

THESE

Pour obtenir le grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Sciences de la Vie et de la Santé

**Ecole doctorale : Gc2id**

Discipline : Biologie moléculaire et cellulaire

## **Etude phénotypique des cellules endométriosiques profondes**

Présentée et soutenue publiquement par

**Mahaut Leconte**

le 7 Décembre 2012



### **Jury**

Professeur Bertrand DOUSSET, Président du Jury

Professeur Frédéric BATTEUX, Directeur de thèse

Professeur Jean-Christophe NOEL, Rapporteur

Professeur Christophe PENNA, Rapporteur

Professeur Charles CHAPRON, Examineur

Professeur Francis MICHOT, Examineur

## REMERCIEMENTS

J'aimerais exprimer ici toute l'admiration et l'affection que j'éprouve pour le Professeur Bertrand DOUSSET qui, tout en me transmettant son expérience chirurgicale, m'a progressivement conduite sur la voie de la recherche. C'est ainsi que j'ai découvert un autre univers, celui des sciences. Le Professeur Frédéric BATTEUX m'y a chaleureusement accueillie. Il est passionné pour une thématique qui m'est chère depuis longtemps, et m'a donné les outils pour l'explorer à une autre échelle. Cette thématique est l'endométriose. Je le remercie pour sa disponibilité, son soutien et ses conseils.

Ma rencontre avec l'endométriose date de mon internat au cours des duos opératoires entre le Professeur Bertrand DOUSSET et le Professeur Charles CHAPRON. Depuis, j'y ai consacré ma thèse de médecine et, lors de mon clinicat, un apprentissage clinique et chirurgical pour lesquels les Professeurs Bertrand DOUSSET et Charles CHAPRON m'ont constamment guidée. Le Professeur Charles CHAPRON m'a fait confiance et je suis fière aujourd'hui de reproduire ce duo avec le Docteur Bruno BORGHESE avec qui nous partageons le même enthousiasme. Je remercie le Professeur CHAPRON pour sa générosité dans la transmission de son savoir.

Christiane CHEREAU a eu la patience de m'assister dans mes premiers pas. Le docteur en sciences, Carole NICCO, m'a donné des leçons de chirurgie chez la souris et, en elle, j'ai trouvé une amie. Sandrine CHOUZENOUX, aujourd'hui incontournable en matière d'endométriose, m'a épaulée ces dernières années et m'a permis de mener à bien ce travail. Je les remercie infiniment.

Enfin, j'ai fait une rencontre essentielle, celle du Docteur Bernard WEILL qui sait trouver les mots.

Je remercie chaleureusement les Professeurs Christophe PENNA et Jean-Christophe Noël qui ont accepté de relire ce travail. Je remercie le Professeur Francis MICHOT qui m'honore en acceptant de juger ce travail.

Pensées particulières pour Christine FORTIER.

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	<b>5</b>
<b>CHAPITRE I</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>6</b>
<b>L'ENDOMETRIOSE</b>	<b>7</b>
<b>DESCRIPTION GENERALE DE L'ENDOMETRIOSE</b>	<b>7</b>
DEFINITIONS	7
HISTOLOGIE	8
EPIDEMIOLOGIE	9
CAS PARTICULIER DE L'ENDOMETRIOSE DIGESTIVE	10
<b>PHYSIOPATHOLOGIE</b>	<b>11</b>
LES THEORIES	11
LES BASES FONDAMENTALES	12
<b>FACTEURS DE PREDISPOSITION</b>	<b>16</b>
FACTEURS GENETIQUES	16
FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX	17
FACTEURS EPIGENETIQUES	18
<b>ENDOMETRIOSE ET CANCER</b>	<b>18</b>
<b>STRATEGIE THERAPEUTIQUE</b>	<b>19</b>
TRAITEMENT MEDICAL	19
TRAITEMENT CHIRURGICAL	20
ASSISTANCE MEDICALE A LA PROCREATION	21
<b>MECANISMES DE LA PROLIFERATION</b>	<b>22</b>
<b>STRESS OXYDANT</b>	<b>22</b>
DEFINITION	22
LES MECANISMES DE PRODUCTION DES FORMES REACTIVES DE L'OXYGENE	23
LES MECANISMES DE DETOXIFICATION DES FORMES REACTIVES DE L'OXYGENE	25
LES EFFETS BIOCHIMIQUES DES FORMES REACTIVES DE L'OXYGENE	28
STRESS OXYDANT ET ENDOMETRIOSE	29
<b>LA VOIE RAS-RAF-MEK-ERK</b>	<b>30</b>
LES EFFECTEURS DE LA VOIE ERK, LEURS STIMULI ET LEURS SUBSTRATS	31
ACTIVATION DE LA VOIE RAS-RAF-MEK-ERK PAR LE STRESS OXYDANT	34
LA SPECIFICITE DE ERK	34
ROLE DE LA VOIE RAS-RAF-MEK-ERK	36
RAS-RAF-MEK-ERK ET ONCOGENESE	36
RAS-RAF-MEK-ERK ET INFLAMMATION	36
INTERVENTIONS THERAPEUTIQUES	37

<b>LA VOIE PI3K-AKT-MTOR</b>	<b>38</b>
LES EFFECTEURS DE LA VOIE PI3K-AKT-MTOR, LEURS STIMULI ET LEURS SUBSTRATS	39
PI3K-AKT-MTOR ET ONCOGENESE	49
INTERVENTIONS THERAPEUTIQUES	50
<b>MECANISME DU RECRUTEMENT</b>	<b>52</b>
LA CHIMIOKINE CXCL12	53
LE RECEPTEUR CXCR4	53
MECANISME D'ACTIVATION DE LA VOIE CXCL12-CXCR4	54
EFFETS BIOLOGIQUES DE LA VOIE CXCL12-CXCR4	55
MODULATEURS DE LA VOIE CXCL12-CXCR4	57
LA THEORIE DES CELLULES SOUCHES CANCEREUSES	58
LA THEORIE DES CELLULES SOUCHES ENDOMETRIALES	58
MODELE DU RECRUTEMENT CELLULAIRE	59
INTERVENTIONS THERAPEUTIQUES	62
<b>CHAPITRE II</b>	<b>63</b>
<b>DEMARCHE EXPERIMENTALE</b>	<b>63</b>
<b>DEMARCHE EXPERIMENTALE</b>	<b>64</b>
<b>MATERIEL ET METHODE</b>	<b>68</b>
PRELEVEMENT DES TISSUS HUMAINS	68
EXTRACTION CELLULAIRE ET CULTURE	69
ÉTUDE DE LA PROLIFERATION ET DE LA VIABILITE CELLULAIRE	70
ÉTUDE DE LA PRODUCTION DES FORMES REACTIVES DE L'OXYGENE	70
ÉVALUATION DE L'EXPRESSION DES RECEPTEURS AUX CANNABINOÏDES	71
ÉVALUATION DE L'IMPLICATION DE LA VOIE ERK ET DE LA VOIE AKT	71
ÉVALUATION DE L'EXPRESSION DE CXCR4	73
ÉVALUATION DE LA MIGRATION DES CELLULES D'ENDOMETRE EUTOPIQUE	74
ÉVALUATION DE LA CONCENTRATION DE CXCL12 ET DE IL6 DANS LE LIQUIDE PERITONEAL PAR ELISA	74
ÉVALUATION DE L'EXPRESSION DE ASMA PAR WESTERN BLOT	74
MODELE ANIMAL	75
ANALYSE STATISTIQUE	76
<b>ARTICLE 1 LE TEMSIROLIMUS DIMINUE LES LESIONS D'ENDOMETRIOSE PROFONDE CHEZ LA SOURIS</b>	<b>77</b>
<b>ARTICLE 2 LES INHIBITEURS DE PROTEINE KINASE CONTROLENT LA PROGRESSION DE L'ENDOMETRIOSE</b>	<b>80</b>
<b>ARTICLE 3 EFFETS ANTIPROLIFERATIFS DE L'ANASTROZOLE, DU METHOTREXATE ET DU 5-FU SUR L'ENDOMETRIOSE</b>	<b>83</b>
<b>ARTICLE 4 EFFETS ANTIPROLIFERATIFS DES AGONISTES DES CANNABINOÏDES SUR L'ENDOMETRIOSE PROFONDE</b>	<b>86</b>
<b>ARTICLE 5 ROLE DE L'INTERACTION CXCL12-CXCR4 DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ENDOMETRIOSE PROFONDE</b>	<b>89</b>

<b>CHAPITRE III</b>	<b>106</b>
<b>PERSPECTIVES</b>	<b>106</b>
<b>PERSPECTIVES FONDAMENTALES</b>	<b>107</b>
<b>PERSPECTIVES CLINIQUES</b>	<b>107</b>
PROPOSITION D'UN ESSAI CLINIQUE	107
SCHEMA DE L'ETUDE	108
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>116</b>

# INTRODUCTION

L'endométriose est une maladie fréquente qui touche 8 à 10% des femmes en âge de procréer<sup>1</sup>. Elle est responsable de douleurs pelviennes chroniques et d'infertilité et représente à ce titre un handicap durable dans la vie des malades avec des conséquences majeures sur leur vie sociale, professionnelle et sur leur vie de couple, sans compter une atteinte à leur vie de femme. Elle représente un problème de santé publique tant par sa forte incidence que par le coût considérable qu'elle engendre pour la société, estimé à plus de 2800 \$ par individu et par an aux USA<sup>2</sup>. Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif de la maladie hormis l'exérèse chirurgicale des lésions. Dans le cas de **l'endométriose profonde**, et en particulier en cas d'atteinte rectale, la chirurgie est souvent extensive et associée à une morbidité significative. Les traitements médicaux utilisés jusqu'à présent reposent sur une hormonothérapie visant à bloquer la fonction ovarienne dont l'effet n'est que suspensif et transitoire. La connaissance des mécanismes à l'origine de la maladie endométriosique progresse et des études expérimentales ont ouvert d'autres perspectives thérapeutiques comme les anti-aromatases<sup>3-4</sup> et les anti-oxydants<sup>4</sup>. Ces voies de recherche sont encourageantes, mais il persiste des zones d'ombre physiopathologiques empêchant d'appréhender complètement les complexités biologiques et cliniques de cette maladie. En effet, même s'il existe vraisemblablement des mécanismes métaboliques communs entre les différents types d'endométriose, l'endométriose profonde constitue une forme anatomo-clinique à part. Il existe à ce jour très peu de travaux portant spécifiquement sur les caractéristiques cellulaires de l'endométriose profonde. Une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine de l'initiation et du développement de la maladie permettrait de proposer un traitement ciblé dont le but serait de contrôler la symptomatologie douloureuse ou de proposer une « réduction tumorale » à l'image des traitements néo-adjuvants dans le cancer afin de permettre une chirurgie moins morbide. L'objet de ce travail est d'étudier le phénotype des cellules endométriosiques profondes, en particulier leur caractère hyperprolifératif, d'en explorer les mécanismes et de les exploiter afin de tester de nouvelles voies thérapeutiques.

