi que les indications communes avec les fluoropyrimidines justifient leur association. De plus, nous avons précédemment décrit que le Paclitaxel et le Docétaxel avaient le pouvoir d'induire la TP au sein des cellules tumorales.

A ce jour, de nouveaux dérivés des taxanes sont testés cliniquement. On peut ainsi raisonnablement se demander si ces futurs médicaments présentent un potentiel d'induction de la TP, ce qui rendrait leur association avec la Capécitabine particulièrement intéressante. La mise au point d'un modèle permettant de répondre à cette problématique est la thématique du travail qui suit.

Dans les résultats que nous vous présentons ci-après, le terme « taxoïde » désignera un de ces dérivés des taxanes dont nous souhaitons étudier le potentiel d'induction de la TP. De plus, au vu de la littérature, nous avons choisi le Docétaxel (DTX) comme notre témoin positif d'induction de la TP.

2 – Mise en évidence de l'induction de la TP

a – Détermination de la synthèse du 5-FU

► Rationnel

Comme décrit précédemment, la TP est une enzyme clé dans le métabolisme des fluoropyrimidines. Elle catabolise le 5'DFUR en 5-FU. Ainsi, lorsque l'on ajoute une quantité constante de substrat (5'DFUR) dans un milieu contenant l'enzyme, on peut considérer que la quantité de produit (5-FU) synthétisé en un temps déterminé doit correspondre à la quantité de l'enzyme présente dans le milieu.

Pour objectiver l'induction de la TP par les taxanes à partir de cellules de lignées du sein ou du colon, nous avons mis en place un modèle pharmacologique dont le principe est une double incubation successive des cellules tumorales. La première se fait en présence des taxanes (Docétaxel et taxoïde) pendant une période déterminée afin d'induire la TP sans pour autant induire une mortalité trop importante des cellules. La seconde incubation s'effectue sur les cellules vivantes issues de la première incubation en présence de 5'DFUR en concentrations sub-toxiques (Figure 9)

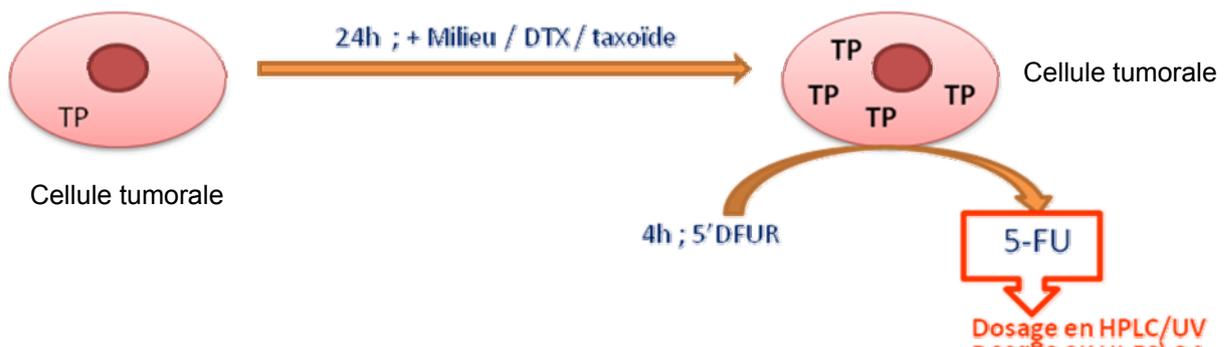


Figure 9 : Principe du modèle pharmacologique d'étude *in vitro* de l'induction de la TP par les taxanes.

TP : Thymidine Phosphorylase ; 5'DFUR : 5'Fluoro-5-DeoxyUridine ; 5-FU : 5-FluoroUracile ;

HPLC/UV : Chromatographie Liquide Haute Performance/détecteur UV.

L'induction de la TP est alors objectivée en comparant les concentrations de 5-FU synthétisé par les cellules tumorales pré-incubées avec inducteurs (DTX et

taxoïde) avec les concentrations de 5-FU synthétisé par les cellules tumorales pré-incubées sans inducteurs (cellules contrôles).

Les concentrations de 5-FU synthétisé par les cellules sont déterminées par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à un détecteur Ultra-violet (HPLC/UV) après une phase d'extraction du 5-FU à partir du milieu de culture.

► Matériel et Méthodes

Les cellules utilisées sont issues de lignées de cancer du sein (MCF-7 ; MDA-MB-231). Les cellules MCF-7 expriment des récepteurs aux estrogènes alors que les cellules MDA-MB-231 ne les expriment pas (70). Nous avons aussi travaillé sur une lignée de cancer du colon (HT-29). Elles sont maintenues dans du milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) complété de 5% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) et cultivées en incubateur à 37°C et à 5% de CO₂.

Les cytotoxiques : Paclitaxel (Taxol[®] ; PTX) ; Docetaxel (Taxotère[®] ; DTX) ont été fournis gracieusement par l'Unité Centralisée de Reconstitution des chimiothérapies anticancéreuses (UCR) du Centre Hospitalier Universitaire Jean Minjot de Besançon. Le 5'DFUR, le 5-FU et le 5-Fluoro-Cytosine (5-FC) ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich[®]. La chaîne HPLC utilisée pour doser le 5-FU est une chaîne SpectraSystem[®] (Thermo[®]) couplée à un détecteur à barrettes de diodes UV6000LP[®] de la même marque. La colonne HPLC utilisée est une Polaris[®] 5 C18-A 250 x 4,6 mm (VARIAN[®]). Les produits chimiques utilisés pour l'extraction du 5-FU et pour la composition du solvant d'éluion ont été fournis par Carlo Erba[®] et sont tous de qualité HPLC.

L'extraction du 5-FU à partir du milieu de culture a été adaptée du protocole utilisé en routine dans le laboratoire de Pharmacologie Clinique et Toxicologie du CHU Jean Minjot de Besançon. Il s'agit d'une double extraction liquide/liquide. Un volume constant (3 µL) de standard interne (5-FC) est ajouté à tous les échantillons (volume : 500 µL). 40 µL d'une solution d'acétate de sodium 0,5 M pH 4,8 sont ajoutés dans les échantillons qui sont vortexés. 250 µL d'une solution de sulfate de sodium (200 g/L) sont ensuite ajoutés aux échantillons de même que 7,5 mL du solvant d'extraction préparé extemporanément (mélange de 84% de diéthyl éther et de 16 % de n-propanol (v/v)) sont ajoutés. Les tubes sont agités 20 minutes sur un

agitateur à rouleaux puis centrifugés 5 minutes à 3000 tours/min. La phase organique est récupérée puis le deuxième solvant d'extraction est ajouté dans chaque tube : 300 µL de tampon phosphate KH₂PO₄ (50 mM ; pH 11). Les tubes sont vortexés puis la phase organique est aspirée. 5 µL de solution d'acide sulfurique 1 N sont ensuite ajoutés aux échantillons qui peuvent alors être injectés en HPLC (volume d'injection : 80 µL). Les temps de rétention pour le Standard Interne (5-FC) est d'environ 3,60 minutes et pour le 5-FU, d'environ 4,80 minutes. La détection du 5-FU se fait à la longueur d'onde de 262 nm.

Les points de gamme du 5-FU correspondent aux concentrations suivantes (Tableau B).

µg/L	G1	G2	G3	G4	G5
5-FU	20	40	80	200	400

Tableau B : Concentrations de points de gamme pour le dosage du 5-FU en HPLC/UV.

Les concentrations des échantillons sont calculées d'après la courbe de régression linéaire calculée à partir des points des gammes. Le graphique de la gamme est établi avec les concentrations du Tableau B en abscisse et, en ordonnée, le rapport entre la hauteur du pic du 5-FU par rapport au pic du 5-FC (hauteurs calculées à partir des chromatogrammes)

► Mise au point du modèle

La mise au point de ce modèle pharmacologique d'étude *in vitro* de l'induction de la TP a été faite en plusieurs étapes pour lesquelles nous avons ajusté les différents paramètres (durée d'incubation avec le 5'DFUR, concentration du 5'DFUR, etc) afin d'avoir les résultats les plus reproductibles possibles et de minimiser la mortalité cellulaire induite par le 5'DFUR. Les différences entre les étapes de la mise au point de ce modèle sont résumées dans le Tableau C.

Ainsi, dans un premier temps (expériences A) nous avons cultivé les cellules tumorales à la densité de 1 million de cellules par puit. La première incubation des cellules avec les taxanes se faisait selon le temps déterminé puis, le 5'DFUR était ajouté directement dans chaque puit de culture à la concentration de 100 µg/L. 24

heures après, le milieu de culture était récupéré et congelé à -20°C en attendant le dosage du 5-FU. Les premières expériences menées sur des cellules HT-29 afin de tester différentes concentrations de PTX et les durées de pré-incubations de 24 et 48 heures ont donné des résultats encourageants. Les cellules incubées avec du PTX avaient des concentrations plus importantes de 5-FU aux deux temps par rapport aux cellules contrôles. Néanmoins, cette méthodologie présentait un biais important : la mortalité induite par les traitements cytotoxiques. Cette mortalité provoque une différence importante du nombre de cellules en fonction des concentrations de cytotoxiques testées et donc l'impossibilité de comparer objectivement les concentrations de 5-FU pour chacune des conditions testées.

	Densité cellulaire par puit	Harmonisation du nombre de cellules avant incubation avec le 5'DFUR	Durée incubation avec 5'DFUR (heures)	Concentration 5'DFUR (µg/L)	Divers
A	1 million de cellules	Non	24	100	Incubation 5'DFUR + Taxanes
B	2 millions	Comptage cellules survivantes et correction concentration 5-FU par nombre cellules	24	100	Incubation 5'DFUR + Taxanes
C	Variable	Comptage cellules survivantes et Mise en Plaques à la même densité / puit	24	100	Incubation 5'DFUR + Taxanes
D	Variable	Comptage cellules survivantes et Mise en Plaques à la même densité / puit	4	10000	Incubation 5'DFUR seul

Tableau C : Caractéristiques des étapes successives de la mise au point du modèle pharmacologique d'étude *in vitro* de l'induction de la TP.

Dans un deuxième temps (expériences B), après la pré-incubation avec les taxanes, nous avons réalisé un comptage des cellules survivantes. Suite à ce comptage, nous avons effectué une remise en culture de ces cellules à une densité cellulaire définie et connue. La concentration de 5-FU mesurée pour chacune des conditions était ensuite corrigée par cette densité afin de compenser la mortalité induite par la pré-incubation des cellules avec les taxanes. Là encore, les résultats étaient satisfaisants avec la mise en évidence d'une induction de la TP pour les cellules HT-29 mises en présence de PTX. Néanmoins, cette correction mathématique ne nous satisfaisait pas car il nous semblait qu'elle était trop artificielle et systématique.

Nous avons alors décidé de pré-incuber avec les taxanes un nombre différent de cellules tumorales, sachant que les cellules survivantes seraient comptées et remise en culture à la même densité cellulaire quelle que soit la concentration de taxanes considérée et la mortalité induite (expériences C). Cette méthodologie nous a permis de mieux comparer les différentes conditions testées et de limiter au maximum le biais de la mortalité induite par la pré-incubation avec les taxanes. Néanmoins, à la fin des deux incubations successives (celle avec les taxanes seuls et celle comprenant le 5'DFUR en plus), nous avons constaté une mortalité importante pour les différentes conditions. Or, nous voulions aussi limiter ce phénomène durant l'incubation des cellules avec le 5'DFUR.

C'est pourquoi, afin de réduire cette mortalité, nous avons choisi des conditions différentes d'incubation avec le 5'DFUR (expériences D). Nous avons choisi une durée d'incubation plus courte (4 heures au lieu de 24 heures) en conservant la même concentration de 5'DFUR (100 ng/mL). Néanmoins, devant les faibles concentrations de 5-FU dosées (la limite de quantification de notre technique de dosage était atteinte) nous avons décidé d'augmenter la concentration de 5'DFUR (5 puis 10 mg/L au lieu de 100 µg/L). Ces augmentations n'induisant pas une augmentation de la mortalité cellulaire à quatre heures d'incubation, nous avons décidé de conserver les modalités « D » pour notre modèle. Ainsi, nous avons pu obtenir une meilleure reproductibilité entre les différentes expériences. De même, la mortalité observée à la fin des quatre heures d'incubation des cellules en présence du 5'DFUR était négligeable et comparable entre les différentes conditions de pré-

incubations. Enfin, les concentrations de 5-FU synthétisées étaient bien quantifiables par notre méthode de dosage.

Cette volonté de normaliser la densité cellulaire lors de nos expériences a été confortée par une expérience où les cellules HT-29 étaient mises en culture pendant 24 heures à des densités cellulaires différentes, normalisées à 1 million de cellules par puit et incubées pendant 4 heures avec du 5'DFUR. Les résultats sont présentés Figure 10. Nous avons observé des concentrations de 5-FU plus importantes lorsque les cellules étaient fortement en confluence (conditions 15 et 6 millions) par rapport à des densités cellulaires plus faibles (4,5 ; 3 et 1,5 millions).

