

**Analyses biologiques et immunologiques du mésothéliome pleural malin.**  
**Etudes à visées diagnostiques et thérapeutiques**  
**Equipe 4 – Unité 892 INSERM – Marc GREGOIRE**  
**Etude multicentrique sur la région du Grand Ouest**

**Partenaire 1 :** Marc GREGOIRE – U892, Nantes

**Partenaire 2 :** Philippe BERTRAND – UMR 6514, Poitiers

**Partenaire 3 :** Pierre-François CARTRON – U892, Nantes

**Partenaire 4 :** Laurent CELLERIN – Institut Thorax, Service Pneumologie, CHU Nantes

**Résumé du projet et résultats :**

Le mésothéliome pleural malin (MPM) est une tumeur primitive de la plèvre, très agressive, dont le pronostic reste défavorable malgré les avancées thérapeutiques récentes. Son diagnostic est généralement posé à un stade avancé de la maladie, lorsqu'un traitement curatif est peu envisageable. Pour espérer une augmentation significative de la survie des patients atteints de MPM, un diagnostic précoce et spécifique est nécessaire. Certains facteurs solubles comme la mésothéline ou l'ostéopontine, semblent être des marqueurs particuliers pour le MPM, mais les données disponibles sont encore insuffisantes pour pouvoir recommander leur utilisation.

Actuellement difficilement curable par les stratégies thérapeutiques usuelles, quelques études cliniques récemment développées pour d'autres types de cancer, laissent entrevoir la possibilité d'un traitement efficace par des combinaisons d'immunothérapie et d'une chimiothérapie systémique. Nous avons, en effet, récemment montré, que l'induction d'apoptose par des inhibiteurs de méthylation d'ADN (DNMT) et de l'acétylation des histones (iHDAC), pouvait induire de fortes propriétés immunogéniques pour les cellules traitées.

Notre projet, multicentrique de l'interrégion Grand Ouest, présente un double objectif :

→ Tout d'abord, en collaboration avec l'équipe clinique du CHU de St Herblain (Partenaire 4), de poursuivre la mise en place d'une collection d'échantillons biologiques de mésothéliome pleural afin de réaliser des tests comparatifs sur liquides biologiques (liquides pleuraux et sérum) et sur un large panel de lignées cellulaires. Ces échantillons sont nécessaires à la recherche de marqueurs solubles ou cellulaires à des fins de diagnostic, mais également pour des applications thérapeutiques potentielles.

- Ainsi, sur la base de notre collection biologique provenant de liquides pleuraux, nous avons pu isoler plus d'une trentaine de lignées tumorales que nous avons caractérisées par l'expression de marqueurs spécifiques validés (par RT-PCR, IF et FACS) et la libération de facteurs solubles déjà reconnus comme la mésothéline ou l'ostéopontine. La collection biologique est en cours de validation et les lignées tumorales obtenues ont permis de caractériser de nouveaux marqueurs diagnostiques et de suivi pertinents (*voir ci-dessous*).
- Plus récemment, nous avons collecté les populations lymphocytaires T présentes dans ces liquides pleuraux et étudions leur capacité à reconnaître et à tuer les cellules tumorales autologues.
- Nous avons également constitué une collection biologique de cellules mésothéliales transformées ou néoplasiques à partir de liquides péritonéaux et de nodules tumoraux prélevés sur des rats F344 (souche consanguine) induits à la crocidolite (amiante bleue) pendant 8 à 13 mois. L'ensemble des 20 lignées transformées (prénéoplasiques, ne formant pas de tumeurs après transplantation dans des rats syngéniques) et des 4 lignées tumorales (formant des tumeurs après transplantation) présente la même diversité phénotypique que celle rencontrée sur les lignées humaines isolées à partir des échantillons de patients. (*Guillot et al., en préparation*).
- A partir des lignées cellulaires humaines (mésothéliomes et adénocarcinomes de poumon) nos résultats ont aussi montré que la mésothéline soluble restait le meilleur marqueur disponible avec une excellente spécificité mais un manque de sensibilité. Grâce à la technique des puces à ADN, nous avons également identifié et validé 3 nouveaux marqueurs potentiels : le collagène III, la chémokine CCL2 et la galectine-3. En collaboration avec le service d'Anatomie Pathologique du CHU de Nantes (Dr C.SAGAN), nous avons montré que le collagène III est sécrété par les cellules de MPM mais pas par les cellules de cancer du poumon. CCL2 et la galectine-3 étant deux marqueurs solubles, nous

avons montré que les taux de CCL2 étaient significativement augmentés dans les liquides de patients atteints de MPM et que, à l'inverse, la galectine-3 est retrouvée préférentiellement dans les liquides de patients atteints d'adénocarcinome (surtout d'origine pulmonaire) (*Gueugnon et al., en révision*).