# **CHAPITRE I**

## **INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**

# L'Endométriose

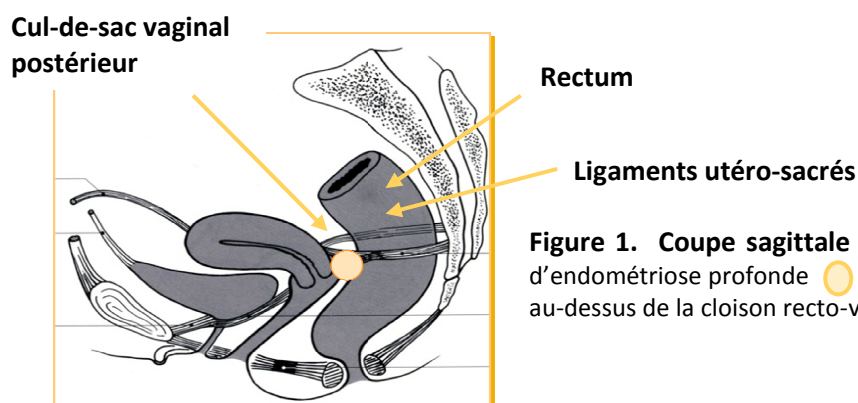
---


## Description générale de l'endométriose

### Définitions

L'**endométriose** se définit comme la présence ectopique de tissu endométrial fonctionnel en dehors de la cavité utérine, situé à distance de l'endomètre, et sans connexion avec lui. Chez les malades endométriosiques, l'endomètre situé en position normale est appelé endomètre eutopique et les lésions d'endométriose sont désignées sous le nom d'endomètre ectopique. L'endomètre ectopique reste sensible aux variations hormonales du cycle menstruel, comme l'endomètre eutopique. Ainsi, la chute brutale des taux plasmatiques d'œstrogènes et de progestérone à la fin de la phase lutéale provoque une desquamation des cellules épithéliales et la survenue d'un saignement aussi bien dans l'endomètre eutopique que dans l'endomètre ectopique. Ce saignement qui se reproduit à chaque période menstruelle aboutit à une inflammation chronique dont la traduction clinique est la survenue de douleurs pelviennes cycliques à recrudescence per-menstruelle. L'endométriose est considérée comme une **maladie bénigne, chronique, inflammatoire et œstrogéno-dépendante** <sup>5</sup>. Elle est caractérisée par une grande hétérogénéité clinique et anatomique permettant de distinguer l'endométriose superficielle, l'endométriose ovarienne et l'endométriose profonde. L'**endométriose superficielle** réalise des implants péritonéaux superficiels blanchâtres ou bleutés préférentiellement localisés dans le pelvis. L'endométriose ovarienne réalise des kystes ovariens endométriosiques ou **endométriomes** dont le contenu hématique est caractérisé par sa couleur « chocolat ». L'**endométriose profonde** infiltre la musculature des organes pelviens <sup>6</sup> à partir d'une lésion initiale située en position rétro-cervicale, au-dessus de la cloison recto-vaginale, en regard du torus utérin <sup>7</sup>. Elle atteint par ordre de fréquence décroissante les ligaments utéro-sacrés, le cul-de-sac vaginal postérieur et la face antérieure du rectum <sup>8</sup> (**Figure 1**). En cas de développement latéral du nodule dans le paramètre, on peut observer une atteinte urétérale extrinsèque voire intrinsèque avec une infiltration de la musculature, responsable d'une urétéro-hydronephrose. L'endométriose vésicale provient de l'infiltration en profondeur d'un nodule endométriosique du cul-de-sac inter-vésico-utérin. L'endométriose profonde est une maladie **multifocale** touchant plusieurs organes à la fois et dans laquelle les différentes formes d'endométriose (superficielle, ovarienne et profonde) peuvent coexister <sup>9-11</sup>.

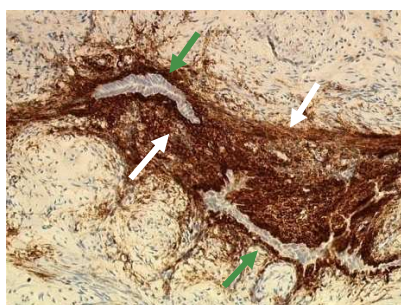




**Figure 1. Coupe sagittale d'un bassin féminin.** Nodule d'endométriose profonde  situé en regard du torus utérin, au-dessus de la cloison recto-vaginale.

## Histologie

Le diagnostic d'endométriose est histologique et repose sur **l'association de glandes et/ou d'un épithélium de type endométrial au sein d'un stroma appelé chorion cytogène**. Les deux populations cellulaires principales, épithéliales et stromales, sont associées dans des proportions variables à de nombreuses cellules du système immunitaire et inflammatoire ainsi qu'à de la fibrose<sup>12-13</sup>. Dans certains cas, une des deux populations cellulaires principales fait défaut. Ainsi, les lésions endométriosiques ont la particularité d'être très **hétérogènes**. Un marquage par l'anticorps anti-CD10, caractéristique des cellules stromales endométriosiques, peut aider au diagnostic des formes atypiques<sup>13</sup> (**Figure 2**).

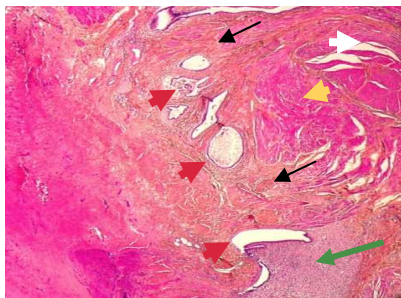


**Figure 2. Marquage anti-CD10 des cellules stromales endométriosiques.**

Coloration brune (flèches blanches) du cytoplasme des cellules stromales constituant le chorion cytogène entourant les glandes endométriales (flèches vertes). *Photo prêtée par S. ARKWRIGHT, Anatomie pathologique, Cochin.*

L'hétérogénéité histologique des lésions d'endométriose existe d'un individu à l'autre mais également chez un même individu selon la localisation des lésions. Pour exemple, les lésions d'endométriose profonde se développent majoritairement au niveau de sites pauvres en graisse et riches en fibres musculaires lisses<sup>12-13</sup>. Elles associent de manière variable des lésions endométriales spécifiques, de la fibrose et des lésions d'hypertrophie musculaire lisse appelées « nodules

adénomyomateux»<sup>14</sup> (Figure 3). Il par ailleurs récemment été décrit une augmentation de la densité des fibres nerveuses dans ces lésions pouvant expliquer la symptomatologie douloureuse<sup>15</sup>.



**Figure 3. Lésion d'endométriose rectale en microscopie optique.**

Des glandes endométriales (têtes de flèches rouges) sont entourées de chorion cytotrophoblastique (flèche verte) et de fibrose (flèches noires) au sein de la musculature rectale (tête de flèche jaune). Photo prêtée par S. ARKWRIGHT, Anatomie pathologique, Cochin.

## Epidémiologie

L'endométriose est une maladie fréquente et universellement répandue. Sa prévalence est difficile à évaluer de façon précise en raison d'un diagnostic histologique qui ne peut être établi qu'au décours d'une coelioscopie. On estime néanmoins que, tous types confondus, elle concerne **8 à 10% des femmes en âge de procréer**<sup>1</sup>. Sa prévalence est de 0,5 à 5% dans la population des femmes fertiles et de 25 à 40% dans la population des femmes infertiles<sup>16</sup>. Sa fréquence serait plus importante chez les femmes asiatiques que chez les femmes afro-américaines et africaines<sup>17-18</sup> ainsi que dans les catégories socioprofessionnelles élevées<sup>19-20</sup>, probablement en raison d'une différence d'accès aux soins. L'endométriose profonde représenterait 20% des endométrioses<sup>21</sup>. Son coût pour la société est estimé à plus de 2800 \$ par individu et par an aux USA, pour l'année 2002<sup>2</sup>.

Peu de facteurs de risques indépendants ont été identifiés. Certaines caractéristiques du cycle menstruel ou de la vie génitale conduisant à une hyperœstrogénie (ménarche précoce et/ou ménopause tardive, nulliparité ou première grossesse tardive, cycles menstruels courts, hyperménorrhée, ménorragies) pourraient cependant favoriser le développement des lésions ectopiques<sup>19-20, 22-25</sup>. Un indice de masse corporelle élevé semble au contraire protéger de la maladie<sup>17</sup>. Le rôle du tabac est controversé, certaines études montrant une diminution de l'incidence de la maladie chez les femmes exposées alors que d'autres au contraire ne montrent aucune influence<sup>26</sup>.

## Cas particulier de l'endométriase digestive

### Topographie des atteintes digestives

L'endométriase digestive est définie par une infiltration endométriosique de la musculature pariétale. Sa prévalence augmente avec la sévérité de l'atteinte pelvienne pouvant alors atteindre 50% dans les stades IV de l'*American Fertility Society* (AFS)<sup>27-28</sup>. La proximité de l'appareil génital met au premier plan les atteintes recto-sigmoïdiennes et iléo-coliques droites. Les localisations rectales et de la jonction recto-sigmoïdienne sont les plus fréquentes (65,7%), suivies des localisations sigmoïdiennes (17,4%), iléales (4,7%), iléo-cæcale (4,1%) et appendiculaires (6,4%)<sup>29</sup>. Dans la majorité des cas, l'endométriase digestive s'intègre dans le cadre d'une maladie endométriosique profonde, sévère et multifocale. Ceci explique que parmi les atteintes digestives, l'atteinte rectale soit la plus fréquente puisqu'elle provient du développement postérieur d'un nodule endométriosique profond<sup>7</sup>. Elle est observée dans 13% des endométrioses profondes et représente le stade le plus évolué de la maladie<sup>29</sup>. Elle est associée à d'autres localisations profondes dans 70% des cas<sup>30</sup> et à une atteinte annexielle dans 80% des cas<sup>8</sup>. Les atteintes sigmoïdiennes et iléo-coliques droites sont le plus souvent associées à une localisation rectale. Un travail récent réalisé dans le service en collaboration avec l'équipe de chirurgie gynécologique du Professeur Chapron a montré qu'une atteinte de la région iléo-colique droite était observée dans 18% des endométrioses profondes avec atteinte rectale. Ces atteintes semblent être un indice de sévérité de la maladie. En effet, une localisation iléo-colique droite s'observe le plus souvent dans le contexte d'une maladie évoluant depuis plus de 5 ans et est associée à des lésions endométriosiques profondes multiples et des atteintes digestives multifocales avec en particulier une localisation sigmoïdienne en plus de la localisation rectale dans 40% des cas (communication orale au congrès mondial de l'endométriase de septembre 2011).

### Symptômes

L'endométriase rectale peut être responsable de douleurs pelviennes chroniques et d'infertilité<sup>1, 31-32</sup>. Les **douleurs** associent de manière variable des symptômes gynécologiques souvent au premier plan (dysménorrhée, dyspareunie profonde, douleurs pelviennes chroniques non cycliques), des symptômes digestifs (constipation douloureuse, dyschésie, rectorragies plus rarement) et des symptômes fonctionnels urinaires à recrudescence péri-menstruelle. La sémiologie de la douleur est liée à la localisation anatomique des lésions<sup>33</sup> et son intensité est corrélée à leur profondeur<sup>29, 34</sup>. L'atteinte iléo-colique droite se manifeste par des douleurs mimant un tableau appendiculaire ou un syndrome de Koenig témoignant d'une sténose digestive relative. Dans notre expérience, comme dans la littérature, les accidents occlusifs sont exceptionnels<sup>35</sup>. La

symptomatologie digestive reste cependant très peu spécifique ce qui explique un retard diagnostic fréquent <sup>36-37</sup>. L'existence d'une endométriose pelvienne profonde symptomatique doit systématiquement faire rechercher une atteinte digestive ou urologique associée, ce d'autant qu'il y a une atteinte annexielle associée <sup>38</sup>. En cas d'atteinte sigmoïdienne ou iléo-colique droite l'examen clinique est pauvre. En revanche lorsque le rectum est atteint, il s'agit le plus souvent d'une lésion sous-péritonéale accessible à l'examen clinique. Le toucher rectal met en évidence une masse enchâssée dans la paroi rectale antérieure et respectant la muqueuse. Le réveil des douleurs lors de la palpation appuyée de la lésion est un argument en faveur du diagnostic. L'examen sous anesthésie générale est de meilleure sensibilité <sup>39-40</sup> et doit associer un toucher vaginal, un toucher rectal et un toucher combiné.