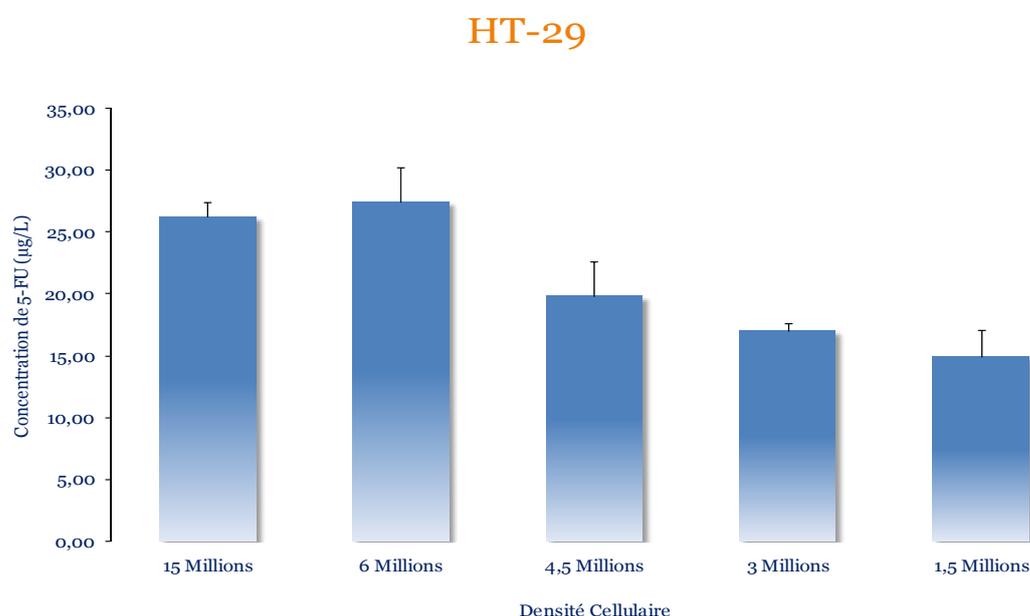


Figure 10 : Concentrations de 5-FU mesurées suite à l'incubation à différentes densités cellulaires de cellules de lignées du colon HT-29 (4 heures – 10 mg/L de 5'DFUR). Les résultats sont exprimés sous la forme de moyennes et d'écart-type.

Nous avons alors testé notre modèle sur les lignées de cancer du sein (MCF-7 et MDA-MB-231) à notre disposition. Nous avons aussi testé le potentiel d'induction de la TP du DTX à différentes concentrations afin de déterminer la meilleure condition pour être le témoin positif d'induction de la TP lors des tests sur les lignées de cancer du sein.

► Résultats

Suite à l'incubation de cellules tumorales de lignées du sein (MCF-7 et MDA-MB-231) avec différentes concentrations de Taxanes : 100 ; 10 ; 1 ; 0,1 et 0,01 ng/mL de taxoïde et 80 ng/mL de DTX pour 24 heures, nous avons obtenu les résultats illustrés dans la Figure 11.

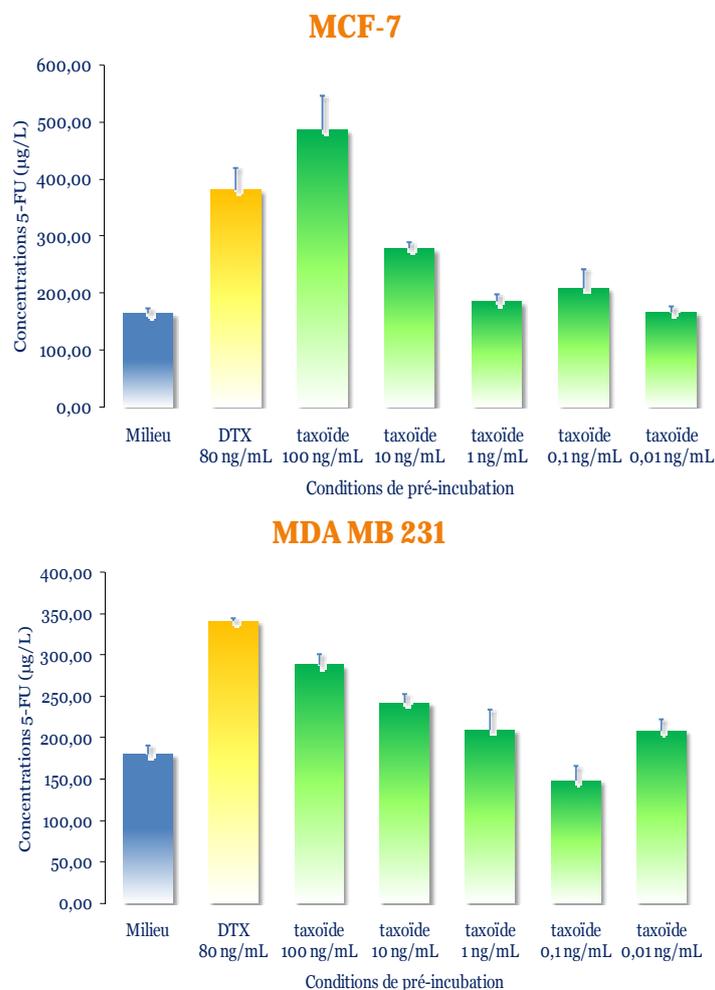


Figure 11 : Concentrations de 5-FU mesurées suite à l'incubation pendant 4 heures de cellules de lignées du sein (MCF-7 ; MDA-MB-231) en présence de 5'DFUR à la concentration de 10 mg/L et suite à différentes conditions de pré-incubation en présence de taxanes. Résultats exprimés sous la forme de moyennes et écarts-type.

Pour les cellules MCF-7, les concentrations de 5-FU synthétisées par les cellules contrôles incubées sans inducteurs étaient aux alentours de 160 µg/L. Pour notre contrôle positif d'induction de la TP (80 ng/mL de DTX), les concentrations dosées de 5-FU étaient environ 2,5 fois plus importantes avec des concentrations de l'ordre de 400 µg/L. Nous avons aussi pu observer une augmentation de la synthèse

du 5-FU dans les cellules tumorales induites par le taxoïde pour les concentrations suivantes : 100 et 10 ng/mL. Les concentrations de 5-FU dosées étant respectivement 3 et 1,5 fois supérieures à celles observées pour les cellules incubées sans inducteurs.

Pour les cellules de la lignée MDA-MB-231, nous avons aussi pu objectiver des concentrations de 5-FU plus importantes pour notre contrôle (80 ng/mL de DTX) et pour le taxoïde aux concentrations de 100 et 10 ng/mL. Néanmoins, l'induction par rapport aux cellules contrôle non induites était moins importante que celle observée pour les cellules de la lignée MCF-7.

Cette induction a été observée tant pour le PTX sur les cellules HT-29 que pour le DTX et le taxoïde sur les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. De plus, elle n'est observée que pour les concentrations élevées de cytotoxiques.

b – Détermination de la synthèse de la TP

► Rationnel

Afin d'étudier de façon plus précise l'induction de la TP par les taxanes, nous avons développé une technique de Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction temps réel et quantitative (RT-qPCR). En effet, cela nous permet la détermination et la quantification des Acides RiboNucléiques messagers (ARNm) du gène de la TP. Nous cherchons à mettre en évidence l'induction par les taxanes de la transcription du gène de la TP en ARNm. Cela relierait l'augmentation de la synthèse de 5-FU observée avec notre modèle pharmacologique avec la synthèse de la TP.

► Matériel et Méthodes

Les cellules utilisées (MDA-MB-231) ont été cultivées de la même façon que celle décrite ci-avant. L'extraction des ARN totaux a été effectuée en utilisant du TRIzol[®] (Invitrogen[®]) et en suivant les recommandations du fabricant. La préparation des échantillons pour la RT-qPCR a été effectuée avec un kit QuantiTect[®] (Qiagen[®]) en suivant les instructions données. La qPCR en elle-même est réalisée sur un LightCycler[®] 480 (Roche[®]).

Les cellules tumorales sont incubées avec les taxanes selon les mêmes conditions que celles utilisées pour la détermination des concentrations de 5-FU. Les durées d'incubation étaient les suivantes : 0h ; 1h ; 4h ; 24 heures. 3 conditions ont été testées : Milieu de culture (cellules contrôles) ; DTX à 80 ng/mL et taxoïde à 100 ng/mL.

A la fin de l'incubation, les cellules survivantes sont récupérées, les ARN totaux extraits et congelés à -80°C. Ensuite, la quantité d'ARN totaux pour chaque condition est quantifiée par spectrophotométrie. Les ARN totaux sont traités par la Reverse Transcriptase (RT), qui nous permet d'obtenir l'ADN complémentaire (ADNc). Cet ADNc est ensuite amplifié en qPCR avec deux types d'amorces, une amorce spécifique du gène de la TP et l'autre, spécifique d'un « gène de ménage » qui est exprimé de façon constante par la cellule, la $\beta 2$ microglobuline. La quantité d'ADNc de chaque échantillon est obtenue grâce à l'emploi de deux gammes de nombres croissants de copies (une gamme pour chaque gène). Les résultats sont exprimés par le rapport entre le nombre de copies des ADNc du gène d'intérêt (TP) sur le nombre de copies des ADNc du gène de ménage ($\beta 2$ microglobuline), ce qui nous permet de prendre en compte l'état basal de transcription du génome.

► Résultats

Les résultats obtenus sur la lignée MDA-MB-231 sont illustrés par la Figure 12. On observe ainsi un nombre plus important d'ARNm de la TP pour les cellules incubées en présence de taxanes dès 4 heures après l'induction.

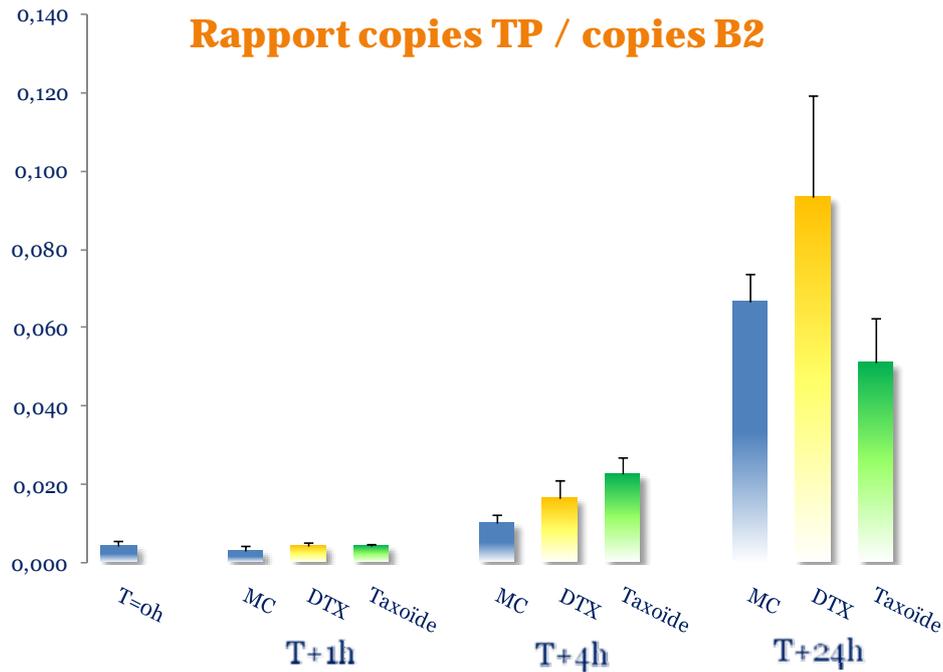


Figure 12 : Transcription du gène de la TP par des cellules MDA-MB-231 incubées en présence de taxanes (DTX à 80 ng/mL) et Taxoïde (100 ng/mL) pour des durées d'incubations de 1, 4 et 24 heures. Résultats exprimés sous la forme de moyennes et écarts-type du nombre de copies d'ADNc de la TP par rapport au nombre de copies d'ADNc de la β 2-microglobuline.

c – Quantification de la TP au niveau intracellulaire

► Rationnel

En parallèle à la mise au point de la technique de RT-qPCR et toujours dans le but de vouloir étudier le mécanisme de l'induction de la TP de façon plus précise, nous avons cherché à quantifier directement la TP au niveau intracellulaire.

Nous avons donc réalisé des Western Blot spécifiques de la TP. La technique utilise l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide « Sodium dodécyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis » (SDS-PAGE) pour séparer les protéines.

Cette technique permet de séparer des protéines selon leur poids moléculaire lors de leur migration dans un gel sous l'effet d'un champ électrique. Le gel est créé par la polymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide. La grosseur des pores formés est fonction de la concentration d'acrylamide. Plus cette concentration est

élevée, plus les pores seront petits. Cela permet de mieux séparer les molécules de petits poids moléculaires.

La particularité de la technique de SDS-PAGE est la présence dans le gel d'un agent dénaturant : le Sodium Dodécyl Sulfate (SDS). Ce détergent puissant se lie à la protéine *via* ses régions hydrophobes. Il empêche alors la protéine de se replier et lui confère une charge négative. Ainsi, ces protéines dénaturées ne seront séparées au cours de leur migration dans le gel que selon leur masse moléculaire.

Les protéines sont ensuite transférées du gel sur une membrane en nitrocellulose où elles sont exposées à un Anticorps (Ac) spécifique de la protéine d'intérêt : l'anticorps primaire qui est révélé par un Ac secondaire couplé à une peroxydase. Cette enzyme aboutit à la synthèse d'un substrat luminescent à partir d'un réactif spécifique. La lumière émise sera alors captée par une caméra et l'image analysée par ordinateur. L'intensité de la lumière émise correspond à la quantité de protéine d'intérêt présente sur la membrane.

► Matériel et Méthodes

Les cellules utilisées (MCF-7) sont cultivées de la même façon que décrite précédemment.