- Toujours à partir des prélèvements biologiques et des lignées cellulaires, nous avons mis en évidence MUC1 comme étant un antigène de tumeur exprimé par le mésothéliome pleural malin (MPM) et reconnu par des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques. Nous avons, en effet, établi plusieurs clones reconnaissant l'antigène MUC-1 (950-958), dont l'un des clones montre une grande spécificité envers les cellules tumorales. Le niveau de glycosylation de MUC1 ne semble pas affecter sa présentation aux lymphocytes T CD8+, contrairement à ce qui a été décrit dans la littérature (*Roulois et al, soumis*).

→ Avec ces modèles cellulaires, nous souhaitons également comparer, en collaboration avec une équipe de chimiste à Poitiers (partenaire 2), et une équipe de biologistes à Nantes (partenaire 3), les effets cytotoxiques et immunologiques de nouvelles molécules de synthèses DNMT et iHDAC.

- Notre recherche a ainsi montré que le traitement de cellules tumorales, et en particulier les cellules de mésothéliome, par une combinaison d'iHDAC et d'iDNMT, favorise respectivement la mort cellulaire par apoptose et l'induction d'expression d'antigènes tumoraux de type NYESO-1, MAGE qui sont reconnus par des lymphocytes T spécifiques de ces antigènes. Nous avons montré que la chronologie et la durée des traitements sont importantes pour potentialiser les effets de ces 2 types de molécules. Nous avons montré *in vitro* que les cellules tumorales humaines traitées, pouvaient être reconnues et détruites spécifiquement par des lymphocytes T cytotoxiques. Nous avons également confirmé nos observations *in vitro* dans un modèle murin de MPM, où nous observons que la combinaison d'iHDAC et d'iDNMT provoque une diminution des tumeurs avec la présence d'un infiltrat lymphocytaire répondant spécifiquement aux cellules tumorales (*Leclerc et al, en révision*).
- Nous avons mis en évidence, en collaboration avec l'équipe de François Vallette (U892-Equipe 9a), le mécanisme moléculaire par lequel la méthylation et l'acétylation du promoteur de NY-ESO-1, qui contrôlent son expression, sont régulés dans les cellules de mésothéliomes et de gliomes (*Cartron et al., soumis*).
- Cependant, Le traitement des cellules tumorales par des agents hypométhylants (5-AzaCdr) et iHDAC (VPA, SAHA) stimulant l'expression d'antigène de tumeur (NYESO-1, MAGE...) par les cellules tumorales peut aussi entraîner une inhibition de l'expression de l'antigène de tumeur MUC1 par les cellules de MPM suite au traitement, ce qui provoque une baisse de la reconnaissance de ces cellules par le clone de lymphocyte T CD8+ (*Roulois et al, en préparation*).
- Le projet visant à découvrir de nouveaux iHDAC (collaboration avec le laboratoire de chimie du CNRS de Poitiers) nous a conduit à développer un nouveau système de criblage, de ces composés en système homogène et sur cellules vivantes, basée sur la technologie BRET. Ce système présente l'avantage d'être bon marché et transposable en système de criblage à haut débit. De plus, ce système nous a permis de mettre en évidence un iHDAC actif à faible concentration (nM), plus stable et probablement moins toxique vis-à-vis de cellules saines. (*Blanquart et al, Soumis*).
- Parmi les structures leaders iHDAC obtenues par le partenaire 2 (Poitiers), la préparation des composés les plus actifs a été améliorée (6 étapes de réaction au lieu de 9), augmentant l'intérêt de ces structures en termes de développement ultérieurs. Ces molécules ont été utilisées pour valider la technique BRET en comparaison de résultats antérieurs. Afin d'élargir le panel de molécules pouvant être préparées, une nouvelle méthodologie a été développée pour accéder à des intermédiaires clés et proposant un résultat prédictif de la synthèse selon le substrat. (*Bertrand et al, sous presse*).
- Une toute nouvelle famille de molécules iHDAC a été synthétisée, montrant une activité anticancéreuse prometteuse qui pourrait être adaptée à différents traitements (*Bertrand et al, dépôt de demande de brevet, novembre 2011*).

L'objectif de ces travaux est de développer et de proposer une alternative thérapeutique et/ou adjuvante aux thérapies conventionnelles du mésothéliome pleural, basée sur l'activation de la réponse immunitaire en complément d'une action cytotoxique ciblée.