En ce qui concerne l'**infertilité**, il est classiquement admis que 25 à 50% des femmes infertiles ont une endométriose et que 25 à 50% des malades endométriosiques sont infertiles <sup>41</sup>. L'infertilité serait secondaire à (i) une altération de la réserve ovarienne en follicules, (ii) l'atteinte de l'endomètre eutopique responsable d'un défaut d'implantation et (iii) l'inflammation pelvienne interférant avec la fécondation naturelle <sup>32</sup>. Il n'existe aucun parallélisme anatomo-clinique entre l'étendue de la maladie, l'intensité des symptômes et l'infertilité.

## Physiopathologie

### Les théories

Plusieurs théories tentent d'expliquer la survenue de l'endométriose. Cependant, aucune n'explique à elle seule l'ensemble des formes cliniques ni ne permet de rendre complètement compte de l'hétérogénéité phénotypique et histologique de la maladie.

La **théorie de l'implantation** décrite par John A. Sampson dans les années 1920 repose sur le reflux menstruel qui survient de façon physiologique chez 80 à 90% des femmes. Les cellules endométriales qui refluent dans la cavité péritonéale au travers des trompes lors des règles, ne sont pas éliminées par le système immunitaire, prolifèrent, et acquièrent des propriétés d'adhésion, d'implantation et d'invasion <sup>42</sup>. Cette théorie, explique la répartition anatomique asymétrique des lésions d'endométriose. Celle-ci est en effet calquée sur la topographie des régurgitations menstruelles, influencée par la pesanteur et l'anatomie pelvienne. Les lésions pelviennes ont une prédominance antérieure et gauche <sup>43</sup>. Au niveau abdominal, les zones de stagnation du liquide péritonéal déterminent également une asymétrie des lésions endométriosiques qui, à l'inverse, prédominent à droite <sup>44-45</sup>. A cette époque, Sampson évoquait déjà la possibilité d'un phénomène de « mullérianose » correspondant à l'incorporation de résidus endométriaux par différents tissus au

cours de l'organogénèse <sup>46</sup>. Cette théorie a plus récemment été étayée par une étude qui rapporte la présence d'implants endométriaux sur des autopsies de fœtus au niveau de sites habituellement concernés par l'endométriase <sup>47</sup>. La **théorie de la métaplasie** selon laquelle un tissu peut se transformer en un autre à partir d'une origine embryologique commune pourrait expliquer les rares cas de localisations « atypiques » d'endométriase (lésions endométriosiques de la prostate ou de la paroi abdominale antérieure chez des hommes sous hormonothérapie au long cours pour cancer de la prostate, lésions endométriosiques chez des femmes ayant une absence d'endomètre fonctionnel...). La **théorie de l'induction** où un tissu est transformé en un autre sous l'influence d'un tissu adjacent ne repose pour l'instant que sur l'expérimentation animale. Les lésions endométriosiques pourraient être secondaires à la diffusion d'une substance capable de stimuler ou d'induire une différenciation de type épithélial au niveau du tissu d'implantation (épithélium cœlomique) <sup>48-49</sup>. Les tentatives d'induction chez les rates de lésions endométriosiques par injection de liquide péritonéal issu de femmes atteints d'endométriase ont jusqu'alors échoué <sup>50</sup>. A ce jour, aucune étude n'a donc pu confirmer cette théorie dans l'espèce humaine. La **théorie des embolies vasculaires et/ou lymphatiques** est évoquée pour expliquer les localisations ganglionnaires de la maladie <sup>51</sup> ainsi que les localisations à distance du pelvis (cutanées, pulmonaires, cérébrales...). La **théorie des cellules souches endométriales** reposant sur l'existence de cellules souches circulantes originaires de la moelle osseuse ayant la propriété de se différencier en tissu endométriosique à des sites variables a été suggérée plus récemment <sup>52</sup>. Des expériences de greffe de moelle osseuse contenant des cellules progénitrices endométriales chez la souris sembleraient accréditer cette hypothèse <sup>53</sup>.

## Les bases fondamentales

Un reflux menstruel physiologique s'observe chez 80 à 90% des femmes. Hors, une endométriase ne se développe que chez 8 à 10% d'entre elles. Si la régurgitation des cellules endométriales au travers des trompes dans la cavité péritonéale est le point de départ de la maladie, son développement implique d'autres mécanismes. Des modifications de l'endomètre eutopique doivent rendre capable les cellules endométriales de s'implanter et de proliférer dans la cavité péritonéale. Elle-même doit constituer un environnement favorable au développement des lésions. Les phénomènes visant à promouvoir le développement de l'endométriase sont dépendants de facteurs génétiques, épigénétiques, environnementaux, immunologiques et inflammatoires <sup>1</sup>.

### ▪ De l'endomètre eutopique à l'endomètre ectopique

Il a été montré que l'endomètre eutopique des femmes endométriosiques diffère de l'endomètre des femmes non endométriosiques même si cela est histologiquement indiscernable, tout du moins en microscopie optique en coloration standard. Il est le siège d'anomalies moléculaires favorisant le détachement de fragments d'endomètre, leur survie en dehors de l'utérus et leur prolifération «prédisposant» au risque d'endométriase. Les altérations moléculaires décrites dans l'endomètre eutopique existent également dans les lésions ectopiques mais de manière amplifiée. Cela laisse supposer un continuum entre l'endomètre eutopique et l'endomètre ectopique dont les anomalies moléculaires, sous l'effet d'un environnement différent (cavité péritonéale), seraient majorées et destinées à favoriser la survie de l'endomètre ectopique<sup>5,54</sup>.

### ▪ Adhésion

L'adhérence des cellules endométriosiques est favorisée par une surexpression d'enzymes protéolytiques et de facteurs d'adhésion qui permettent l'ancrage des cellules endométriales à la surface du péritoine. En situation physiologique, deux métalloprotéases matricielles (MMP-7 et MMP-11) exprimées dans l'endomètre au cours des règles interviennent dans la destruction de la matrice extra-cellulaire lors de la desquamation de l'épithélium glandulaire. En phase lutéale, l'expression de ces métalloprotéases est réprimée. Chez les patientes endométriosiques, MMP-7 et MMP-11 sont exprimées de façon continue, à la fois dans l'endomètre eutopique et dans l'endomètre ectopique<sup>55</sup>. La destruction locale de la matrice extra-cellulaire du mésothélium péritonéal crée des zones d'adhérence favorables à l'implantation des cellules endométriosiques<sup>56-59</sup>. Ces dernières expriment par ailleurs des protéines d'adhésion telles que des intégrines, la laminine, la E-cadhérine et la fibronectine<sup>60-61</sup>.

### ▪ Facteurs pro-angiogéniques

In vitro, l'endomètre ectopique sécrète de façon anormalement élevée de nombreux facteurs de croissance (EGF, FGF, IGF, PDGF, VEGF) et des cytokines (IL-1, IL-6, IL-8) participant à la survie des implants en leur assurant une vascularisation spécifique<sup>62-63</sup>.

### ▪ Prolifération

Il a été montré une prolifération accrue des cellules endométriosiques par le biais d'une activation des voies de signalisation Wnt et Ras, d'une répression de gènes pro-apoptotiques (issus de la famille Bax) et une surexpression de gènes anti-apoptotiques (issus de la famille Bcl2)<sup>64</sup> mais également par le biais du stress oxydant<sup>4</sup>.

### ▪ Inflammation

L'inflammation chronique est une des principales caractéristiques du tissu endométriosique. Elle est associée à une surproduction de prostaglandines, de métalloprotéases matricielles et de cytokines<sup>1, 65-69</sup>. La production de cytokines pro-inflammatoires (IL1 $\beta$ , IL6 et TNF $\alpha$ ) favorise l'adhésion des fragments d'endomètre au péritoine et la libération d'enzymes protéolytiques en permettent l'implantation. MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*), IL8 et RANTES (*Regulated Upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted*) recrutent des polynucléaires, des cellules NK et des macrophages dont la quantité est caractéristique des lésions d'endométriose<sup>70-71</sup>. Des boucles d'autorégulation positive permettraient la persistance et l'accumulation des cellules immunitaires, des cytokines et des chimiokines au sein des lésions<sup>72</sup>.

L'inflammation est également liée à une surproduction de prostaglandines PGE2 et PGF2 $\alpha$  dans l'endomètre eutopique et dans l'endomètre ectopique. Elles pourraient contribuer aux dysménorrhées et aux douleurs pelviennes, non seulement par l'entretien de la réaction inflammatoire mais également par le biais du déclenchement de contractions utérines<sup>73</sup>.

L'ensemble de ces anomalies auto-entretenues résultent en partie d'une dérégulation hormonale au sein des lésions endométriosiques.

Les cellules et les molécules intervenant dans la réaction inflammatoire s'observent en concentration élevée dans le liquide péritonéal des patientes endométriosiques. Leur taux est corrélé à la sévérité de la maladie. Pour certains il serait un promoteur actif de la croissance des lésions<sup>74</sup>.

### ▪ **Hyperœstrogénie**

La croissance, le développement et la survie des implants endométriosique est favorisée par une production accrue d'œstrogènes (**Figure 4**). Chez les femmes endométriosiques, l'œstradiol est produit dans l'ovaire, la peau et le tissu adipeux mais également dans l'endomètre ectopique. Dans l'ovaire, sous l'influence de la FSH et de la LH, le cholestérol est converti en androstènedione puis en œstrone par l'aromatase, lui-même transformé en œstradiol. Dans la peau et le tissu adipeux, l'aromatase permet également la conversion de l'androstènedione en œstradiol. Alors qu'elle est normalement absente dans l'endomètre, l'aromatase est exprimée dans l'endomètre ectopique. Celle-ci stimule la synthèse de prostaglandines en particulier la PGE2 qui elle-même stimule la production d'aromatase. Il existe donc une boucle d'auto-activation stimulant la prolifération des implants et qui explique la relative inefficacité des traitements hormonaux visant à inhiber la synthèse d'œstrogènes<sup>5</sup>.

### ▪ **Résistance à la progestérone**

Dans le tissu endométriosique et plus précisément au niveau des cellules stromales, il existe une sous-expression de l'isoforme B du récepteur à la progestérone. Dans l'endomètre normal, la progestérone induit l'expression de la 17  $\beta$ 2 hydroxy-deshydrogénase qui métabolise l'œstradiol en œstrone. Dans l'endomètre eutopique des patientes endométriosiques et de façon encore plus démonstrative dans l'endomètre ectopique, la résistance des cellules endométriosiques à la progestérone empêche la synthèse de la 17  $\beta$ 2 hydroxy-deshydrogénase et aboutit à l'accumulation d'œstrogènes favorisant la persistance, la croissance et la prolifération des lésions<sup>75</sup>.