L'Ac monoclonal primaire anti TP d'origine murine (SC-47702 – Clone PGF-44C) a été acheté chez Santa Cruz®. Les modes opératoires et le matériel utilisé pour le Western Blot sont ceux validés et utilisés en routine au sein de l'UMR 645 (EFS Bourgogne Franche Comté).

Après avoir incubé les cellules en présence de différentes concentrations de taxanes sur 24 heures (DTX à 80 ng/mL ; Taxoïde : 100 à 1 ng/mL), les cellules survivantes sont trypsinées, lavées et congelées à -80°C sous forme de culot sec. Les cellules sont ensuite détruites par ultrasons et la concentration protéique de chaque échantillon est déterminée par un test à l'acide bicinchoninique (BCA). Entre temps, les gels de polyacrylamide (à 8,5%) sont coulés et montés sur les cuves de migration électrophorétique de la marque BioRad®. Pour chaque échantillon, 40 µg de protéines totales sont déposés sur le gel pour la migration. Celle-ci achevée, le transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose est effectué. La membrane

est ensuite incubée pendant 2 heures dans une solution bloquante à base de lait puis incubée toute la nuit à +4°C avec l'Ac monoclonal anti TP à la concentration de 3,3 µg/mL. La membrane est soigneusement lavée puis incubée pendant une heure avec l'Ac secondaire anti-murin au 1/3000. Après plusieurs lavages soigneux de la membrane, l'Ac secondaire couplé à la peroxydase est révélé par un réactif chimioluminescent. La membrane est numérisée grâce à une caméra CCD Chemi-smart 3126® de chez Vilber Lourmat® et le signal est informatisé.

► Résultats

Nous sommes parvenus à mettre en évidence dans nos échantillons une bande d'électrophorèse dont la migration correspond au poids moléculaire de la TP : 44 KDa. Néanmoins, le marquage de cette bande était relativement faible et ne permettait pas une quantification efficace de la TP. Cependant, nous distinguons une légère différence d'intensité entre les cellules contrôles non incubées avec les Taxanes et les cellules incubées avec le DTX et les concentrations de taxoïde à partir de la concentration de 10 ng/mL (Figure 13)

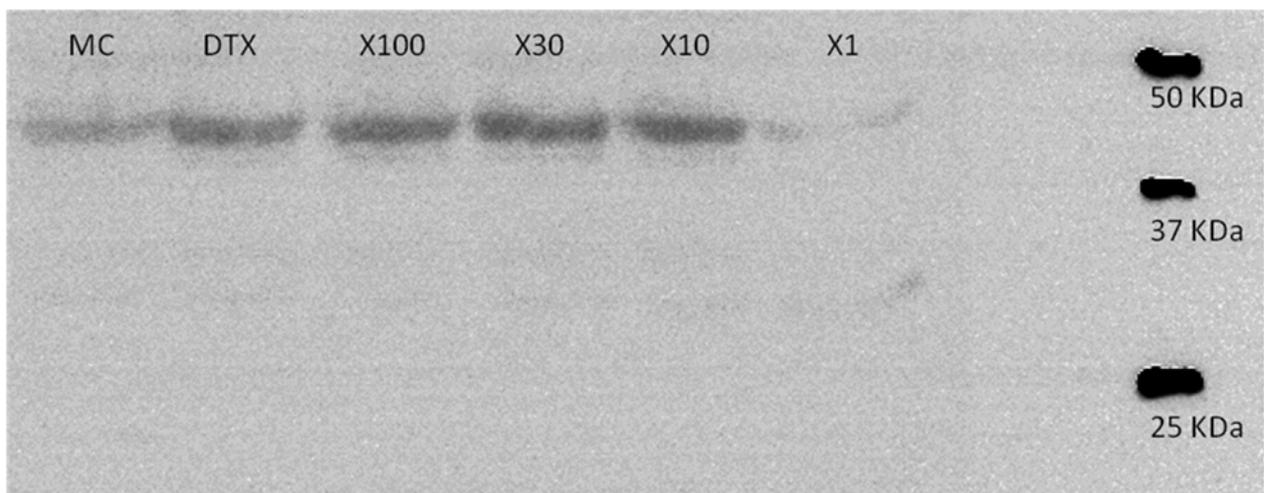


Figure 13 : Western Blot de cellules MCF-7 après incubation pendant 24 heures en présence de différentes concentrations de taxanes. MC : sans taxanes ; DTX : 80 ng/mL de DTX ; X100, X30, X10 et X1 : 100, 30, 10 et 1 ng/mL de taxoïde.

Les marqueurs de migration sont sur la droite du Western Blot.

Afin de confirmer cette observation et de quantifier de façon objective l'intensité des bandes correspondant à la TP, des essais avec différentes concentrations de l'Ac anti TP ont sont actuellement en cours.

d – Localisation de la TP au niveau intracellulaire : technique d'immunocytochimie

► Rationnel

D'autres techniques comme l'immunocytochimie permettent une détermination des protéines au niveau intra-cellulaire. Cette technique consiste à fixer les cellules puis à les inclure dans un bloc de résine que l'on va découper au microtome afin d'obtenir des lames. Les cellules sont ensuite marquées avec l'Ac primaire anti-TP qui sera ensuite révélé par un Ac secondaire couplé à la peroxydase. L'ensemble est révélé par un chromogène (le 3,3'-Diaminobenzidine (DAB)) substrat de la peroxydase qui va produire un colorant de couleur marron.

► Matériel et Méthodes

Les cellules utilisées (MCF-7) ont été cultivées de la même façon que celle décrite précédemment.

L'Ac monoclonal primaire anti TP d'origine murine (clone PGF-44C) a été obtenu chez Thermo®.

Le matériel et les protocoles d'immunocytochimie sont ceux utilisés en routine par le personnel du laboratoire d'Anatomie-Pathologie du CHU de Besançon.

Des cellules MCF-7 sont incubées pendant 24 heures en présence du taxoïde à la concentration de 100 ng/mL. Les cellules incubées ainsi que les cellules non incubées (contrôle) sont lavées, mises en culot puis immédiatement centrifugées et fixées grâce au fixateur RCL2®. Chaque culot est ensuite disposé sur un automate Tissue-TeK® VIP® qui complétera successivement la fixation des cellules, les déshydratera et les imprénera avec de la paraffine chaude. Cette phase d'imprégnation dure toute la nuit. Les culots sont ensuite récupérés et inclus manuellement par un opérateur dans de la paraffine chaude. Les blocs de paraffine ainsi formés sont montés sur un microtome pour des coupes d'une épaisseur de 5 à

6 μm . Les coupes sont montées sur des lames et sont ensuite marquées avec l'Ac anti TP (au 1/200) et révélées par un automate spécifique Benchmark® XT de la marque Ventana®.

► Résultats

Les résultats de cette technique d'immunocytochimie sont présentés Figure 14.

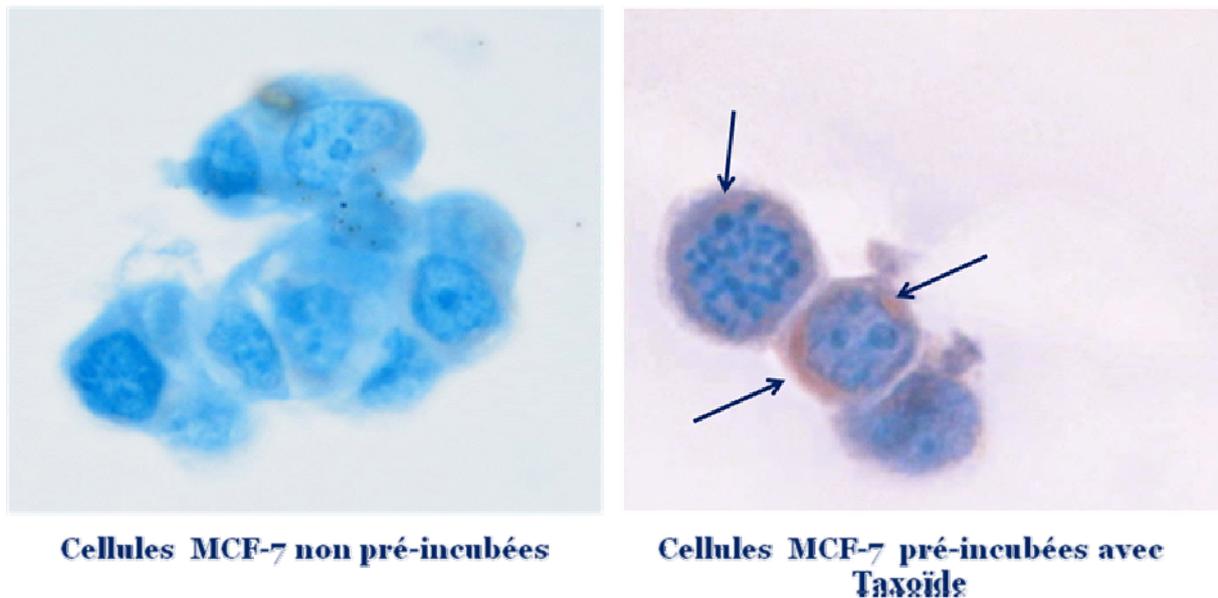


Figure 14 : Marquage de la TP par immunocytochimie. Images obtenu par microscopie optique de cellules tumorales MCF-7 incubées sans taxanes et après incubation avec la concentration de 100 ng/mL.

Ainsi, sur une seule expérience, nous avons pu mettre en évidence la présence dans le cytoplasme des cellules, d'une coloration brune spécifique du marquage de la TP uniquement dans les cellules MCF-7 incubées pendant 24 heures en présence du taxoïde. *A contrario*, les cellules contrôles non incubées avec le taxoïde ne présentaient aucune coloration brune.

e – Localisation de la TP au niveau intracellulaire : technique de microscopie confocale

Nous avons également étudié l'induction de la TP ainsi que sa localisation intracellulaire par microscopie confocale (Olympus® Fluoview® SV1000).

Nous avons fait des essais en réalisant un double marquage intracellulaire avec l'Ac monoclonal murin anti TP (SC-47702) révélé par un Ac secondaire anti murin couplé au fluorochrome « Fluoresceine Iso Thio Cyanate » (FITC). Le noyau des cellules est révélé par le « 4',6-diamidino-2-phenylindole » (DAPI) qui ne se fixe que sur l'ADN.

La Figure 15 illustre les premiers résultats que nous avons obtenus sur des cellules de la lignée MCF-7.

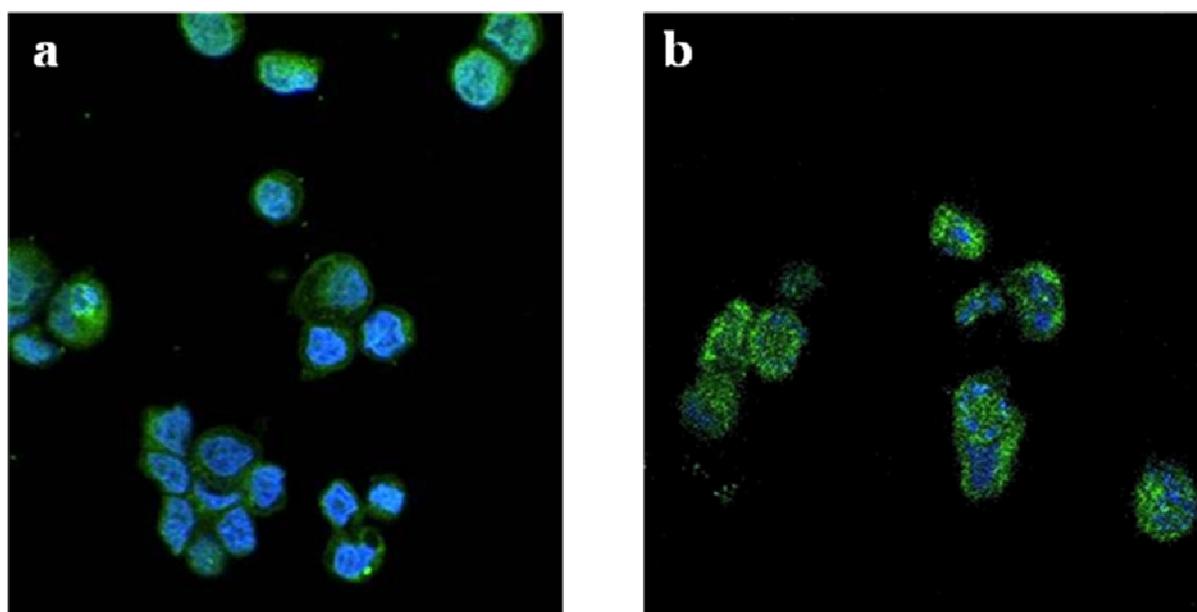


Figure 15 : Marquage de la TP par microscopie confocale. a : Cellules MCF-7 non incubées. b : Cellules MCF-7 incubées pendant 24 heures avec un taxoïde à la concentration de 100 ng/mL. Le marquage vert correspond au FITC (TP). Le marquage bleu correspond au DAPI (noyau).

Nous avons observé un marquage de la TP plus important au sein des cellules pré-incubées avec le taxoïde à la concentration de 100 ng/mL par rapport

aux cellules cultivées avec uniquement le milieu de culture (cellules contrôles). De plus, dans ces cellules contrôles, nous avons mis en évidence une localisation de la TP au sein du cytoplasme comme au sein du noyau (Figure 16).