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

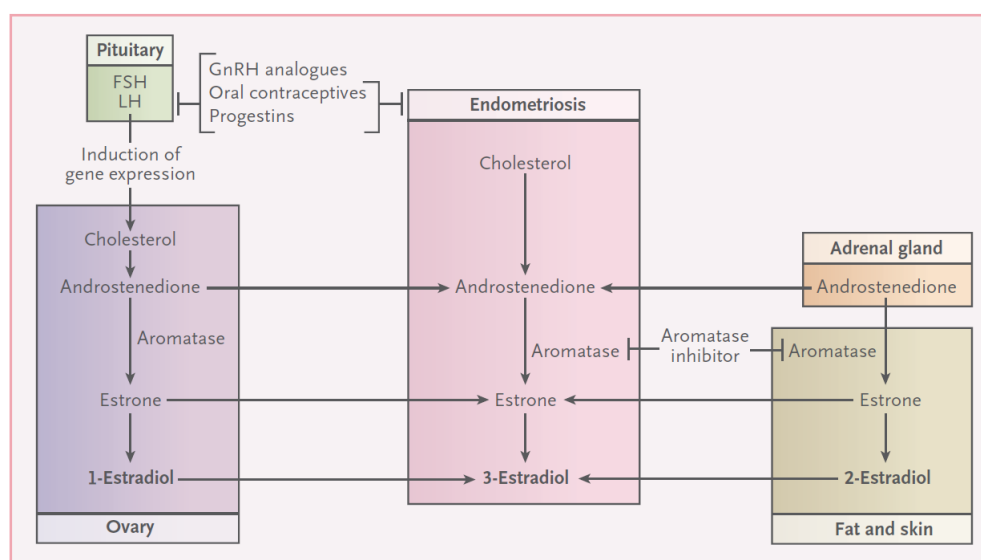
REVIEW ARTICLE

MECHANISMS OF DISEASE

## Endometriosis

Serdar E. Bulun, M.D.

N Engl J Med 2009;360:268-79.



**Figure 4 : Mécanismes de l'hyperœstrogénie dans l'endométriose.** La production d'œstrogènes s'observe dans l'ovaire, de la peau et du tissu adipeux mais également au sein de la lésion endométriosique elle-même qui exprime l'aromatase.

### ▪ Altération de la réponse immunitaire

La survie des cellules endométriales dans la cavité péritonéale est liée à une incapacité du système immunitaire à éliminer les implants à la surface du péritoine<sup>1, 76-77</sup>. Il en résulte une inflammation chronique locale responsable d'une production accrue de cytokines, de facteurs de croissance et de facteurs pro-angiogéniques favorisant eux-mêmes le développement de



l'endométriose selon une autorégulation positive <sup>50</sup>. Certains de ces facteurs engendrent une altération de l'immunité cellulaire et de l'immunité humorale <sup>78</sup>. Il a été observé une augmentation du nombre de macrophages activés, de lymphocytes T et de cellules NK dans le liquide péritonéal associée à une diminution paradoxale de l'activité des cellules NK <sup>78-79</sup> et de la phagocytose par les macrophages <sup>72, 80</sup>. La diminution de capacité de phagocytose serait liée à la présence d'une protéine proche de l'haptoglobine, la protéine Endo 1, dans les cellules épithéliales endométriosiques, capable de se lier aux macrophages activant la production d'IL6 et inhibant la phagocytose <sup>81</sup>.

Les macrophages jouent en outre un rôle central dans le développement des lésions par la production de facteurs pro-angiogéniques (FGF, angiogénine, VEGF) <sup>82-84</sup> et de diverses cytokines <sup>85</sup>. L'IL6 et l'IL10 diminuent le nombre de lymphocytes T CD4 Th1 dans le péritoine <sup>86</sup>, le TGFβ inhibe les cellules NK <sup>78-79 87-88</sup>, l'IL8 et le TNFα stimulent la croissance du tissu endométriosique et l'IL6 et le TNFα augmentent l'hyperœstrogénie <sup>89</sup>. Les lésions produisent elles-mêmes des cytokines chimio-attractantes pour les macrophages (IL1, MCP1, RANTES) <sup>90-92</sup>.

La présence d'auto-anticorps et d'anticorps anti-endomètre dans le liquide péritonéal a suggéré une origine auto-immune à l'endométriose avec des mécanismes moléculaires compatibles<sup>93</sup>.

## Facteurs de prédisposition

L'endométriose est considérée comme une **maladie génétique complexe** dont l'expression résulte de l'effet combiné de facteurs génétiques et environnementaux. Elle est probablement sous la dépendance de plusieurs gènes répondant à une hérédité multifactorielle contrairement à certaines pathologies monogéniques où un seul gène muté est responsable de la maladie.

### Facteurs génétiques

Une prédisposition familiale à l'endométriose est suspectée depuis de nombreuses années. Des études de familles ont confirmé que la prévalence de l'endométriose était plus élevée chez les apparentées au 1er degré de femmes atteintes <sup>94</sup> et des preuves encore plus solides ont été apportées par l'étude de jumelles homozygotes endométriosiques permettant de chiffrer la part des facteurs génétiques dans la survenue de la maladie à 51% <sup>95</sup>. Ces données ont cependant récemment été mises en doute <sup>96</sup> en raison des biais et des facteurs confondants pouvant fausser l'interprétation des résultats des études familiales (un membre d'une famille souffrant d'une maladie incite les autres membres à consulter, les facteurs de risque de la maladie peuvent eux-mêmes avoir un caractère familial...). L'identification de gènes de prédisposition dans l'endométriose qui est

considérée comme une maladie multigénique est difficile. La contribution de chaque gène est faible, de nombreux gènes peuvent être impliqués et le risque de développer la maladie est souvent modifié par l'environnement<sup>97</sup>. Les *études d'association* reposant sur la sélection de gènes candidats choisis sur la base de connaissances physiopathologiques et les *études de liaison* reposant sur le principe de la liaison génétique qui désigne le fait que deux allèles de deux gènes différents sont transmis ensemble d'un individu à sa descendance n'ont pas permis d'identifier de gènes de prédisposition<sup>98</sup>. Récemment, deux équipes ont rapportés les résultats d'une analyse globale du transcriptome comparant l'endomètre eutopique à l'endomètre ectopique avec une concordance de 81%<sup>65, 99</sup>. Borghese et al. montrent que plus de 5000 gènes sont induits ou réprimés dans l'endomètre ectopique comparativement à l'endomètre eutopique<sup>99</sup>. Les gènes induits sont impliqués dans l'adhésion cellulaire et la matrice extracellulaire tandis que les gènes réprimés sont impliqués dans le cycle cellulaire. Ils montrent également une altération de la régulation des gènes Hox impliqués dans la différenciation cellulaire. La même équipe a montré plus récemment une association entre un polymorphisme du gène DNMT3 impliqué dans des phénomènes de méthylation présence et l'endométriase ovarienne<sup>100</sup>.

Des études d'association du génome (*Genome-Wide Association Studies*) ont récemment mis en évidence des polymorphismes nucléotidiques associés à l'endométriase<sup>101-103</sup>.

## Facteurs environnementaux

Des **perturbateurs endocriniens**, comme le Bisphénol-A (BPA) et les phtalates, qui sont des agents chimiques ayant la propriété de mimer les effets des hormones naturelles en interférant avec les voies effectrices de ces hormones ont été associés au développement de l'endométriase. De même la **dioxine**<sup>104</sup>, regroupant une famille de polluants rejetés par l'activité industrielle a été incriminée.

**L'influence de l'alimentation** dans la survenue de maladies œstrogéno-dépendantes dont l'endométriase fait partie, a été particulièrement étudiée ces vingt dernières années. La consommation de végétaux et de fruits frais a été associée à une réduction significative du risque de développer une endométriase alors que la consommation de charcuterie et de viandes rouges semble au contraire être un facteur de risque<sup>105</sup>. Le mécanisme évoqué serait qu'un régime riche en graisses pourrait augmenter le taux d'œstrogènes circulants et ainsi favoriser les maladies œstrogéno-dépendantes<sup>106</sup>.

## Facteurs épigénétiques

L'action des facteurs environnementaux pourrait être médiée par une modulation épigénétique de l'expression de certains gènes notamment par une le biais d'une modification du profil de méthylation des promoteurs de ces gènes<sup>107</sup>. Ce mécanisme a été observé dans l'expression d'un gène impliqué dans la stéroïdogénèse, le SF-1 (steroidogenic Factor-1), dont le promoteur est déméthylé dans les lésions endométriosiques ce qui aboutit à une hyperproduction locale d'œstrogènes<sup>5</sup>.

## Endométriose et cancer

Bien que l'endométriose soit considérée comme une maladie bénigne, il tend à se dégager des similitudes entre le comportement des cellules endométriosiques et des cellules cancéreuses. Les cellules endométriosiques présentent en effet la capacité de dissémination en s'implantant au niveau de sites ectopiques variés (ganglionnaires et à distance du pelvis), d'invasion en infiltrant l'espace sous-péritonéal et la paroi des organes, de prolifération et de néoangiogénèse<sup>108</sup>. Cependant, l'issue de la maladie n'est pas fatale et c'est pour cette raison que l'endométriose peut être considérée comme une « maladie métastatique bénigne ».

L'endométriose ne semble pas être associée à un risque accru de cancer en général mais est associée à un risque accru de cancer ovarien à cellules claires ou de type endométrioïde avec un risque relatif variant entre 1,3 et 2<sup>109-110</sup>. Dans environ 60% des cancers ovariens survenant dans un contexte d'endométriose, le tissu tumoral est adjacent au tissu endométriosique ou naît de celui-ci, suggérant la possibilité d'une transformation maligne<sup>111-112</sup>.

Des anomalies génétiques et chromosomiques communes avec les cancers de l'endomètre ou les cancers ovariens ont été rapportées dans l'endomètre eutopique et l'endomètre ectopique des malades endométriosiques tels que l'activation de proto-oncogènes (c-kit, c-ras), pertes de gènes supresseurs de tumeur (PTEN, p53), aneuploïdie du chromosome 17, perte d'hétérozygoties pour plusieurs loci des chromosomes 9, 11 et 22<sup>113</sup>. De même, des modèles murins d'endométriose ont été créés en activant l'oncogène k-Ras ou en inactivant le gène suppresseur de tumeur PTEN<sup>114-115</sup>. Lorsque les souris présentent les deux mutations, elles développent un cancer endométrioïde rapidement mortel<sup>116</sup> et lorsqu'il existe une délétion de PTEN dans l'utérus, elles développent un cancer endométrial invasif<sup>117</sup>. Cependant, à l'inverse de ce que l'on observe dans le cancer de l'ovaire, une altération des clusters de gènes HOX associée à une répression des gènes du cycle cellulaire a été décrite dans les endométriomes ovariens<sup>99</sup>. Ceci suggère la présence de mécanismes de contrôle du potentiel oncogène de la maladie ce qui va dans le sens d'études récentes, utilisant

des approches d'analyse globale, en faveur de l'absence de risque de dégénérescence carcinomateuse <sup>118</sup>.

## Stratégie thérapeutique

La prise en charge des malades porteuse d'endométriose est multidisciplinaire, idéalement réalisée au sein de centres de référence <sup>119</sup>. Elle doit tenir compte du désir de grossesse, de la présence de facteurs d'infertilité associés, du caractère multifocal des lésions et de l'hétérogénéité de la maladie.

### Traitement médical

Il est hormonal et repose sur le blocage de la fonction ovarienne. Il est proposé en dehors de tout désir de grossesse et n'est que symptomatique. Plusieurs classes thérapeutiques telles que la pilule œstro-progestative, les progestatifs et les analogues de la GnRh sont disponibles. Leur efficacité étant similaire, le choix se fonde sur le coût et les effets secondaires <sup>120</sup>. Dans cette optique, la contraception orale combinée est à proposer en première intention <sup>121</sup>. L'efficacité relative des traitements hormonaux est en partie liée à la résistance à la progestérone observée dans les cellules endométriosiques qui diminue l'efficacité des progestatifs de synthèse et à la production d'aromatase qui induit une production locale autonome d'œstrogènes.

L'inefficacité de la progestérone sur la prolifération des cellules endométriosiques peut s'expliquer par des modifications de l'expression de ses récepteurs à la surface des cellules endométriosiques <sup>1</sup>. Le récepteur à la progestérone possède deux isoformes, le récepteur à la progestérone A (PR-A) ayant une activité inhibitrice et le récepteur à la progestérone B (PR-B) ayant une activité stimulatrice <sup>122</sup>. PR-B est sous-exprimé dans les lésions endométriosiques ainsi que dans l'endomètre eutopique des patientes endométriosiques <sup>123</sup> en raison d'une hyperméthylation de la région promotrice de son gène <sup>124</sup>. De plus, l'inactivation de PR-B provoque l'immortalisation des cellules stromales endométriales <sup>125</sup>. Un déséquilibre de la balance entre les isoformes A et B du récepteur à la progestérone a également été montré dans le cancer. Une augmentation du ratio PR-A/PR-B a été montrée dans le carcinome endométrial <sup>126</sup> et est associée à un mauvais pronostic <sup>127</sup>. De même, une augmentation du ratio PR-A/PR-B a été montrée dans le cancer du sein, en association avec une diminution de l'adhésion cellulaire et une augmentation de la prolifération cellulaire <sup>128</sup>. Ce même déséquilibre a été montré dans les cellules du sein normales portant la mutation BRCA1 <sup>129</sup>.

Le Danazol est un traitement hormonal anti-gonadotrope connu pour avoir des propriétés anti-prolifératives, anti-aromatase et immuno-modulatrice *in vitro* <sup>130</sup> cependant ses propriétés androgéniques peuvent le rendre difficilement tolérable par les patientes.

Les inhibiteurs de l'aromatase (anastrozole, letrozole, exemestane) sont à la frontière entre le traitement hormonal et le traitement anti-tumoral. Ils sont utilisés dans le traitement adjuvant des cancers du sein hormonodépendants chez les femmes ménopausées. Ils ont ouvert une nouvelle voie thérapeutique dans l'endométriiose depuis une dizaine d'années <sup>131-132</sup> en raison de la surexpression de l'aromatase dans les lésions d'endométriiose et dans l'endomètre eutopique des patientes endométriosiques <sup>5, 133</sup>, responsable d'une production locale d'œstrogènes et de la résistance aux progestatifs et aux agonistes de la GnRH. Ils sont néanmoins utilisés avec parcimonie en raison de leur effet sur la déplétion osseuse et de la nécessité de les associer à un traitement bloquant la fonction ovarienne chez les femmes non ménopausées <sup>134</sup> (c'est à dire la population des femmes endométriosiques) imposant donc une ménopause chimique.

La surexpression de l'aromatase dans les cellules endométriosiques est en partie liée à une stimulation de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL6 et l'IL1 <sup>133</sup>.

### Traitement chirurgical

Actuellement, seule une chirurgie extensive comparable à une chirurgie carcinologique « R0 » reposant sur l'exérèse de toutes les lésions d'endométriiose en gardant pour objectif la conservation de la fécondité, permet de contrôler la symptomatologie douloureuse <sup>135-136</sup> et de prévenir les récurrences <sup>29, 137</sup>. Dans le cas de l'endométriiose profonde avec atteinte rectale, il s'agit d'une chirurgie lourde nécessitant dans la majorité des cas la réalisation d'une iléostomie de protection transitoire et associée à une morbidité propre.

L'exérèse de la lésion rectale implique une proctectomie sub-totale ou totale selon le niveau du pôle inférieur de la lésion par rapport au sphincter anal. Cette exérèse emporte en monobloc le cul-de-sac vaginal postérieur et les ligaments-utéro-sacrés lorsqu'ils sont atteints. Une seconde localisation sigmoïdienne est réséquée avec la pièce de proctectomie. Les localisations iléo-coliques droites doivent être attentivement recherchées en per-opératoire car l'imagerie fait défaut dans plus de 50 % des cas (données personnelles non publiées). Elles peuvent être traitées par appendicectomie, résection cunéiforme du caecum, résection iléale ou résection iléo-caecale selon la localisation. Les sutures digestive (colo-rectale) et vaginale sont décalées sur le plan anatomique et protégées l'une de l'autre par l'interposition d'une épiploplastie. Une iléostomie de protection est systématique. Ces précautions permettent de faciliter la gestion d'une éventuelle fistule recto-vaginale. Les uretères sont suivis sur leur trajet distal afin de s'assurer de l'absence d'attraction ou d'infiltration par le nodule endométriosique. Une atteinte urétérale extrinsèque est traitée par une urétérolyse de « décompression » protégée par une sonde double J. Une atteinte urétérale intrinsèque est traitée par une résection suivie d'une réimplantation urétéro-vésicale ou par une

néphrectomie en cas de destruction du rein secondaire à l'urétéro-hydronephrose chronique<sup>138</sup>. Le traitement des lésions annexielles est le plus conservateur possible. Il associe de façon variable, kystectomie ovarienne, ovariectomie, salpingectomie et annexectomie. Une hystérectomie non conservatrice n'est réalisée que chez des malades sélectionnées de plus de 40 ans en cas d'atteinte annexielle bilatérale et d'absence de désir de grossesse. La présence d'une endométriose vésicale est traitée par cystectomie partielle<sup>139</sup>. Toutes les lésions péritonéales superficielles sont détruites.

L'iléostomie de protection est fermée au 8<sup>ème</sup> jour<sup>140</sup> en cas de scanner avec opacification par l'iléostomie montrant l'absence de fistule ou de collection<sup>141</sup>. Dans le cas contraire, elle est fermée à 2 mois. La complication principale de cette intervention est la survenue d'une neurovessie périphérique que l'on observe dans 16% des cas<sup>142</sup>. Elle est liée au traumatisme ou à la section des rameaux nerveux issus des plexus hypogastriques inférieurs et s'observe plus fréquemment en cas d'anastomose colo-anale, d'hystérectomie totale et lorsqu'il y a plus de 4 lésions d'endométriose profonde<sup>142</sup>. Les résultats de cette chirurgie sont satisfaisants dans 94% des cas avec un taux de récurrence profonde évalué à 2%, sans récurrence digestive<sup>142</sup>. L'intervention est menée par laparoscopie dans deux tiers des cas. La suspicion d'une atteinte urologique intrinsèque constitue encore, pour nous, une limite à cette voie d'abord.

Dans un contexte d'infertilité, le traitement chirurgical améliore la fertilité naturelle à condition d'attendre un délai suffisamment long (un an en moyenne)<sup>143</sup>.

## Assistance médicale à la procréation

Chez les patients infertiles, la fécondation in vitro est la technique de référence. Elle peut être proposée avant la chirurgie ou la compléter<sup>32</sup>.

# Mécanismes de la prolifération

---

## Stress oxydant

### Définition

Les Formes Réactives de l'Oxygène (FRO) ou Reactive Oxygen Species (ROS) sont des formes dérivées de l'oxygène à grande réactivité chimique. Elles incluent les radicaux libres de l'oxygène à proprement parler incluant l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ , le radical hydroxyle  $OH^{\bullet}$  et le monoxyde d'azote  $NO^{\bullet}$  ainsi que des formes actives de l'oxygène non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  et le nitroperoxyde  $ONOOH$ . Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atome ou molécule) dont un ou plusieurs électrons sont non appariés. Chaque atome est formé d'un noyau composé de protons et de neutrons, et d'électrons gravitant sur une orbitale autour du noyau où ils sont appariés deux à deux. Lorsqu'ils ne sont pas appariés, leur tendance naturelle est d'interagir avec les électrons de molécules ou atomes voisins pour reformer des liaisons chimiques covalentes. Cette propriété confère une grande instabilité aux atomes dont les électrons sont non appariés ou aux molécules qu'ils forment <sup>144</sup>.

Les radicaux libres peuvent être formés par la perte ou le gain d'un électron :



L'état radicalaire est transitoire et prend fin soit par acceptation d'un électron soit par le transfert de l'électron libre sur une autre molécule. Si l'instabilité du radical libre est modérée, la probabilité qu'il accepte un second électron est forte. Dans ce cas, le radical libre ne représente qu'une étape transitoire dans une réaction d'oxydoréduction. Si l'instabilité du radical libre est grande, l'électron libre est rapidement transféré sur une autre molécule et peut participer à des phénomènes d'oxydation en chaîne <sup>145</sup>. Cependant, si la nouvelle espèce radicalaire est stable, elle pourra compléter sa réaction d'oxydoréduction en se régénérant (gain d'un électron) ou en s'oxydant (perte d'un deuxième électron).

Deux radicaux libres peuvent interagir et former une molécule oxydante non radicalaire. Pour exemples, deux anions superoxydes  $O_2^{\bullet-}$  peuvent former du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  et l'interaction d'un anion superoxydes  $O_2^{\bullet-}$  avec du monoxyde d'azote  $NO^{\bullet}$  peut former du peroxynitrite  $ONOO^-$ .

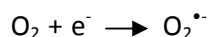
La production des FRO est la conséquence du métabolisme aérobie et s'opère en continu dans toutes les cellules eucaryotes. Les FRO sont éliminées en permanence par plusieurs systèmes antioxydants. Leur concentration intracellulaire est ainsi finement régulée.

## Les mécanismes de production des formes réactives de l'oxygène

Les mécanismes de production des FRO sont représentés **Figure 5**.

### L'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$

L'anion superoxyde est formé par l'addition d'un électron à la molécule d'oxygène :



Ce radical est relativement stable et peut diffuser à distance de son site de formation<sup>146</sup>. Il est peu toxique en lui-même mais peut réagir avec le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  ou le monoxyde d'azote  $NO^{\bullet}$  et donner naissance à de puissants oxydants tels que le radical hydroxyle  $OH^{\bullet}$  et le peroxydinitrite  $ONOO^-$ , respectivement<sup>147</sup>.

Quatre systèmes enzymatiques cellulaires peuvent aboutir à la formation d'anion superoxyde :

- *La chaîne respiratoire mitochondriale*

Quatre-vingt dix pourcent de la production d'anion superoxyde résulte du métabolisme aérobie et provient de la chaîne respiratoire mitochondriale<sup>148</sup>. Durant la phosphorylation oxydative, un gradient de protons est établi au sein de la membrane mitochondriale, constituant une source d'énergie pour la synthèse de l'ATP. La production d'anions superoxydes est associée à ce processus métabolique par une réduction monovalente de l'oxygène à partir des électrons libérés par la chaîne respiratoire. Cette production est continue, ubiquitaire et représente 0.2% de l'oxygène consommé par la chaîne respiratoire<sup>149</sup>.

- *Le cycle catalytique des cytochromes p450*

Les cytochromes p450 sont des hémoprotéines formant des complexes enzymatiques qui oxydent des substrats (AH) par l'intermédiaire du dioxygène<sup>144</sup> en présence d'un agent réducteur ( $RH_2$ ), généralement le NADPH, selon la réaction suivante :



Lorsque le dioxygène subit une réduction monovalente plutôt que d'être lié au substrat, cette réaction conduit à la formation d'anion superoxyde :



- *Les NADPH oxydases (NOX)*

Les NOX constituent une famille d'enzymes majoritairement impliquées dans la défense antibactérienne et la signalisation cellulaire. Ce sont des protéines multimériques



transmembranaires qui siègent au sein de la membrane plasmique et de certaines membranes intracellulaires<sup>150</sup>. Elles catalysent la réduction monovalente du dioxyde en anion superoxyde à partir du NADPH<sup>151</sup>:



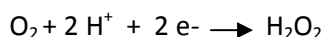
- *La xanthine oxydase (XO)*

La xanthine oxydase est une des deux formes enzymatiques de la xanthine oxydoréductase (XOR), l'autre étant la xanthine déshydrogénase (XDH)<sup>152</sup>. Ces deux enzymes interviennent dans la dégradation des bases puriques en catalysant l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique. La XO entraîne la réduction de l'oxygène en anion superoxyde et la XDH entraîne la réduction de NAD<sup>+</sup> en NADH.