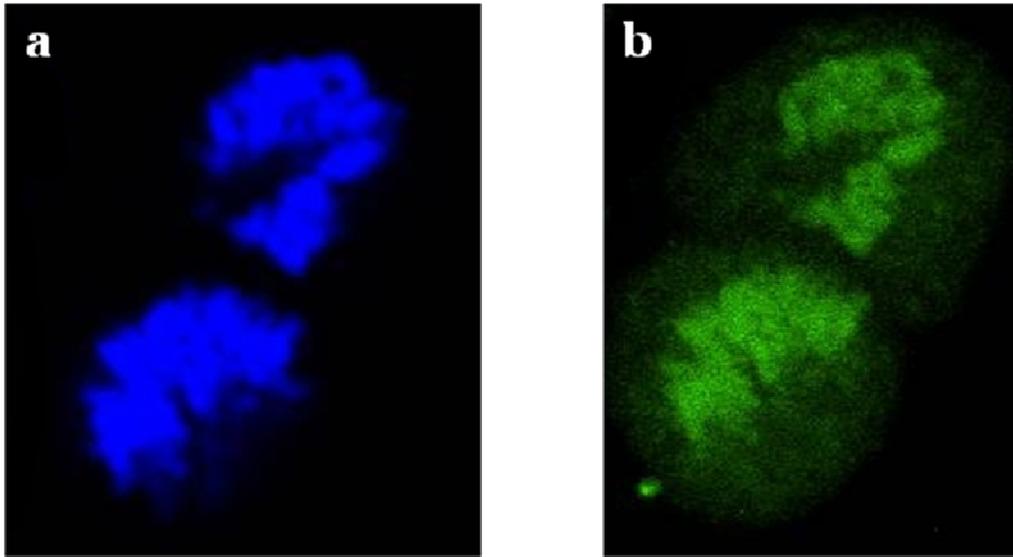


Figure 16 : Marquage de la TP par microscopie confocale de cellules MCF-7 non incubées en présence de taxanes. Les deux photos sont prises sur les mêmes cellules. a : marquage du noyau (DAPI). b : marquage de la TP (FITC).

f – Induction de la mortalité cellulaire due au 5'DFUR

► Rationnel

Un autre modèle qui nous permet de mettre en évidence l'induction de la TP par les taxanes consiste à mettre en évidence une différence de l'effet cytotoxique du 5'-DFUR entre les cellules tumorales pré-incubées avec les taxanes et les cellules contrôles (pré-incubées sans taxanes). Puisque l'effet cytotoxique du 5'DFUR est exercé par le 5-FU après métabolisation par la TP, nous nous attendons à un plus grand effet cytotoxique du 5'DFUR sur les cellules pré-incubées avec les taxanes.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des tests de survie cellulaire, le test au MTT. Le MTT est un composé qui est réduit par les cellules métaboliquement actives. Il en résulte la formation au sein de ces cellules viables d'un composé coloré pourpre/violet (le formazan) qui peut être solubilisé et quantifié par spectrophotométrie d'absorption.

► Matériel et Méthodes

Les cellules utilisées (MCF-7 et MDA-MB-231) ont été cultivées de la même façon que celle décrite précédemment.

Le MTT est acheté par Sigma-Aldrich[®]. Le DiMéthyl Sulfoxyde (DMSO) était acheté chez Braun[®].

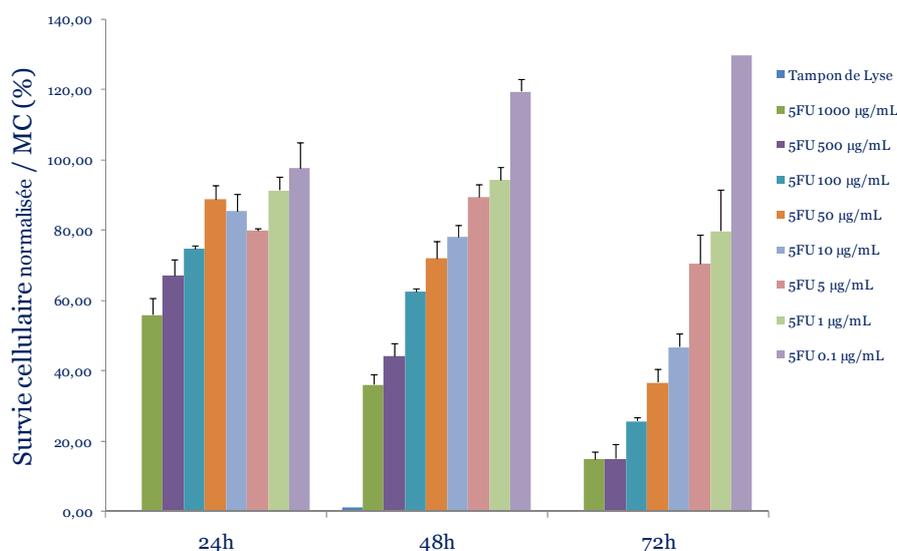
Les cellules tumorales sont incubées dans des plaques 24 puits à la densité de 20000 cellules par puit. Les cellules sont pré-incubées avec les taxanes à différentes concentrations : 1 à 100 ng/mL pendant 24 heures. Le milieu de culture est éliminé (de même que les cellules mortes) puis du milieu contenant du 5'DFUR à la concentration de 10 mg/L est ajouté pendant 72 heures. Après l'incubation des cellules avec le 5'DFUR, le milieu de culture est éliminé et 1 mL de la solution de MTT à la concentration de 0,5 mg/mL est ajoutée dans chaque puit. Les cellules sont incubées pendant quatre heures. A la fin de cette incubation, le MTT est éliminé et 1 mL de DMSO est ajouté afin de solubiliser le colorant pourpre formé à partir du MTT par les cellules viables. Après homogénéisation du colorant, la densité optique de chaque puit est ensuite lue par un spectrophotomètre ELX800 UV (BioTek[®]) à la longueur d'onde de 490 nm. Cette densité optique est proportionnelle au nombre de cellules survivantes dans chaque puit.

Les résultats de survie cellulaire pour chaque condition sont exprimés par rapport à 100 % de survie cellulaire défini par la Densité Optique observée pour des cellules cultivées uniquement dans du milieu de culture (sans taxanes et sans 5'DFUR). Une condition contrôle était ajoutée : elle consiste en l'incubation de cellules pendant 72h avec un tampon de lyse afin d'obtenir 0% de survie cellulaire.

► Résultats

Avant de réaliser ces expériences, nous avons effectué des expériences de cytotoxicité du 5-FU vis-à-vis des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 afin de sélectionner les meilleures conditions d'incubation de ces cellules en présence du 5'DFUR. Les résultats de ces expérimentations sont montrés en Figure 17.

MCF-7



MDA MB 231

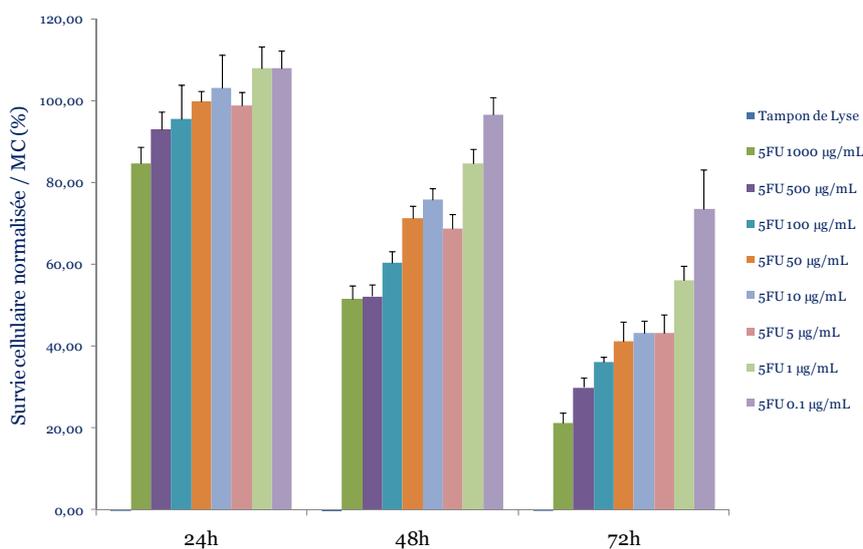


Figure 17 : Survie cellulaire (lignées MCF-7 et MDA MB 231) à 24 ; 48 et 72 heures d'incubation en présence de différentes concentrations de 5-FU. Résultats exprimés sous la forme de moyennes et écarts-type.

C'est à 72 heures d'incubation que la survie observée pour les cellules incubées avec des concentrations de 5-FU élevées est minimum tandis que la survie des cellules incubées avec des faibles concentrations de 5-FU ne varie pas ou peu au cours de cet intervalle de temps. C'est donc la durée de 72 heures que nous avons choisie comme temps d'incubation des cellules avec le 5'DFUR.

Les résultats des expériences montrant l'effet cytotoxique induit par la TP sont présentés Figure 18.

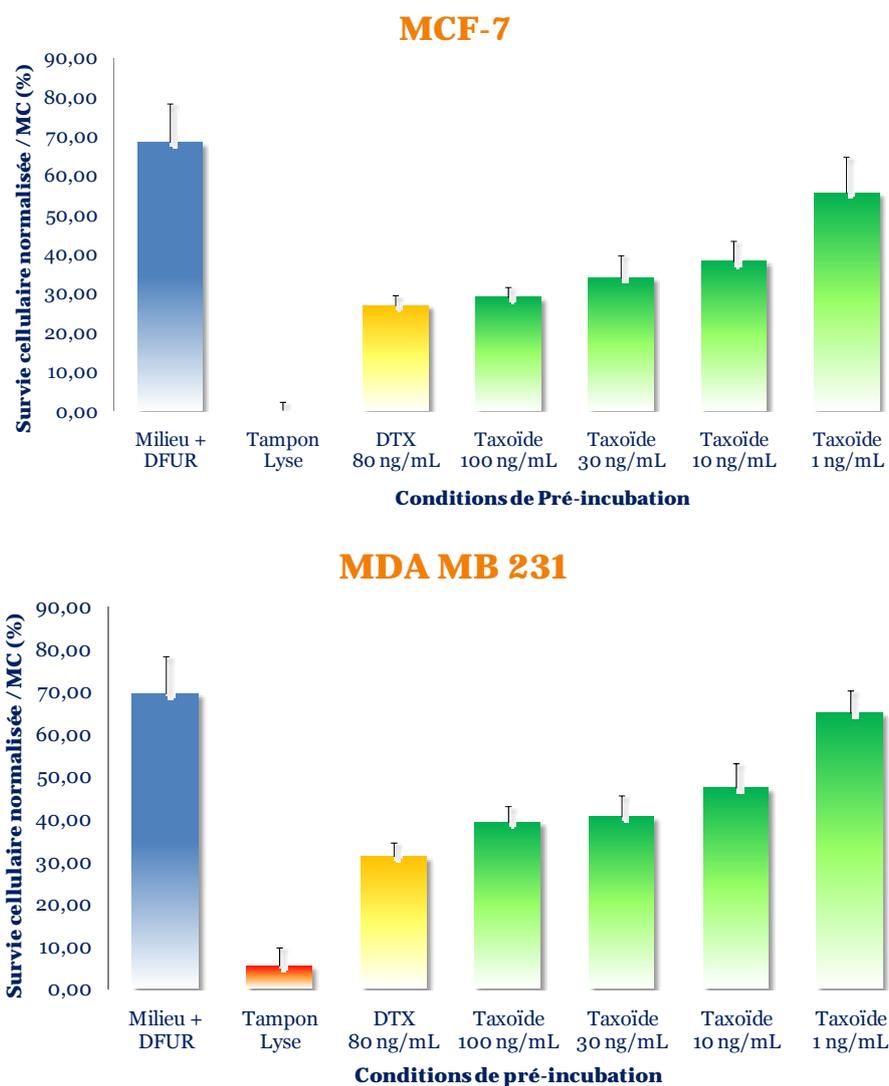


Figure 18 : Survie cellulaire lignées MCF-7 et MDA MB 231) après 72 heures d'incubation en présence de 5'DFUR (10 mg/L) suite à la pré-incubation des cellules avec différentes concentrations de taxanes. Résultats exprimés sous la forme de moyennes et écarts-type.

Nous observons pour les deux lignées MCF-7 et MDA-MB-231 une diminution de la survie cellulaire en présence de 5'DFUR lorsque les cellules étaient préalablement incubées avec des taxanes (DTX et taxoïde)

Ainsi, à 72 heures d'incubation en présence de 5'DFUR à 10 mg/L, les cellules incubées sans taxanes (« Milieu+DFUR ») présentent une survie cellulaire

normalisée de 70% par rapport aux cellules uniquement cultivées avec le milieu de culture (sans taxanes ni 5'DFUR). Cette survie chute à environ 30 à 40% pour les cellules pré-incubées avec des taxanes (taxoïde : 100 à 10 ng/mL ; DTX : 8 à ng/mL). Les cellules pré-incubées avec la concentration de 1 ng/mL de taxoïde ne présentent pas de différence de survie cellulaire par rapport aux cellules contrôles « Milieu+DFUR »

3 – Mise en Place d'une nouvelle technique de dosage des fluoropyrimidines : La LC/MS-MS.

a – Rationnel

La HPLC/MS-MS (Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) couplée à une détection par Spectromètre de Masse en tandem (MS-MS)) est une technique de dosage des molécules par chromatographie liquide haute performance classique couplée à un détecteur particulier : le spectromètre de masse en tandem. Il permet la détection et l'identification en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) des molécules d'intérêt à doser préalablement ionisées et vaporisées.