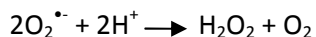
Dans des conditions normales, la XDH est largement majoritaire et le métabolisme des bases puriques représente donc une source négligeable d'anion superoxyde. Cependant, dans certaines conditions pathologiques comme dans le syndrome d'ischémie-reperfusion, la XDH se convertit en XO ce qui est à l'origine d'une production importante d'anion superoxyde<sup>144</sup>.

### Le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Le peroxyde d'hydrogène peut provenir directement de la réduction de l'oxygène moléculaire sous l'effet de diverses enzymes comme la glucose oxydase :



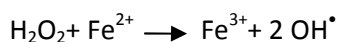
Ou être formé à partir d'anion superoxyde par des superoxydes dismutases (SOD) :



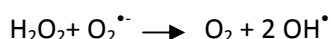
Le peroxyde d'hydrogène est relativement stable. Par ailleurs il a la capacité de traverser les membranes biologiques<sup>153</sup> ce qui explique qu'il peut se trouver à distance de son lieu de production. Sa toxicité repose sur sa capacité à se réduire en radical hydroxyle OH<sup>•</sup> hautement réactif donc toxique en présence d'ions métalliques tels que les ions ferreux Fe<sup>2+</sup> et cuivre Cu<sup>2+</sup>.

### Le radical hydroxyle OH<sup>•</sup>

La principale voie de production du radical hydroxyle implique les cations métalliques notamment fer et cuivre<sup>154-155</sup>. Il s'agit de la réaction de *Fenton* :



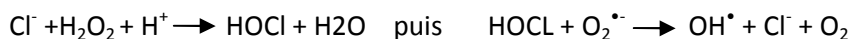
Cependant, sa production peut également se faire indépendamment des cations métalliques par interaction entre le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde. Il s'agit de la réaction d'*Haber-Weiss* :



Ou par l'interaction entre l'anion superoxyde et le monoxyde d'azote :



Ou encore par l'intermédiaire de la myéloperoxydase localisée dans les granules azurophiles des polynucléaires neutrophiles et des monocytes :



Le radical hydroxyle est la forme réactive de l'oxygène la plus instable donc la plus réactive. Sa durée de vie est extrêmement faible <sup>156-157</sup>. Ce radical diffuse peu et réagit quasiment sur le lieu de sa production en arrachant un électron ou un atome d'hydrogène d'un substrat organique RH ou en s'additionnant sur les doubles liaisons.

### Le monoxyde d'azote NO<sup>•</sup>

Le monoxyde d'azote est synthétisé physiologiquement à partir de la L-arginine par la NO-synthase et joue un rôle majeur dans le tonus vasculaire. A forte concentration le monoxyde d'azote devient cependant délétère pour les cellules, notamment en réagissant avec un radical superoxyde pour former le peroxynitrite ONOO<sup>-</sup> qui est un puissant oxydant. Ce dernier peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants comme le NO<sub>2</sub><sup>•</sup> ou le NO<sup>•</sup>.

## Les mécanismes de détoxification des formes réactives de l'oxygène

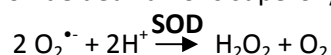
Les mécanismes de détoxification des FRO sont représentés **Figure 5**.

Un antioxydant se définit comme toute substance qui, lorsqu'elle est présente à faible concentration comparativement à celle d'un substrat oxydable, retarde ou prévient significativement l'oxydation de ce substrat <sup>144</sup>. On distingue les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques.

Systemes enzymatiques	Systemes non enzymatiques
<b>Elimination de l'anion superoxyde</b>	
Les superoxydes dismutases	Les Vitamines C et E Les flavonoïdes Les caroténoïdes L'ubiquinone (Coenzyme Q <sub>10</sub> )
<b>Elimination du peroxyde d'hydrogène</b>	
La catalase	Les Vitamines C et E
Le glutathion peroxydase et le glutathion réductase	Le glutathion (GSH)
Peroxyrédoxine et thiorédoxine réductase	La thiorédoxine
Internalisation via les récepteurs à transferrine	
Stockage par la ferritine	

### Les superoxyde dismutases (SOD)

Les SOD catalysent la dismutation de deux anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène:



Cette réaction s'effectue spontanément mais est accélérée d'un facteur de 10 000 en présence de SOD <sup>144</sup>. On distingue trois sortes de SOD dans la cellule eucaryote:

- La SOD1 à cuivre et à zinc (Cu-ZnSOD) principalement localisée dans le cytosol
- La SOD2 à manganèse (MnSOD) située au niveau de la matrice mitochondriale. Elle joue un rôle majeur dans la détoxification des FRO puisque dans des conditions physiologiques, 90% d'entre elles sont produites par la chaîne respiratoire mitochondriale
- La SOD3 à cuivre et à zinc (EC-SOD) présente en majorité dans le milieu extra-cellulaire <sup>158-159</sup>.

Les SOD jouent un rôle majeur dans l'élimination de l'anion superoxyde produit par le métabolisme aérobie, la NADPH oxydase et les cytochromes p450. Cependant, l'effet antioxydant des SOD est conditionné par la possibilité pour la cellule d'éliminer efficacement le peroxyde d'hydrogène, lui-même toxique, produit par la SOD <sup>160</sup>. L'activité des SOD est donc tributaire des enzymes chargées d'éliminer le peroxyde d'hydrogène, à savoir la catalase et la glutathion peroxydase.

### La catalase

La catalase est une peroxydase à noyau hème dont la synthèse est proportionnelle à la concentration de peroxyde d'hydrogène. Elle catalyse directement la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène :



Elle est principalement localisée dans les péroxysomes et n'est pas, ou très peu, présente dans les mitochondries.

### Les glutathion peroxydases (GPx) et le glutathion (GSH)

Les glutathion peroxydases catalysent la décomposition du peroxyde d'hydrogène en couplant sa réduction en H<sub>2</sub>O avec l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en bisulfure de glutathion (GSSG):

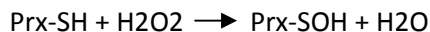


Les GPx sont majoritairement localisées dans le cytoplasme. La plus grande partie du peroxyde d'hydrogène produit au niveau des mitochondries ou du cytoplasme est éliminé par les GPx plutôt que par la catalase <sup>144</sup>. Une petite proportion est néanmoins présente dans la matrice mitochondriale mais les mitochondries étant dépourvues des enzymes nécessaires à la synthèse du GSH, ce dernier doit être importé du cytoplasme.

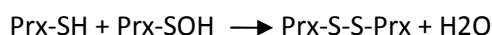
Le glutathion (L-γ-glutamyl-L-cysteinyl-glycine) est synthétisé par l'action consécutive de la γ-glutamylcystéine synthétase puis de la GSH synthétase <sup>161</sup>. Pour maintenir un ratio GSH / GSSG élevé, la forme oxydée du glutathion (GSSG) est réduite en GSH par la glutathion réductase (GR).

## Les peroxirédoxines (Prx) et la thiorédoxine (Trx)

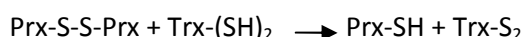
Les peroxirédoxines forment une famille de peroxydases à groupement thiol capables de réduire le peroxyde d'hydrogène et d'autres peroxydes<sup>162-163</sup>. Elles possèdent un résidu cystéine à leur extrémité N-terminale qui constitue le site primitif d'oxydation par le peroxyde d'hydrogène :



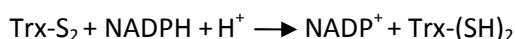
La Prx oxydée réagit avec une autre molécule de Prx-SH pour former un pont di-sulfide :



Le dimère disulfide est régénéré en Prx réduite en oxydant une molécule contenant deux groupements thiols adjacents, la thiorédoxine :



Les deux groupements thiol de la TRx forment un pont di-sulfide qui est réduit par la thiorédoxine réductase en utilisant le NADPH comme donneur d'électron :



Les Prx sont principalement localisées dans le cytoplasme et les mitochondries. Leur activité catalytique est plus faible que celle de la catalase ou des glutathion peroxydases mais elles possèdent une forte affinité avec le peroxyde d'hydrogène. Elles pourraient être ainsi plus efficaces pour éliminer de niveaux faibles de  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>162</sup>.

## Les autres systèmes

La vitamine E (lipophile) et la vitamine C (hydrophile) éliminent les radicaux hydroxyles. L'ubiquinone (co-enzyme  $\text{Q}_{10}$ ) est similaire à une vitamine et joue un rôle significatif dans la production d'énergie au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale et un rôle antioxydant de protection des cellules contre les effets délétères des radicaux libres.

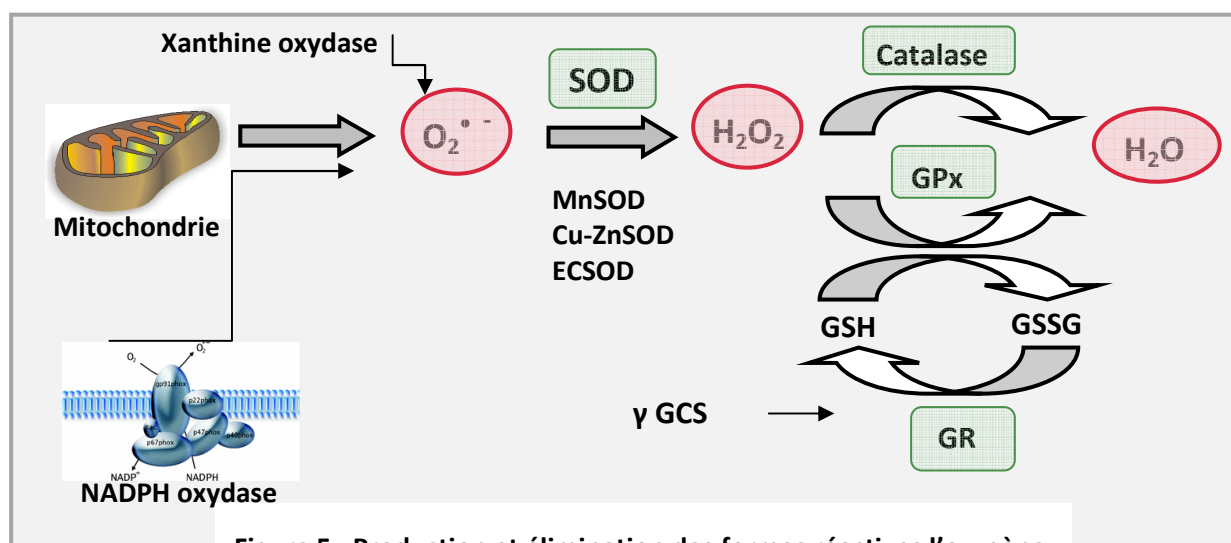


Figure 5 : Production et élimination des formes réactives l'oxygène

## Les effets biochimiques des formes réactives de l'oxygène

Les FRO peuvent interagir entre elles mais également avec tous les types de composants cellulaires comme l'ADN, les lipides, les glucides ou les protéines. Leurs effets dépendent de leur réactivité propre, de leur affinité préférentielle avec un substrat, de leur quantité et de leur capacité de diffusion. Le stress oxydant est défini par une accumulation intracellulaire excessive de FRO <sup>164</sup>. Il peut être dû à un excès de production de FRO et/ou à un défaut des systèmes antioxydants. Le stress oxydant est un phénomène permanent lié au métabolisme aérobie.

### Action sur L'ADN

Le stress oxydant est responsable de la formation de  $10^5$  lésions sur l'ADN de chaque cellule par jour potentiellement mutagènes <sup>165</sup>. L'ADN mitochondrial est particulièrement exposé au stress oxydant du fait de la production locale des FRO par la chaîne respiratoire <sup>166</sup>. Le stress oxydant est impliqué dans les processus de vieillissement, dans un grand nombre de pathologies dégénératives et peuvent participer à la transformation et à la progression tumorale.