En effet, après leur séparation sur une colonne de chromatographie en phase liquide, les molécules sont ionisées et vaporisées par la source d'ionisation du Spectromètre de Masse en tandem. Il est constitué de trois structures (les quadripôles) montées en série. Le premier quadripôle sélectionne certains ions d'intérêt en fonction de leur rapport m/z . Le second quadripôle est en réalité une chambre de collision contenant un gaz inerte (Argon) où les ions d'intérêt seront fractionnés en plusieurs ions fils. Cette fragmentation est fonction de la structure chimique des ions parents, de leur énergie cinétique et de la pression du gaz inerte dans la chambre de collision (ces trois derniers paramètres pouvant être ajustés lors de la mise au point de la méthode). La formation des ions fils est hautement spécifique pour une molécule donnée. Les ions fils d'intérêt passent alors dans le troisième quadripôle et y sont sélectionnés en fonction de leur rapport m/z . Le détecteur du Spectromètre de Masse transforme ces ions fils d'intérêt en signal électrique, ce qui permet leur quantification.

Ce détecteur présente l'avantage d'être d'une grande sensibilité, avec la possibilité de détecter de très faibles concentrations de molécules d'intérêt. Il est aussi très spécifique et permet le dosage simultané d'un grand nombre de molécules puisque la séparation et la détection des différentes molécules se fait en fonction de leur rapport m/z qui dépend de leur structure chimique. De plus, le MS-MS est d'autant plus sensible et spécifique qu'il dose chaque molécule en fonction de la transition « rapport m/z du ion parent → rapport m/z du ion fils ». Cette transition est définie et unique pour chacune des molécules.

Dans le laboratoire de pharmacologie clinique et toxicologie du CHU de Besançon, le dosage du 5-FU et des fluoropyrimidines (Capécitabine ; 5'DFCR et 5'DFUR) se faisaient par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à un détecteur UV type barrette de diodes (HPLC/UV). Ces méthodes de dosage impliquent une phase d'extraction et un temps de dosage assez longs. De plus, nous devons doser séparément le 5-FU et la Capécitabine et tous ses métabolites (5'DFCR ; 5'DFUR). Enfin, la sensibilité du détecteur par barrette de diodes peut être insuffisante dans certaines conditions pour nous permettre de mettre en évidence le 5-FU sous certaines conditions, notamment lors des études de l'induction de la TP *in vitro*.

b – Matériel et Méthodes

Nous travaillons sur un Spectromètre de masse en tandem TSQ Quantum® (Thermo®) couplé à une chaîne HPLC Accela® (Thermo®). Tous les réactifs chimiques utilisés pour l'extraction et le dosage étaient de qualité « Spectrométrie de Masse ».

Le 5'DFCR et la Capécitabine ont été gracieusement fournis par Roche®. Le 5-FU, le 5-FluoroCytosine (5-FC), le 5-Chloro-Uridine (5-CU), la Carbamazépine, le 5'DFUR, le 3-Méthylcytidine methosulfate et le 5-Chloro-2'-deoxyuridine (5'CldUrd) ont été obtenus chez Sigma-Aldrich®. Le 5-FU-¹⁵N₂ a été acheté à CDN Isotopes®. Le plasma non thérapeutique utilisé pour la constitution des gammes a été fourni par l'Etablissement Français du Sang de Bourgogne-Franche Comté. La colonne HPLC est une Polaris® 3 µm C18-A 100x2.0 mm (Varian®).

Pour la préparation de l'extraction des échantillons, 30 µL d'une solution contenant les Standards Internes (SI) : Carbamazépine ; 5'CldUrd et 5-FU-¹⁵N₂ (concentrations : 20 µg/mL) sont ajoutés à 500 µL de plasma humain. La gamme est effectuée par ajouts de volumes croissants de solutions contenant les molécules d'intérêt (Capécitabine ; 5'DFCR ; 5'DFUR ; 5-FU) dans du plasma à usage non thérapeutique.

La technique d'extraction est dérivée de celle publiée en 2005 par Remaud *et al.* (71). Il s'agit d'une extraction liquide/liquide simple.

600 mg de sulfate d'ammonium sont ajoutés aux échantillons qui sont ensuite vortexés pendant une minute. Puis 8 mL de solvant organique d'extraction préparé extemporanément (mélange de 15% d'isopropanol et de 85% d'éthylacétate (v/v)) sont ajoutés aux échantillons qui sont ensuite déposés sur des agitateurs à rouleaux pendant 15 minutes puis centrifugés à 3000 g pendant 15 minutes. Le surnageant est récupéré puis évaporé dans un bain marie à 50°C et sous un flux d'azote. Les extraits secs sont alors repris par 500 µL d'eau et, après une phase de lavage avec de l'hexane, sont injectés en HPLC (vol d'injection = 10 µL).

Le Solvant d'élution final utilisé suit le gradient décrit dans le Tableau D.

Temps (minutes)	Proportion Eau (%)	Proportion Acétonitrile (%)	Débit (µL/min)
0,00	100	0	300
3,00	100	0	300
7,00	75	25	300
15,00	70	30	300
16,00	100	0	300
20,00	100	0	300

Tableau D : Gradient d'élution.

Le Tableau E regroupe les caractéristiques des molécules dosées (molécules d'intérêt et SI).

Nom molécule	Masse Moléculaire	Charge des ions	m/z ion parent	m/z ion fils
Capécitabine	359,00	Positive	360,10	244,00
5'DFCR	245,00	Positive	246,00	130,00
5'DFUR	246,20	Positive	247,10	131,10
5-FU	130,10	Positive	131,00	114,00
5-FU-¹⁵N₂	132,00	Positive	133,00	114,90
5'CldUrd	262,65	Négative	261,10	171,00
Carbamazépine	236,3	Positive	237,10	194,00

Tableau E : Principales caractéristiques et transitions des molécules d'intérêt et des SI.

Les points de gamme correspondent aux concentrations suivantes (Tableau F).

mg/L	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Capécitabine	0,2	0,4	1	2	3	4
5'DFCR	0,2	0,4	1	2	3	4
5'DFUR	0,4	0,8	2	4	6	8
5-FU	0,04	0,08	0,2	0,4	0,6	0,8

Tableau F : Concentrations des points de gammes.

Les concentrations des échantillons sont calculées d'après les courbes de régression linéaire calculées à partir des points des gammes. Le graphique de la gamme est établi avec les concentrations du Tableau F en abscisse et, en ordonnée, le rapport entre la surface des pics des molécules d'intérêt par rapport aux pics des SI (surfaces calculées à partir des chromatogrammes).

c – Résultats

Après avoir déterminé les transitions spécifiques (Tableau E) pour chacun des composés d'intérêt et pour les SI, nous nous sommes rendus compte que certains composés élués simultanément pouvaient interférer les uns avec les autres.

La première problématique était donc d'obtenir une bonne séparation chromatographique de nos composés d'intérêt.

Ainsi, le composé le plus polaire (5-FU) est, en général, très peu retenu par les colonnes de chromatographie classiques. Ce comportement peut poser des problèmes pour la bonne détection du 5-FU car bien souvent, il se confond avec le front de solvant sur le chromatogramme. Dans notre cas, du fait de l'utilisation de la colonne HPLC Polaris® et d'un solvant d'élution composé à 100% d'eau, le 5-FU est élué relativement tôt et son pic est bien détectable. Néanmoins, il est primordial que pendant cette première phase du gradient d'élution, il n'y ait aucune trace de solvant organique dans le solvant d'élution. Dans le cas contraire, le 5-FU serait élué beaucoup trop rapidement. C'est pourquoi notre gradient comprend 5 minutes supplémentaires après l'élution du dernier composé d'intérêt pour qu'un certain volume d'eau passe dans la colonne HPLC et élimine toutes traces de solvants organiques avant l'injection du prochain échantillon.

Un autre groupe de molécules d'intérêt est élué de façon plus tardive (5'DFCR ; 5'DFUR). Pour ces molécules mieux retenues par la colonne, il est nécessaire d'augmenter la proportion de solvant organique dans le solvant d'élution (méthanol ou acétonitrile) selon un gradient progressif et lent pour pouvoir éluer ces molécules. Le premier gradient du solvant d'élution (eau plus méthanol) que nous avons utilisé ne permettait pas d'obtenir une assez bonne séparation de ces deux composés. Or, ils ont des structures chimiques très semblables et le 5'DFCR répond de façon importante sur la transition du 5'DFUR, créant ainsi un pic parasite interférant la quantification du 5'DFUR. Afin de résoudre cette interférence, nous avons choisi d'ioniser de façon différente le 5'DFUR (mode négatif) et le 5'DFCR (mode positif) puisque dans ces conditions, le 5'DFCR ne répondait pas sur la transition du 5'DFUR. Néanmoins, le 5'DFUR forme plus difficilement des ions négatifs que des ions positifs, ce qui rendait les intensités de pics de 5'DFUR très

faibles. Ensuite, nous avons choisi d'optimiser la chromatographie et de remplacer le méthanol par de l'acétonitrile.

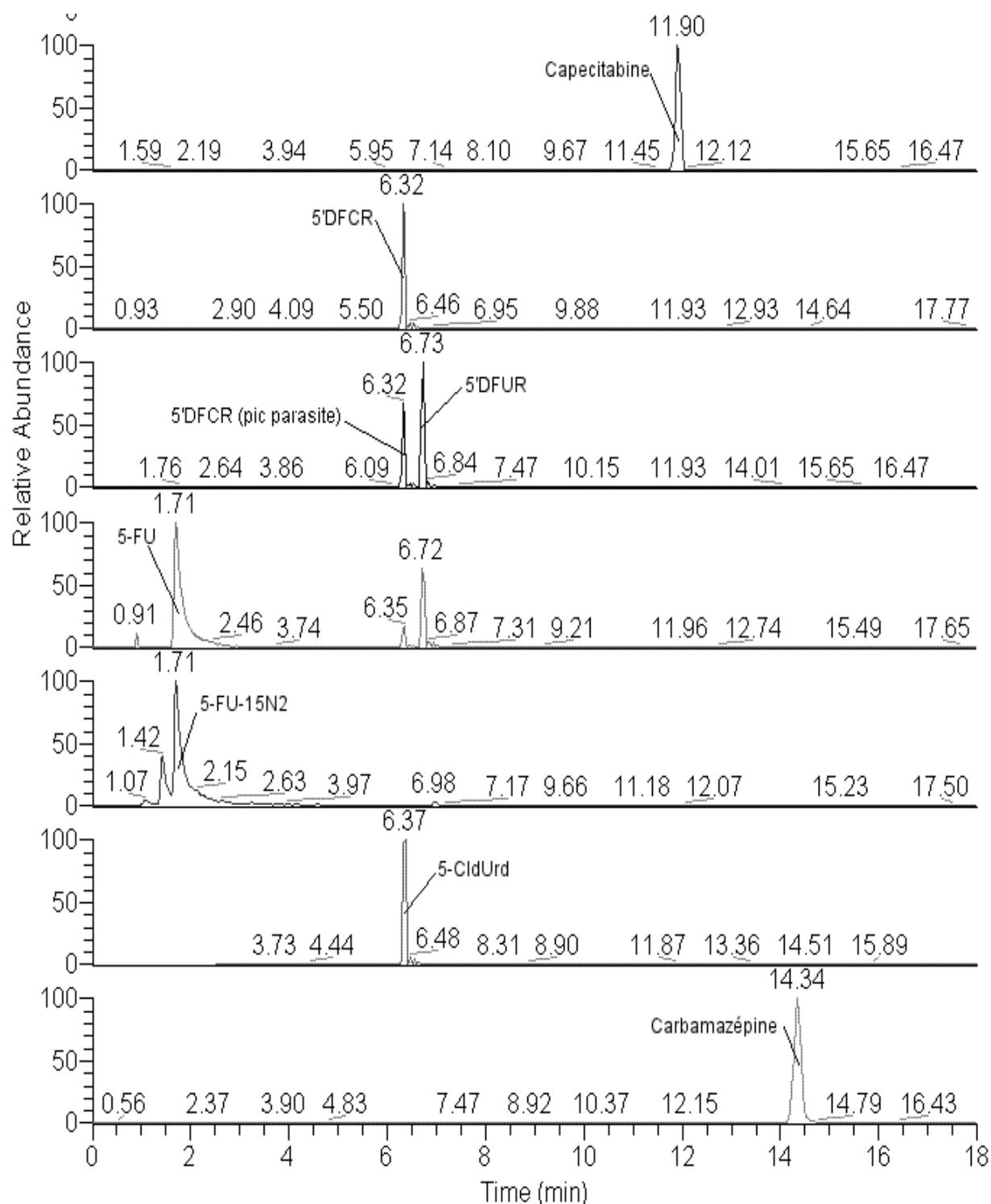


Figure 19 : Chromatogramme caractéristique du dosage des fluoropyrimidines sur HPLC/MS-MS.

Ce nouveau gradient a permis l'obtention d'une séparation suffisante de ces deux composés (0,40 minute d'écart) et d'ioniser le 5'DFUR en mode positif, retrouvant ainsi des intensités de pics suffisamment importantes et ne pas avoir le pic parasite du 5'DFCR sur cette transition.

Le dernier composé (Capécitabine) est le composé le mieux retenu sur la colonne. Il a le temps de rétention le plus tardif, que ce soit avec le méthanol ou avec l'acétonitrile

Le chromatogramme caractéristique obtenu avec le gradient du solvant d'élution définitif est présenté Figure 19. Les temps de rétention des composés sont résumés dans le tableau G.

La deuxième problématique était de trouver des composés pouvant être utilisés comme Standards Internes. Les SI sont des composés qui sont rajoutés à concentration fixe dans le milieu dont on cherche à extraire les molécules d'intérêt (échantillons, points de gamme, contrôles, dosages). Ils doivent pouvoir être correctement extraits par la technique d'extraction au cours de laquelle leur comportement doit être le plus semblable possible à celui des molécules d'intérêt. Ainsi, en ne considérant plus que le rapport de l'intensité du pic de la molécule d'intérêt et du pic du SI, les pertes survenues lors de l'extraction et les variabilités dues à l'injection sont compensées. De plus, en HPLC/MS-MS où l'environnement moléculaire est particulièrement important dans le dosage des molécules (modification de la ionisation avec des variabilités et interférences possibles), il est important que le temps de rétention du SI soit le plus proche possible de la molécule d'intérêt. Dans notre cas, nous avons trois groupes de molécules qui ont des temps de rétention semblables, nous avons donc besoin de trois SI différents.

Nous avons testé un grand nombre de SI : 5-FC ; 5-CU ; 3-Méthylcytidine methosulfate ; Carbamazépine ; 5'CldUrd et 5-FU-¹⁵N₂.

La carbamazépine est particulièrement bien retenue selon nos conditions de chromatographie. De plus, elle était déjà utilisée dans le laboratoire en HPLC/UV comme SI de la Capécitabine. Pouvant être extraite par notre méthode d'extraction, elle ne présente qu'un seul inconvénient : comme il s'agit d'une molécule

thérapeutique, il faudra veiller à ce que les patients dont on voudra doser les fluoropyrimidines ne soient pas traités par la Carbamazépine.

Pour le 5-FU, nous avons testé le 5-FC qui était utilisé comme SI en HPLC/UV. Cependant, son extraction n'est pas satisfaisante avec la méthode que nous utilisons. Nous avons alors essayé le 5-CU qui, bien qu'étant un peu plus retenu que le 5-FU sur le chromatogramme, était convenablement extrait. Nous avons alors utilisé le 5-FU-¹⁵N₂. Il s'agit d'une molécule de 5-FU mais dont les deux atomes d'azote (isotope majoritaire : ¹⁴N) ont été remplacés par des isotopes stables (¹⁵N). Ainsi, le 5-FU-¹⁵N₂ a, vis-à-vis de l'extraction comme de la chromatographie, exactement le même comportement que le 5-FU et une masse moléculaire de 132 au lieu de 130,10, ce qui permet de facilement le détecter en MS-MS et de le différencier par rapport au 5-FU.

Pour le 5'DFCR et le 5'DFUR, nous avons travaillé dans un premier temps avec soit du 5-CU, soit de la Carbamazépine. Néanmoins, les résultats obtenus avec ces deux SI n'étaient pas satisfaisants pour ces deux molécules (trop grande différence structurale, temps de rétention différents). Nous avons ainsi testé le 5'CldUrd (formule chimique proche de ces deux molécules) et il s'avère que son temps de rétention est similaire à celui du 5'DFCR : il est donc ionisé dans le même environnement moléculaire (même composition du solvant d'élution). De plus, comme il répond mieux en mode d'ionisation négative, le 5'DFCR ne présente pas de pic parasite sur sa transition.

Les temps de rétention de tous les composés sont présentés dans le tableau G.

Enfin, nous avons pu déterminer que la linéarité de notre méthode de dosage est bonne sur les concentrations des gammes respectives. La linéarité est aussi bonne pour des concentrations jusqu'à deux fois plus importantes que le G6 et jusqu'à quatre fois moins importantes que le G1.

Nom molécule d'intérêt	Temps de rétention (min)*	Nom SI	Temps de rétention (min)*
5-FU	1,70	5-FC	1,20
5'DFCR	6,35	5-FU- ¹⁵ N ₂	1,70
5'DFUR	6,75	5-CU	2,40
Capécitabine	11,90	5'ClUrd	6,37
		Carbamazépine	14,35

Tableau G : Temps de rétention des composés. * : selon la méthode de chromatographie décrite.

d – Utilisation en routine : Suivi Thérapeutique Pharmacologique

En routine, le dosage des fluoropyrimidines est utilisé pour le Suivi Thérapeutique Pharmacologique (STP) des patients recevant des chimiothérapies comprenant ces molécules. Le STP consiste à réaliser des dosages plasmatiques afin de déterminer si les concentrations sont dans un intervalle thérapeutique prédéfini qui correspond au meilleur rapport « Efficacité / Survenue d'effets indésirables ». Si les concentrations sont en deçà de cet intervalle (avec un risque d'inefficacité thérapeutique) le STP permet au clinicien d'augmenter la posologie alors que si les concentrations sont trop hautes (avec un risque de survenue d'effets indésirables), le clinicien aura la possibilité de diminuer la posologie. Toutes les molécules médicamenteuses ne nécessitent pas un STP. Le STP présente un intérêt dans le monitoring d'un médicament lorsque ce dernier présente plusieurs caractéristiques parmi les suivantes :

- L'existence d'une corrélation forte entre la concentration plasmatique et l'effet thérapeutique du médicament.
- L'absence de corrélation entre la dose prescrite et la concentration plasmatique du médicament (due à une variabilité inter-individuelle et/ou intra-individuelle importante).

- Une marge étroite entre la concentration thérapeutique et la concentration toxique du médicament (faible index thérapeutique).
- Une méthode analytique de dosage spécifique, fiable, rapide et applicable sur le plasma.

Parmi les fluoropyrimidines, le 5-FU présente toutes ces caractéristiques. Ainsi, sa cinétique est non linéaire (avec une impossibilité de prédire les concentrations plasmatiques en fonction de la posologie administrée). Ensuite, il a été démontré une relation entre l'Aire Sous la Courbe du 5-FU et l'efficacité du traitement (72). Enfin, 2 à 5% des patients présentent un déficit de l'enzyme responsable de la dégradation du 5-FU, la DihydroPyrimidine Déshydrogénase (DPD). Ces patients ont donc un risque très important d'être en surdosage avec un risque important de toxicité (72).

e – Avantages de la méthode de dosage par HPLC/MS-MS

Lorsque cette méthode de dosage des fluoropyrimidines sera validée par notre laboratoire, elle apportera de nombreux avantages par rapport aux deux méthodes de dosage HPLC/UV utilisées actuellement (une pour doser le 5-FU et l'autre pour doser la Capécitabine, 5'DFCR, 5'DFUR) :

- premièrement, elle nous apportera un gain important en sensibilité, nous permettant de détecter et de quantifier les fluoropyrimidines à de plus petites concentrations que ce que nous permet actuellement la HPLC/UV.
- deuxièmement, nous pourrions doser en une seule manipulation (extraction et chromatographie) le 5-FU et la Capécitabine.
- troisièmement, nous rendrons plus rapidement les résultats de ces dosages, apportant par là même un service plus grand aux patients et aux cliniciens lors de l'utilisation de cette méthode en routine au laboratoire.
- quatrièmement, la HPLC/MS-MS nous permettra, le cas échéant, d'ajouter éventuellement le dosage d'autres fluoropyrimidines tel que le Tégafur (UFT®). Le Tegafur est une prodrogue du 5-FU mais qui est activée au niveau hépatique par le Cytochrome CYP2A6. Nous comptons également détecter par notre méthode de dosage la présence dans les échantillons plasmatiques

d'un inhibiteur de la Cytidine déaminase (enzyme responsable de la métabolisation du 5'DFCR en 5'DFUR). En effet, cette enzyme est toujours active dans le plasma et cette activité peut entraîner un biais avec un risque de sur-estimation du 5'DFUR et risque de sous-estimation des concentrations de 5'DFCR. C'est pourquoi, lors de la réception et de la préparation des échantillons plasmatiques, un inhibiteur enzymatique, la TétrahydroUridine (THU) est ajouté dans le plasma. Le fait de pouvoir détecter la présence de la THU dans les échantillons dosés correspondrait à la mise en place d'un contrôle interne de qualité spécifique.

III – Discussion et Perspectives

Au cours de nos travaux, nous avons mis en évidence que la pré-incubation de cellules tumorales avec les taxanes entraînait une augmentation de la quantité de 5-FU synthétisé par rapport aux cellules incubées sans taxanes. De plus, nous avons montré que cette augmentation était dose-dépendante. Nous avons également mis en évidence une augmentation de la synthèse des ARNm de la TP ainsi que son augmentation au niveau intra-cellulaire. Donc, l'augmentation de la synthèse de 5-FU est très probablement la conséquence d'une induction de la TP. Enfin, nous avons observé que cette induction de la TP conduisait à une augmentation de la mortalité des cellules tumorales lorsqu'elles étaient incubées avec du 5'DFUR.

Nous avons mis en évidence l'induction de la TP de façon fonctionnelle. Dans la littérature, d'autres études ont exploré l'induction de la TP sur des lignées cellulaires mais en dosant le 5-FU synthétisé par des lysats cellulaires en présence de 5'DFUR (45, 57, 73). En effet, les auteurs de ces études induisaient la TP à partir de cultures cellulaires, lysaient les cellules sans les normaliser par nombre de cellules vivantes puis commençaient la synthèse de 5-FU à partir de 5-DFUR (la normalisation se faisant par la concentration protéique totale). Or, nos études ont mis en évidence que la TP pouvait être induite de façon différentielle en fonction de la densité cellulaire (cf Figure 10), rendant ainsi très importante la normalisation des densités cellulaires. De plus, le modèle que nous avons développé permet le maintien de l'intégrité cellulaire durant toute la phase d'induction de la TP et de synthèse du 5-FU qui est le reflet de l'activité des cellules vivantes. Il nous apparaît donc plus proche de la physiologie, reflétant mieux la situation intra-tumorale.

Lors de nos travaux, nous avons mis en évidence une induction concentration dépendante de la TP par les taxanes sur deux lignées cellulaires de cancer du sein (MCF-7 et MDA-MB-231). Or, les concentrations de 5-FU synthétisées à partir d'une même concentration de 5'DFUR, avaient une tendance à être plus importantes lors des expériences menées sur MCF-7 par rapport à MDA-MB-231. A notre connaissance, aucune donnée publiée à ce jour n'a établi de différence entre ces deux lignées au niveau de l'expression de la TP. Il pourrait être intéressant de déterminer si cette différence de synthèse du 5-FU peut être imputée à une

quelconque différence entre les deux lignées. Ces deux lignées ont-elles une différence d'expression de la TP ? La mise au point d'une technique de cytométrie en flux qui nous permettrait de doser directement la TP au niveau intracellulaire pourrait mettre en évidence cette éventuelle différence. Nous avons effectué quelques essais et testé l'anticorps monoclonal murin anti-TP (SC-47702) de chez Santa Cruz® que nous avons utilisé pour les essais en Western blot et pour la microscopie confocale. Néanmoins, à ce jour, les résultats en cytométrie de flux ne sont pas concluants. Nous testons donc actuellement différentes méthodes de perméabilisation des cellules afin d'améliorer le marquage intracellulaire de la TP et nous comptons tester de nouveaux Ac anti-TP.

Nous avons également constaté que l'augmentation du 5-FU était dose-dépendante. Ces observations sont cohérentes avec plusieurs autres résultats obtenus tant *in vitro* qu'*in vivo* avec d'autres cytotoxiques et d'autres lignées cellulaires. Ainsi, Magné *et al.* (57), avec des cellules CAL33, ont également démontré un effet concentration dépendant du Gefitinib (Iressa®) sur l'induction de la TP. *In vivo*, Sawada (54) et Endo (55) ont mis en évidence que l'induction de la TP suit un effet concentration dépendant pour différents cytotoxiques : le Paclitaxel ; Docétaxel ; la Mitomycine C ; la Vinblastine et la Vindésine.

De plus, cet aspect de l'induction de la TP par les taxanes est cohérent avec les résultats des tests de cytotoxicité que nous avons réalisés par la suite. Ainsi, à 72 heures, nous observons que la mortalité induite par le 5'DFUR est aussi concentration dépendante. Des résultats similaires ont aussi été décrits dans la littérature par Magné *et al.* (57). Néanmoins, les méthodologies utilisées différaient puisque les conditions d'incubations des deux cytotoxiques (Gefitinib et 5'DFUR) étaient différentes. Magné commençait l'incubation des cellules tumorales avec le Gefitinib pendant 48 heures puis ajoutait le 5'DFUR dans le milieu pendant 48 heures supplémentaires. Notre méthodologie, qui utilise une incubation séquentielle des deux cytotoxiques (Taxane puis 5'DFUR), nous semble plus adaptée pour mettre en évidence l'effet propre de l'induction de la TP sur la mortalité cellulaire. En effet, dans la mesure où nous normalisons le nombre de cellules vivantes avant la synthèse du 5-FU, la mortalité propre induite par le taxane n'interfère pas avec celle du 5-FU produit. De plus, après 48 heures d'incubation avec le cytotoxique, les

auteurs de cette étude ne procédaient pas à une normalisation avant ajout du 5'DFUR. Or, nous avons mis en évidence un effet de la densité cellulaire sur l'activité de la TP. Il est donc difficile de différencier l'effet résultant des modifications de la densité cellulaire dues au cytotoxique de l'effet propre dû à son induction. Nous observons ainsi des différences de mortalité uniquement dues à la différence d'induction de la TP et non à l'effet cytotoxique propre du cytotoxique associé à son effet inducteur sur la TP.