### Action sur les lipides

L'action des FRO sur les lipides correspond à la peroxydation lipidique. Elle concerne principalement les acides gras polyinsaturés qui sont des constituants majeurs des membranes cytoplasmiques et mitochondriales. Elle a pour conséquences la transformation des radicaux lipidiques en aldéhydes qui eux-mêmes induisent des mutations de l'ADN et l'induction de l'apoptose par perméabilisation des membranes mitochondriales <sup>163</sup>.

### Action sur les protéines

L'oxydation des protéines entraîne des modifications conformationnelles, des fragmentations ou des liaisons entre protéines susceptibles de modifier leur activité notamment si elles ont des propriétés enzymatiques.

### Régulation du métabolisme cellulaire

Du fait de leur capacité à modifier de nombreuses protéines, les FRO régulent certaines activités enzymatiques et jouent un rôle dans la transmission du signal intracellulaire. Notamment, le peroxyde d'hydrogène est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire. En effet, Les protéines tyrosine-phosphatases (PTP) sont les enzymes les plus sensibles à l'oxydation induite par le peroxyde d'hydrogène. Une faible concentration de peroxyde d'hydrogène induit une inactivation spécifique de PTEN par formation d'un pont disulfite au niveau de son site enzymatique <sup>167</sup>. Cette inactivation engendre un dérèglement de l'activation d'AKT ayant pour conséquence l'amplification d'un message

de survie cellulaire et de prolifération. Le peroxyde d'hydrogène agit également sur les MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) par le biais de la voie ERK (*Extracellular-Regulated Kinase*) pour activer certains facteurs de transcription et amplifier un signal de survie cellulaire <sup>168</sup>. A une concentration plus élevée, le peroxyde d'hydrogène peut activer d'autres MAPK, les SAPK (*stress-activated protein kinase*) qui favorisent l'apoptose <sup>169</sup>.

La sensibilité des protéines au stress oxydant n'est pas uniforme. Des effets opposés peuvent être observés en fonction du type de FRO et de leur concentration. Un stress oxydant massif induit la mort cellulaire en provoquant des lésions multiples sur l'ADN, les protéines et les lipides. A l'inverse, une augmentation plus modérée de la concentration en peroxyde d'hydrogène peut amplifier un message de survie cellulaire et de prolifération en modulant spécifiquement l'activité de quelques protéines hypersensibles. Ce mécanisme est impliqué dans l'oncogenèse <sup>170</sup>.

## Stress oxydant et endométriose

Plusieurs études ont montré une augmentation du stress oxydant dans le sérum et le liquide péritonéal des femmes endométriosiques <sup>171-173</sup>.

Il a été montré dans une étude menée par notre équipe une augmentation du stress oxydant dans les cellules épithéliales issues d'endométriomes ovariens, secondaire à une augmentation de production des formes réactives de l'oxygène et à un défaut de détoxification <sup>4</sup>. Ceci peut être en partie expliqué par l'état inflammatoire local chronique, connu pour augmenter le stress oxydant <sup>174</sup>. Ce même travail a par ailleurs mis en évidence une association entre l'augmentation du stress oxydant et l'augmentation de la prolifération des cellules endométriosiques par le biais de l'activation de la voie ERK <sup>4</sup>. Ce même mécanisme a été mis en évidence dans les cellules cancéreuses <sup>170</sup>. Ainsi, les cellules endométriosiques se comportent vis-à-vis du stress oxydant comme des cellules tumorales avec un stress de base élevé les rendant sensibles à de faibles variations de peroxyde d'hydrogène<sup>4</sup>.

Le rôle du stress oxydant dans la pathogénie de l'endométriose a été confirmé *in vivo* sur des modèles murins d'endométriose traités par un anti-oxydant, la N-acétyl-cystéine, qui permet non seulement la réduction des implants endométriosiques mais également la diminution des phénomènes inflammatoires locaux <sup>4, 175</sup>.

## La voie Ras-Raf-MEK-ERK

Les **MAPK** (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) sont une famille d'enzymes qui activent des protéines en leur ajoutant un groupement phosphate et provoquent ainsi des réactions de phosphorylations en cascades. On en distingue 4 classes principales: ERK, JNK, p38 et BMK. La première cascade à avoir été identifiée dans son ensemble est celle conduisant l'activation de **ERK** (*Extracellular-Regulated Kinase*) par l'intermédiaire de l'EGF-R (récepteur à l'*Epithial Growth Factor*)<sup>176</sup>. La liaison de l'EGF à son récepteur entraîne une dimérisation de ce dernier et une auto-phosphorylation ATP-dépendante sur ses résidus tyrosines. Les phosphotyrosines constituent des sites d'amarrage pour le complexe protéique adaptateur **Grb2-Sos** qui active à son tour la petite protéine G **Ras** en échangeant son GDP (*guanosine diphosphate*) en GTP (*guanosine triphosphate*). Ras activée recrute **Raf-1** à la membrane plasmique. Raf-1 induit la phosphorylation de **MEK** (MAPK/ERK kinase) qui à son tour active **ERK**. ERK phosphorylé (pERK) agit sur divers substrats cytosoliques ou nucléaires entraînant la réponse cellulaire. Chaque protéine de la cascade peut être inactivée par des GTPases et des MAPK phosphatases qui régulent ainsi la durée d'activation de la voie de signalisation (**Figure 6**).

L'activation de la voie Ras-Raf-MEK-ERK est secondaire à un stimulus extracellulaire pouvant être un facteur de croissance, une hormone ou une cytokine mais peut également s'effectuer de manière ligand-indépendante par l'intermédiaire du stress oxydant.

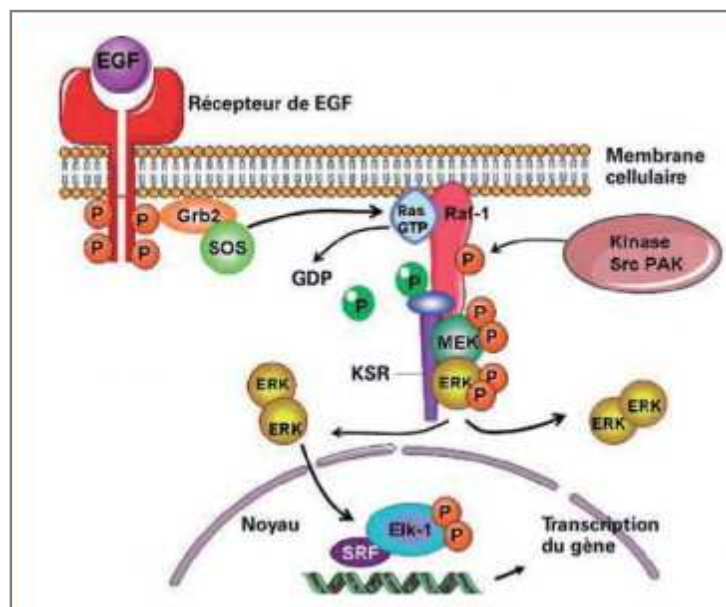


Figure 6 : Mécanisme d'action de la voie de signalisation Ras-Raf-MEK-ERK

## Les effecteurs de la voie ERK, leurs stimuli et leurs substrats

### Ras

#### Structure

L'oncogène Ras est le prototype de la famille des petites protéines G. Il comporte une seule sous-unité de 21 kDa située du côté cytoplasmique de la membrane plasmique. Chez les mammifères, il existe quatre isoformes de la protéine Ras ayant une forte homologie entre elles, codées par trois gènes différents : H-Ras, N-Ras, K-Ras 4A et K-Ras 4B. Elles sont constituées d'un domaine G et d'un domaine hypervariable (HVR). Le domaine G est composé de la boucle P qui lie le  $\gamma$ -phosphate du GTP et du switch I et II qui permet la liaison aux différents régulateurs et effecteurs de Ras.

#### Mécanisme d'activation

L'activation de certains récepteurs comme les RCPG (*récepteurs couplés aux protéines G*) et les RTK (*récepteurs à activité protéine kinase*) ou l'activation d'intégrines par différents ligands active à leur tour la protéine Ras. Les tyrosines phosphorylées des RTK servent de sites d'ancrage à des protéines adaptatrices à domaine SH2 comme Grb2 (*growth factor receptor binding Homology 2*) ou Shc<sup>177</sup>. Par ses deux domaines SH3, Grb2 est constitutivement associée au domaine carboxy-terminal riche en proline de Sos (*Son of sevenless*), le facteur d'échange de Ras. La liaison de Sos au récepteur par l'intermédiaire de Grb2 permet la relocalisation de Ras à la membrane, à proximité de son substrat qu'elle pourra alors activer.

Les protéines PI3K, Gab1 et SHP2 jouent également un rôle majeur dans l'activation de Ras<sup>178-179</sup>.

#### Mécanismes de régulation

Les protéines GAP (*GTPase Activating Protein*) sont capables d'interrompre le signal produit par l'activation de Ras. Parmi elles, la p120GAP est la première à avoir été identifiée<sup>180-181</sup>. La neurofibromine, codée par le gène suppresseur de tumeur NF1, dont la mutation est responsable de la neurofibromatose de type I<sup>181</sup>, intervient également dans la régulation négative de l'activité de Ras<sup>182</sup>.

#### Effecteurs

Ras activée recrute divers effecteurs possédant un domaine RBD (*Ras-Binding Domain*) ou un domaine RA (*Ras Associating*). La liaison de Ras à ces effecteurs déclenche des cascades de signalisation bien distinctes.



La protéine kinase **Raf**<sup>183</sup> qui est la première kinase de la cascade des MAPK et la protéine **PI3K** ont été identifiées comme étant des effecteurs majeurs de Ras. Parmi les isoformes de Ras, H-Ras est l'activateur le plus puissant de la PI3K<sup>184</sup> tandis que K-ras active préférentiellement Raf. Des protéines de la famille GEF (*Guanine Nucleotide Exchange Factor*) telles que les protéines RaGEF qui jouent un rôle important dans la transformation cellulaire, la protéine Tiam1 (*T lymphoma invasion and metastasis protein 1*)<sup>185</sup>, la protéine RIN1 (*Ras and Rab inhibitor 1*), la protéine PLC $\epsilon$  (*phospholipase C eta*), les protéines de la famille RASSF (*RAS association domain family*), la protéine AF6 (également appelée Afadin) et la protéine PKC $\zeta$ <sup>186</sup> impliquées respectivement dans l'adhérence cellulaire et la transcription<sup>181</sup> comptent également parmi les effecteurs de Ras.

Des mutations de Ras entraînant son activation constitutive sont fréquemment impliquées dans la survenue de cancers chez l'homme. K-Ras est l'isoforme la plus mutée<sup>187</sup>.

## Raf

### Structure

Raf (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*) est une protéine de 70 à 75 KDa à activité sérine thréonine kinase. Chez les mammifères, on lui décrit trois isoformes : A-Raf, B-Raf et C-Raf ou Raf-1. B-Raf et Raf-1 sont les plus impliquées dans la voie Raf-MEK-ERK. La protéine Raf-1 constitue le prototype de cette famille.

### Mécanisme d'activation

La forme inactive de Raf-1 est une forme auto-inhibée stabilisée par la protéine chaperone 14-3-3. Ras activée s'associe avec la région RBD de Raf-1, ce qui relocalise la protéine Raf du cytosol vers la membrane plasmique. Des protéines phosphatases (PP) régulent positivement l'activité de Raf en déphosphorylant son site de liaison avec la protéine chaperone 14-3-3 lui permettant alors d'interagir avec Ras<sup>188-190</sup>. L'activation complète de Raf-1 nécessite par ailleurs la phosphorylation synergique de son résidu sérine 338 par les kinases PAK et de son résidu Y341 par src, ainsi que la phosphorylation de la boucle d'activation de son domaine kinase. La protéine Raf-1 est activée par les 4 isoformes de Ras<sup>191</sup> mais c'est K-Ras qui est son activateur le plus puissant<sup>192</sup>.