Nous avons également étudié l'évolution de l'induction de la TP au cours du temps grâce à la RT-qPCR. Pour cela, nous avons travaillé avec des conditions pour lesquelles nous avons observé une augmentation des concentrations de 5-FU avec notre modèle *in vitro* (80 ng/mL de DTX et 100 ng/mL de taxoïde). Nous avons alors observé l'évolution de la transcription au cours du temps (0h, 1h, 4h, 8h, 24h) et mis en évidence une augmentation du nombre de copies d'ARNm dès 4 heures d'incubation avec les taxanes. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus en 2002 par Zhu et son équipe qui ont observé une induction de la transcription du gène de la TP par le TNF α à partir de 6 heures (41). Les informations tirées de ce type d'expérience pourraient être utilisées pour adapter au mieux les administrations de taxanes et de Capécitabine afin d'optimiser l'effet inducteur de la TP. Naturellement, pour l'utilisation en clinique, il faudrait tenir compte du temps de métabolisation de la Capécitabine en 5'DFUR.

Nous avons observé en microscopie confocale une augmentation de la présence de la TP au sein du cytoplasme des cellules incubées avec des taxanes à 24 heures. Cependant, les résultats que nous avons obtenus par immunocytochimie étaient légèrement contradictoires avec ceux décrits par la littérature et avec nos résultats obtenus par microscopie confocale. En effet, si l'induction de la TP par les taxanes au niveau du cytoplasme à 24 heures était observée tant en immunohistochimie qu'en confocal, les techniques d'immunocytochimie ne nous ont pas permis de mettre en évidence la présence de la TP au sein du noyau des cellules MCF-7 non incubées. Or, la présence de TP au sein du noyau des cellules MCF-7 non incubées a été observée par microscopie confocale. De plus, en 1995, Fox *et al.* mettait en évidence la TP dans le noyau et dans le cytoplasme des cellules saines. A ce jour, nous ne nous expliquons pas cette différence de résultats entre

l'immunohistochimie et le microscope confocal. L'anticorps monoclonal anti-TP murin utilisé pour les deux techniques n'était certes pas de la même entreprise mais était issu du même clone (PGF-44C) dans les deux cas. D'autre part, les techniques de fixation / perméabilisation des cellules n'étant pas identiques, cela peut éventuellement expliquer cette différence de marquage. Enfin, le masquage potentiel d'un marquage intra-nucléaire par le colorant mettant en évidence le noyau n'est pas à exclure.

Enfin, à notre connaissance, il n'y a pas eu de publications mettant en évidence la TP par microscopie confocale. Cette technique, couplée à la RT-qPCR, nous permettra d'étudier la localisation la TP en parallèle à la transcription de son gène. Elle pourrait également nous permettre d'étudier une éventuelle évolution de la localisation de la TP en fonction du temps d'incubation, évolution qui n'a pas été encore décrite. De plus les études d'immunohistochimie publiées n'ont pas étudié cette éventuelle mobilisation de la TP au niveau intracellulaire.

Les essais de cytotoxicité *in vitro* nous ont permis d'obtenir des résultats encourageants quant à l'efficacité de l'association entre le 5'DFUR (métabolite de la Capécitabine - Xeloda®) et un taxoïde vis-à-vis des deux lignées de cancer du sein testées (MCF-7 et MDA MB 231). Pour nos deux lignées du sein, les cellules incubées par l'association de taxanes et du 5'DFUR présentaient une survie cellulaire moins importante que les cellules incubées seulement avec le DFUR (35% Vs 70%). Ces résultats sont encourageants pour nos essais *in vivo* et sont aussi en corrélation avec les résultats publiés sur les associations entre taxanes et fluoropyrimidines, que ce soit *in vivo* ou lors d'études cliniques (60, 62, 63). Nous pensons déterminer par le même test de survie cellulaire (MTT) les IC50 des différents cytotoxiques et de leur association.

Le modèle que nous avons mis au point devrait permettre de tester le pouvoir inducteur sur la TP de nouveaux cytotoxiques afin de déterminer une potentielle synergie thérapeutique avec la Capécitabine. Les résultats que nous présentons ont été obtenus à partir de cultures cellulaires. Avant de pouvoir les extrapoler à la clinique, nous nous proposons de réaliser des études sur un modèle plus élaboré. Ainsi, nous prévoyons de développer un modèle de xénogreffe murine sur des souris *nu/nu* avec les cellules des lignées MCF-7 et MDA-MB-231. Les anti-cancéreux dont

nous voulons étudier le potentiel d'induction de la TP seront administrés aux animaux selon une séquence à définir ultérieurement. Le 5'DFUR (ou la Capécitabine) sera ensuite administré et le 5-FU sera récupéré directement au sein de la tumeur par une technique de microdialyse. Son dosage nous permettra d'évaluer l'induction de la TP par les traitements administrés aux souris. Nous aurons également un indice de l'efficacité anti-tumorale des associations testées en suivant la croissance des xénogreffes. Nous pourrons enfin prélever les tumeurs afin de réaliser des marquages de la TP par immunohistochimie. Le passage au modèle *in vivo* nous apportera un niveau de compréhension physiologique supérieur par rapport à notre modèle *in vitro*.

Finalement, toutes ces expériences visant à étudier l'évolution de la TP en fonction des concentrations de taxanes et du temps devraient nous donner une bonne appréhension de notre modèle d'étude *in vitro* de l'induction de la TP. Cette maîtrise pourra nous permettre d'envisager la conception d'un modèle *ex vivo* d'évaluation de l'efficacité de l'induction de la TP chez les patients. Ce test *ex vivo* pourrait se faire sur les cellules mononuclées isolées du sang des patients avant et après le traitement inducteur de la TP. En incubant ces cellules avec du 5'DFUR et en dosant le 5-FU produit, il devrait être possible d'estimer l'efficacité de la TP. L'évolution de cette activité avant et après administration du traitement inducteur de la TP pourra éventuellement nous renseigner sur le potentiel inducteur du traitement administré avant la Capécitabine. Ce test ne pourra se concevoir que dans la mesure où les dosages seront réalisés grâce à la technique de dosage développée en HPLC/MS-MS.

Les résultats que nous avons obtenus lors de la mise au point de cette méthode de dosage des fluoropyrimidines par HPLC/MS-MS sont encourageants. A notre connaissance, il n'a pas été publié de méthode de dosage simultané par MS-MS de toutes les fluoropyrimidines actuellement sur le marché français. Ainsi, cette méthode de dosage, de par sa sensibilité, pourrait être applicable au test *ex vivo* de l'induction de la TP chez les patients mais aussi en routine pour le STP des patients traités par fluoropyrimidines.

Conclusion

La TP est un facteur angiogénique et anti-apoptotique qui est sur-exprimée de façon importante au sein de la tumeur. Mais c'est aussi une enzyme clef dans l'activation des fluoropyrimidines. Elle peut être induite par d'autres anti-cancéreux.

Dans le cadre de notre thématique de recherche sur la TP, nous avons développé et mis au point un modèle d'étude de l'induction de la TP *in vitro* qui nous semble plus pertinent que les modèles *in vitro* utilisés jusqu'alors.

Il nous permettra d'étudier le potentiel inducteur de la TP des cytotoxiques, qu'ils soient en cours de développement afin de déterminer l'intérêt de les associer avec la Capécitabine ou qu'ils soient déjà commercialisés avec, dans ce cas, le but d'optimiser leurs associations.

De plus, il pourrait nous permettre de développer un modèle *ex vivo* de détermination de la TP utilisable en routine chez le patient afin, là encore, d'optimiser l'administration des fluoropyrimidines au malade.

Bibliographie

1. Friedkin M, Roberts D. The enzymatic synthesis of nucleosides. I. Thymidine phosphorylase in mammalian tissue. *J Biol Chem* 1954;207(1):245-56.
2. Voytek P. Purification of thymidine phosphorylase from *Escherichia coli* and its photoinactivation in the presence of thymine, thymidine, and some halogenated analogs. *J Biol Chem* 1975;250(10):3660-5.
3. Walter MR, Cook WJ, Cole LB, Short SA, Koszalka GW, Krenitsky TA, et al. Three-dimensional structure of thymidine phosphorylase from *Escherichia coli* at 2.8 Å resolution. *J Biol Chem* 1990;265(23):14016-22.
4. Kubilus J, Lee LD, Baden HP. Purification of thymidine phosphorylase from human amniochorion. *Biochim Biophys Acta* 1978;527(1):221-8.
5. Yoshimura A, Kuwazuru Y, Furukawa T, Yoshida H, Yamada K, Akiyama S. Purification and tissue distribution of human thymidine phosphorylase; high expression in lymphocytes, reticulocytes and tumors. *Biochim Biophys Acta* 1990;1034(1):107-13.
6. Miyazono K, Okabe T, Urabe A, Takaku F, Heldin CH. Purification and properties of an endothelial cell growth factor from human platelets. *J Biol Chem* 1987;262(9):4098-103.
7. Ishikawa F, Miyazono K, Hellman U, Drexler H, Wernstedt C, Hagiwara K, et al. Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature* 1989;338(6216):557-62.
8. Hagiwara K, Stenman G, Honda H, Sahlin P, Andersson A, Miyazono K, et al. Organization and chromosomal localization of the human platelet-derived endothelial cell growth factor gene. *Mol Cell Biol* 1991;11(4):2125-32.
9. Usuki K, Saras J, Waltenberger J, Miyazono K, Pierce G, Thomason A, et al. Platelet-derived endothelial cell growth factor has thymidine phosphorylase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;184(3):1311-6.
10. Moghaddam A, Bicknell R. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in *Escherichia coli* and confirmation of its thymidine phosphorylase activity. *Biochemistry* 1992;31(48):12141-6.
11. Spraggon G, Stuart D, Ponting C, Finnis C, Sleep D, Jones Y. Crystallization and X-ray diffraction study of recombinant platelet-derived endothelial cell growth factor. *J Mol Biol* 1993;234(3):879-80.
12. Fox SB, Moghaddam A, Westwood M, Turley H, Bicknell R, Gatter KC, et al. Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase expression in normal tissues: an immunohistochemical study. *J Pathol* 1995;176(2):183-90.
13. Miwa M, Ura M, Nishida M, Sawada N, Ishikawa T, Mori K, et al. Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *Eur J Cancer* 1998;34(8):1274-81.
14. Usuki K, Norberg L, Larsson E, Miyazono K, Hellman U, Wernstedt C, et al. Localization of platelet-derived endothelial cell growth factor in human placenta and purification of an alternatively processed form. *Cell Regul* 1990;1(8):577-84.
15. el Kouni MH, el Kouni MM, Naguib FN. Differences in activities and substrate specificity of human and murine pyrimidine nucleoside phosphorylases: implications for chemotherapy with 5-fluoropyrimidines. *Cancer Res* 1993;53(16):3687-93.
16. Iltzsch MH, el Kouni MH, Cha S. Kinetic studies of thymidine phosphorylase from mouse liver. *Biochemistry* 1985;24(24):6799-807.
17. Brown NS, Bicknell R. Thymidine phosphorylase, 2-deoxy-D-ribose and angiogenesis. *Biochem J* 1998;334 (Pt 1):1-8.
18. Schomburg D. *Enzyme Handbook*. Berlin: Springer Verlag; 1990 - 1998.
19. Piper AA, Tattersall MH, Fox RM. The activities of thymidine metabolising enzymes during the cell cycle of a human lymphocyte cell line LAZ-007 synchronised by centrifugal elutriation. *Biochim Biophys Acta* 1980;633(3):400-9.

20. Desgranges C, Razaka G, Rabaud M, Bricaud H. Catabolism of thymidine in human blood platelets: purification and properties of thymidine phosphorylase. *Biochim Biophys Acta* 1981;654(2):211-8.
21. Piper AA, Fox RM. Biochemical basis for the differential sensitivity of human T- and B-lymphocyte lines to 5-fluorouracil. *Cancer Res* 1982;42(9):3753-60.
22. Desgranges C, Razaka G, Rabaud M, Bricaud H, Balzarini J, De Clercq E. Phosphorolysis of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU) and other 5-substituted-2'-deoxyuridines by purified human thymidine phosphorylase and intact blood platelets. *Biochem Pharmacol* 1983;32(23):3583-90.
23. Ishitsuka H, Miwa M, Takemoto K, Fukuoka K, Itoga A, Maruyama HB. Role of uridine phosphorylase for antitumor activity of 5'-deoxy-5-fluorouridine. *Gann* 1980;71(1):112-23.
24. Moghaddam A, Zhang HT, Fan TP, Hu DE, Lees VC, Turley H, et al. Thymidine phosphorylase is angiogenic and promotes tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(4):998-1002.
25. Miyadera K, Sumizawa T, Haraguchi M, Yoshida H, Konstanty W, Yamada Y, et al. Role of thymidine phosphorylase activity in the angiogenic effect of platelet derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase. *Cancer Res* 1995;55(8):1687-90.
26. Haraguchi M, Miyadera K, Uemura K, Sumizawa T, Furukawa T, Yamada K, et al. Angiogenic activity of enzymes. *Nature* 1994;368(6468):198.
27. Vogel T, Blake DA, Whikehart DR, Guo NH, Zabrenetzky VS, Roberts DD. Specific simple sugars promote chemotaxis and chemokinesis of corneal endothelial cells. *J Cell Physiol* 1993;157(2):359-66.
28. Pauly JL, Schuller MG, Zelcer AA, Kirss TA, Gore SS, Germain MJ. Identification and comparative analysis of thymidine phosphorylase in the plasma of healthy subjects and cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1977;58(6):1587-90.
29. O'Brien TS, Fox SB, Dickinson AJ, Turley H, Westwood M, Moghaddam A, et al. Expression of the angiogenic factor thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor in primary bladder cancers. *Cancer Res* 1996;56(20):4799-804.
30. Takebayashi Y, Akiyama S, Akiba S, Yamada K, Miyadera K, Sumizawa T, et al. Clinicopathologic and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine phosphorylase, in human colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996;88(16):1110-7.
31. Takebayashi Y, Miyadera K, Akiyama S, Hokita S, Yamada K, Akiba S, et al. Expression of thymidine phosphorylase in human gastric carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1996;87(3):288-95.
32. Focher F, Spadari S. Thymidine phosphorylase: a two-face Janus in anticancer chemotherapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2001;1(2):141-53.
33. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002;2(1):38-47.
34. Griffiths L, Dachs GU, Bicknell R, Harris AL, Stratford IJ. The influence of oxygen tension and pH on the expression of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in human breast tumor cells grown in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1997;57(4):570-2.
35. Zhu GH, Schwartz EL. Expression of the angiogenic factor thymidine phosphorylase in THP-1 monocytes: induction by autocrine tumor necrosis factor-alpha and inhibition by aspirin. *Mol Pharmacol* 2003;64(5):1251-8.
36. Eda H, Fujimoto K, Watanabe S, Ura M, Hino A, Tanaka Y, et al. Cytokines induce thymidine phosphorylase expression in tumor cells and make them more susceptible to 5'-deoxy-5-fluorouridine. *Cancer Chemother Pharmacol* 1993;32(5):333-8.
37. Goto H, Kohno K, Sone S, Akiyama S, Kuwano M, Ono M. Interferon gamma-dependent induction of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial growth factor through gamma-activated sequence-like element in human macrophages. *Cancer Res* 2001;61(2):469-73.

38. Fukushima M, Okabe H, Takechi T, Ichikawa W, Hirayama R. Induction of thymidine phosphorylase by interferon and taxanes occurs only in human cancer cells with low thymidine phosphorylase activity. *Cancer Lett* 2002;187(1-2):103-10.
39. Toi M, Atiqur Rahman M, Bando H, Chow LW. Thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial-cell growth factor) in cancer biology and treatment. *Lancet Oncol* 2005;6(3):158-66.
40. Brown NS, Jones A, Fujiyama C, Harris AL, Bicknell R. Thymidine phosphorylase induces carcinoma cell oxidative stress and promotes secretion of angiogenic factors. *Cancer Res* 2000;60(22):6298-302.
41. Zhu GH, Lenzi M, Schwartz EL. The Sp1 transcription factor contributes to the tumor necrosis factor-induced expression of the angiogenic factor thymidine phosphorylase in human colon carcinoma cells. *Oncogene* 2002;21(55):8477-85.
42. Finkenzerler G, Sparacio A, Technau A, Marme D, Siemeister G. Sp1 recognition sites in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression. *Oncogene* 1997;15(6):669-76.
43. Schwartz EL, Wan E, Wang FS, Baptiste N. Regulation of expression of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 1998;58(7):1551-7.
44. Kitazono M, Takebayashi Y, Ishitsuka K, Takao S, Tani A, Furukawa T, et al. Prevention of hypoxia-induced apoptosis by the angiogenic factor thymidine phosphorylase. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253(3):797-803.
45. Ikeda R, Furukawa T, Mitsuo R, Noguchi T, Kitazono M, Okumura H, et al. Thymidine phosphorylase inhibits apoptosis induced by cisplatin. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;301(2):358-63.
46. Jeung HC, Che XF, Haraguchi M, Furukawa T, Zheng CL, Sumizawa T, et al. Thymidine phosphorylase suppresses apoptosis induced by microtubule-interfering agents. *Biochem Pharmacol* 2005;70(1):13-21.
47. Ikeda R, Furukawa T, Kitazono M, Ishitsuka K, Okumura H, Tani A, et al. Molecular basis for the inhibition of hypoxia-induced apoptosis by 2-deoxy-D-ribose. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291(4):806-12.
48. Ikeda R, Che XF, Ushiyama M, Yamaguchi T, Okumura H, Nakajima Y, et al. 2-Deoxy-D-ribose inhibits hypoxia-induced apoptosis by suppressing the phosphorylation of p38 MAPK. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342(1):280-5.
49. VIDAL Le Dictionnaire 2008. Issy-Les-Moulineaux: VIDAL; 2008.
50. Budman DR, Meropol NJ, Reigner B, Creaven PJ, Lichtman SM, Berghorn E, et al. Preliminary studies of a novel oral fluoropyrimidine carbamate: capecitabine. *J Clin Oncol* 1998;16(5):1795-802.
51. Ackland SP, Peters GJ. Thymidine phosphorylase: its role in sensitivity and resistance to anticancer drugs. *Drug Resist Updat* 1999;2(4):205-214.
52. Zhou J, Xiao YS, Tang ZY, Fan J, Wu ZQ, Zhao Y, et al. Transfection of thymidine phosphorylase cDNA to human hepatocellular carcinoma cells enhances sensitivity to fluoropyrimidine but augments endothelial cell migration. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005;131(8):547-51.
53. Temmink OH, de Bruin M, Turksma AW, Cricca S, Laan AC, Peters GJ. Activity and substrate specificity of pyrimidine phosphorylases and their role in fluoropyrimidine sensitivity in colon cancer cell lines. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(3):565-75.
54. Sawada N, Ishikawa T, Fukase Y, Nishida M, Yoshikubo T, Ishitsuka H. Induction of thymidine phosphorylase activity and enhancement of capecitabine efficacy by taxol/taxotere in human cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 1998;4(4):1013-9.
55. Endo M, Shinbori N, Fukase Y, Sawada N, Ishikawa T, Ishitsuka H, et al. Induction of thymidine phosphorylase expression and enhancement of efficacy of capecitabine or 5'-deoxy-5-fluorouridine by cyclophosphamide in mammary tumor models. *Int J Cancer* 1999;83(1):127-34.

56. Sawada N, Ishikawa T, Sekiguchi F, Tanaka Y, Ishitsuka H. X-ray irradiation induces thymidine phosphorylase and enhances the efficacy of capecitabine (Xeloda) in human cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 1999;5(10):2948-53.
57. Magne N, Fischel JL, Dubreuil A, Formento P, Ciccolini J, Formento JL, et al. ZD1839 (Iressa) modifies the activity of key enzymes linked to fluoropyrimidine activity: rational basis for a new combination therapy with capecitabine. *Clin Cancer Res* 2003;9(13):4735-42.
58. Kurosumi M, Tabei T, Suemasu K, Inoue K, Kusawake T, Sugamata N, et al. Enhancement of immunohistochemical reactivity for thymidine phosphorylase in breast carcinoma cells after administration of docetaxel as a neoadjuvant chemotherapy in advanced breast cancer patients. *Oncol Rep* 2000;7(5):945-8.
59. Toi M, Bando H, Horiguchi S, Takada M, Kataoka A, Ueno T, et al. Modulation of thymidine phosphorylase by neoadjuvant chemotherapy in primary breast cancer. *Br J Cancer* 2004;90(12):2338-43.
60. O'Shaughnessy J, Miles D, Vukelja S, Moiseyenko V, Ayoub JP, Cervantes G, et al. Superior survival with capecitabine plus docetaxel combination therapy in anthracycline-pretreated patients with advanced breast cancer: phase III trial results. *J Clin Oncol* 2002;20(12):2812-23.
61. Talbot DC, Moiseyenko V, Van Belle S, O'Reilly SM, Alba Conejo E, Ackland S, et al. Randomised, phase II trial comparing oral capecitabine (Xeloda) with paclitaxel in patients with metastatic/advanced breast cancer pretreated with anthracyclines. *Br J Cancer* 2002;86(9):1367-72.
62. Batista N, Perez-Manga G, Constenla M, Ruiz A, Carabantes F, Castellanos J, et al. Phase II study of capecitabine in combination with paclitaxel in patients with anthracycline-pretreated advanced/metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 2004;90(9):1740-6.
63. Gradishar WJ, Meza LA, Amin B, Samid D, Hill T, Chen YM, et al. Capecitabine plus paclitaxel as front-line combination therapy for metastatic breast cancer: a multicenter phase II study. *J Clin Oncol* 2004;22(12):2321-7.
64. Twelves C. Capecitabine as first-line treatment in colorectal cancer. Pooled data from two large, phase III trials. *Eur J Cancer* 2002;38 Suppl 2:15-20.
65. Cassidy J, Tabernero J, Twelves C, Brunet R, Butts C, Conroy T, et al. XELOX (capecitabine plus oxaliplatin): active first-line therapy for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2004;22(11):2084-91.
66. Silva O, Lopes G, Morgenzstern D, Lobo C, Doliny P, Santos E, et al. A Phase II trial of split, low-dose docetaxel and low-dose capecitabine: a tolerable and efficacious regimen in the first-line treatment of patients with HER2/neu-negative metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2008;8(2):162-7.
67. Han JY, Hong EK, Lee SY, Yoon SM, Lee DH, Lee JS. Thymidine phosphorylase expression in tumour cells and tumour response to capecitabine plus docetaxel chemotherapy in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2005;58(6):650-4.
68. Meropol NJ, Gold PJ, Diasio RB, Andria M, Dhami M, Godfrey T, et al. Thymidine phosphorylase expression is associated with response to capecitabine plus irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2006;24(25):4069-77.
69. Puglisi F, Cardellino GG, Crivellari D, Di Loreto C, Magri MD, Minisini AM, et al. Thymidine phosphorylase expression is associated with time to progression in patients receiving low-dose, docetaxel-modulated capecitabine for metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2008.
70. Pasqualini JR, Gelly C, Nguyen BL, Vella C. Importance of estrogen sulfates in breast cancer. *J Steroid Biochem* 1989;34(1-6):155-63.
71. Remaud G, Boisdron-Celle M, Morel A, Gamelin A. Sensitive MS/MS-liquid chromatography assay for simultaneous determination of tegafur, 5-fluorouracil and 5-fluorodihydrouracil in plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005;824(1-2):153-60.
72. Marquet P. *Suivi Thérapeutique Pharmacologique: pour l'adaptation de posologie des médicaments*. Paris: Elsevier; 2004.

73. de Bruin M, van Capel T, Van der Born K, Kruijt FA, Fukushima M, Hoekman K, et al. Role of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in fluoropyrimidine sensitivity. *Br J Cancer* 2003;88(6):957-64.

Plan Détaillé

Sommaire	1
Liste des Figures.....	2
Liste des Tableaux.....	3
Liste des Abréviations	4
Introduction.....	6
I – Etat de la question	7
1 – Généralités	7
a – Historique	7
▶ Découverte de la Thymidine Phosphorylase.....	7
▶ Découverte du PD-ECGF	7
▶ Identification de la TP au PD-ECGF	8
b – Physiologie de la TP	8
▶ Localisation	8
▶ Activité enzymatique	9
▶ Activité angiogénique	10
2 – Implications de la TP dans la pathologie tumorale	11
a – Surexpression au niveau des tissus cancéreux	11
b – Mécanisme de la surexpression de la TP tumorale	13
c – Surexpression et croissance tumorale	16
d – Surexpression et vascularisation tumorale.....	16
e – Surexpression et apoptose	16
3 – Utilisations thérapeutiques de la TP.....	18
a – Implication dans le métabolisme de la Capécitabine.	18
b – Expression de la TP au niveau tumoral et meilleure efficacité des Fluoropyrimidines	21
c – Induction de la TP par les traitements anti-cancéreux.	22
d – L’association Capecitabine et traitements inducteurs de la TP entraîne une amélioration de l’efficacité cytotoxique.....	26
e – L’expression de la TP tumorale est-elle un facteur prédictif de réponse aux traitements par les fluoropyrimidines ?	28
II – Protocoles expérimentaux mis en place.....	30

1 – Avant-Propos : les taxanes.....	30
2 – Mise en évidence de l’induction de la TP.....	31
a – Détermination de la synthèse du 5-FU	31
▶ Rationnel.....	31
▶ Matériel et Méthodes.....	32
▶ Mise au point du modèle	33
▶ Résultats	37
b – Détermination de la synthèse de la TP.....	38
▶ Rationnel.....	38
▶ Matériel et Méthodes.....	39
▶ Résultats	39
c – Quantification de la TP au niveau intracellulaire	40
▶ Rationnel.....	40
▶ Matériel et Méthodes.....	41
▶ Résultats	42
d – Localisation de la TP au niveau intracellulaire : technique d’immunocytochimie.....	43
▶ Rationnel.....	43
▶ Matériel et Méthodes.....	43
▶ Résultats	44
e – Localisation de la TP au niveau intracellulaire : technique de microscopie confocale.....	45
f – Induction de la mortalité cellulaire due au 5’DFUR.....	46
▶ Rationnel.....	46
▶ Matériel et Méthodes.....	47
▶ Résultats	47
3 – Mise en Place d’une nouvelle technique de dosage des fluoropyrimidines : La LC/MS-MS. ..	50
a – Rationnel.....	50
b – Matériel et Méthodes.....	51
c – Résultats.....	54
d – Utilisation en routine : Suivi Thérapeutique Pharmacologique.....	58
e – Avantages de la méthode de dosage par HPLC/MS-MS	59
III – Discussion et Perspectives	61
Conclusion	66
Bibliographie	67
Plan Détaillé	72