### Mécanismes de régulation

L'arrêt de l'activation de Raf-1 s'effectue par le biais de la phosphorylation de son résidu sérine 43 par la RKIP (*Raf Kinase Inhibitory Protein*)<sup>193</sup> qui diminue ainsi l'affinité de Ras pour Raf-1<sup>194</sup>. Il a également été montré que les kinases ERK1 et ERK2 induisaient une boucle de rétrocontrôle négatif sur la voie par le biais de Raf.

### Effecteurs

Raf a pour substrat diverses protéines mais celles pour lesquelles sa spécificité est la plus grande sont les MAPK et en particulier MEK<sup>195-196</sup>.

### MEK

Les protéines kinases MEK sont des MAPK qui font partie de la rare famille de protéines kinases à double spécificité, capables de phosphoryler aussi bien les résidus sérines et thréonines que les résidus tyrosines<sup>197-198</sup>. Elles présentent trois isoformes très conservées ayant 85% d'homologies : MEK1a, MEK1b et MEK2. En plus de leur domaine kinase, les MEK possèdent trois domaines importants: un domaine D de liaison aux MAPK, un domaine NES d'export nucléaire et un domaine riche en proline leur permettant d'interagir avec des protéines à domaine SH3<sup>199</sup>. Les MEK sont phosphorylées par la protéine Raf sur deux résidus sérine<sup>189, 200</sup>. Les trois isoformes de Raf n'activent pas les protéines kinases MEK avec la même efficacité. En effet, l'isoforme A-Raf est celle qui active le moins efficacement les kinases MEK<sup>201</sup> tandis que l'isoforme B-Raf est celle qui présente la meilleure affinité de liaison et la plus forte activité kinase envers les kinases MEK<sup>202-204</sup>.

MEK a pour substrat ERK de façon hautement spécifique, ce qui en fait une cible thérapeutique intéressante.

### ERK

ERK est une sérine thréonine kinase dont on distingue deux isoformes présentant 83% d'homologie : ERK1 et ERK2. Elles sont présentes dans presque tous les types cellulaires, y compris les levures. ERK1 est une protéine de 379 acides aminés pesant 43 KDa et codée par un gène situé en 16p11.2. ERK2 est une protéine de 360 acides aminés pesant 41 KDa et codée par un gène situé en 22p11.2. La double phosphorylation de ERK au niveau de la thréonine 202 et de la tyrosine 204 pour ERK1 et de la thréonine 184 et de la tyrosine 186 pour ERK2 est nécessaire à son activation<sup>205</sup> et à sa translocation dans le noyau<sup>206-207</sup>. Les activateurs de ERK sont principalement MEK1 et MEK2. ERK possède plus de 160 substrats et phosphoryle les résidus sérine ou thréonine situés à proximité des prolines<sup>208</sup>.

Elle est impliquée dans la **prolifération cellulaire**, la **régulation du cycle cellulaire** et la **différenciation cellulaire**. Dans le noyau, ERK active de nombreux facteurs de transcription comme c-fos, c-jun, c-myc, Ets-1, NFκB<sup>176</sup> et dans le cytoplasme de nombreux substrats comme des protéines du cytosquelette MAP1 et MAP2 (*microtubule activated protein*) dont la phosphorylation régule les réarrangements du cytosquelette et la morphologie cellulaire au cours du cycle

cellulaire<sup>209</sup>. ERK agit également sur les MAPK exerçant ainsi un rétrocontrôle sur la voie métabolique<sup>176</sup>.

### Activation de la voie Ras-Raf-MEK-ERK par le stress oxydant

Les FRO sont connues pour activer la voie ERK dans plusieurs types cellulaires<sup>210-213</sup>. Elles peuvent activer le domaine intracellulaire de certains récepteurs de facteur de croissance comme le EGF-R et le PDGF-R (*Platelet Derived Growth Factor*) sans que la fixation d'un ligand soit nécessaire<sup>214</sup>, activer Ras directement sans passer par les récepteurs de facteur de croissance<sup>215</sup> voire même court-circuiter Ras impliquant alors d'autres mécanismes d'activation<sup>216</sup>. Il a en effet été montré que les FRO pouvaient avoir un effet direct sur la petite protéine c-Src. Une fois activée, celle-ci phosphoryle la PLC $\gamma$  (*phospholipase C gamma*)<sup>217</sup> qui induit la production de DAG (*diacyl-glycérol*) et augmente la concentration intracellulaire de calcium par activation de canaux calciques. L'augmentation intracellulaire de calcium active plusieurs formes de protéine kinases C (PKC) qui activent à leur tour ERK par l'intermédiaire de l'activation de Ras ou directement en activant Raf<sup>218</sup>.

Par ailleurs, les FRO empêchent l'inactivation de la voie métabolique par le biais de l'inhibition de certaines phosphatases<sup>219</sup>.

Les inhibiteurs de MEK, l'UO126 et le PD98059, bloquent la voie ERK dépendant des FRO<sup>219-220</sup>, ce qui confirme que l'activation de ERK par les FRO passe par MEK<sup>221</sup>.

### La spécificité de ERK

ERK agit sur de très nombreux substrats et transmet des signaux différents, parfois opposés, dans un même type cellulaire. Sa spécificité repose sur plusieurs mécanismes tels que la durée et la force d'activation de ERK, l'interaction avec des complexes multiprotéiques dits « échafaudage », la localisation subcellulaire de ERK, l'interaction avec d'autres voies de signalisation et l'existence de multiples isoformes<sup>222</sup>.

Dans les cellules cancéreuses, plusieurs de ces mécanismes peuvent être altérés.

#### Durée du signal

La durée d'activation de ERK dépend des phosphatases qui inactivent ERK et des rétrocontrôles exercés par les substrats de ERK<sup>223</sup>. L'activation transitoire de la voie ERK par l'EGF entraîne un signal de prolifération cellulaire alors qu'une stimulation prolongée par le NGF (*Neuronal Growth Factor*) entraîne un signal de différenciation cellulaire<sup>224</sup>. De la même manière, une courte activation de ERK active c-fos mais insuffisamment pour entraîner son accumulation alors qu'en cas

d'activation prolongée, c-fos phosphorylé s'accumule en grande quantité dans le noyau, active la transcription d'un grand nombre de gènes et amplifie le signal proprolifératif<sup>225</sup>.

### Interaction avec les complexes protéiques d'échafaudage

Les complexes protéiques d'échafaudage déterminent la cinétique, la localisation et les composants de la voie ERK. L'exemple le plus connu est celui de la protéine **KSR1** (*Kinase Suppressor of Ras 1*) qui s'associe aux MEK et interagit avec plusieurs protéines comme IMP1 (*Impedes Mitogenic signal propagation*) et la phosphatase PP2A pour former un complexe cytosolique qui, lorsqu'il est activé, est relocalisé à la membrane plasmique où il recrute Raf-1, facilite l'activation de MEK et recrute ERK ce qui favorise sa phosphorylation par MEK. Ce complexe protéique réalise une véritable plateforme d'ancrage facilitant l'activation de la voie des MAPK<sup>226-230</sup>.

### Localisation subcellulaire

Dans la cellule au repos, la majorité des composants de la voie ERK est cytoplasmique. Lors d'un stimulus extracellulaire, Raf-1 est recruté à la membrane plasmique pour interagir avec Ras. MEK et ERK activés, sont transloqués vers le noyau<sup>206</sup>. Cette translocation est régulée par des protéines qui peuvent inhiber le passage de ERK dans le noyau à la faveur d'une activité cytoplasmique. Les mécanismes de régulation de la localisation subcellulaire sont mal connus mais il a été montré que la localisation nucléaire forcée d'une chimère ERK2-MEK1 augmentait l'activité transcriptionnelle alors que la même chimère localisée à la membrane plasmique entraînait une diminution de l'activité transcriptionnelle<sup>231-232</sup>.

### Interaction avec les autres voies de signalisation

La voie ERK interagit avec d'autres voies de signalisation comme la voie Rac1/CDC42-Pak1, la voie des cyclin-dépendant kinases (CDKs) ou la voie PI3K-Akt par des phénomènes de phosphorylation-déphosphorylation médiés par des kinases et des phosphatases qui modifient la cinétique et la localisation de l'activité de la voie ERK<sup>233</sup>.

### Les isoformes multiples

La spécificité de ERK liée à l'existence d'isoformes multiples pour chaque effecteur de la voie ERK a été mise en évidence par des expériences de souris knock-out. Les souris KO pour MEK1 ne dépassent pas le stade embryonnaire alors que les souris KO pour MEK2 sont viables et fertiles<sup>234</sup>. Les souris KO pour ERK1 sont viables, fertiles mais présentent une immaturité des thymocytes et des anomalies neuronales alors que les souris déficientes pour ERK2 meurent au stade embryonnaire<sup>235-238</sup>. Même si le rôle de chacune des isoformes n'est pas bien établi, ces expériences montrent qu'elles ont des fonctions différentes.

## Rôle de la voie Ras-Raf-MEK-ERK

La voie Ras-Raf-MEK-ERK intervient dans la **régulation du cycle cellulaire** et l'**apoptose** <sup>239</sup>. Selon le type cellulaire et son niveau d'activation, l'activation de la voie métabolique engendre une progression ou un arrêt du cycle cellulaire. Ainsi, l'activation de la voie Ras-Raf-MEK-ERK aboutit à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 dans les cellules de Schwann du rat, les lignées humaine de cancer de prostate LNCaP, de cancer pulmonaire à petites cellules et de leucémie promyélocytaire HL-60 <sup>240-242</sup> tandis qu'elle augmente la prolifération des cellules hématopoïétiques<sup>243</sup>. La voie Ras-Raf-MEK-ERK joue également un rôle dans l'apoptose par l'intermédiaire de facteurs de croissance induisant un signal pro- (Bim) ou anti-apoptotique (Bcl2) <sup>244-248</sup>.

## Ras-Raf-MEK-ERK et oncogénèse

L'amplification de l'oncogène Ras et l'existence de mutations entraînant son activation constante ont été observées dans près de 30% des cancers humains <sup>249-250</sup>.

Il a également été montré que Raf était muté dans 20 % des cancers humains tels que le mélanome, le cancer de la thyroïde, le cancer colorectal et le cancer de l'ovaire <sup>251-252</sup>. De plus, dans les cellules transformées, Raf induit l'expression de certains facteurs de croissance tels que le VEGF, le hbEGF (*heparin binding Epidermal Growth Factor*), ou le GM-CSF (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*) possédant sur la région promotrice de leur gène un site de fixation pour l'un des effecteurs phosphorylé de la voie Raf-MEK-ERK <sup>253-258</sup>. Ainsi, l'expression aberrante de Raf dans ces cellules entraîne une boucle autocrine paracrine responsable de la stimulation continue de la prolifération cellulaire, participant ainsi à la transformation cellulaire et dans certains cas à la résistance aux chimiothérapies <sup>259</sup>.

La mutation de MEK dans les cancers humains est beaucoup plus rare et aucune mutation de ERK n'a été identifiée à ce jour dans les cellules cancéreuses <sup>260</sup>.

## Ras-Raf-MEK-ERK et inflammation

Dans un contexte inflammatoire, la voie Ras-Raf-MEK-ERK peut être activée par la fixation de cytokines pro-inflammatoires sur un des récepteurs à tyrosine kinase ou de manière ligand-indépendante. L'IL1  $\beta$  et le TNF $\alpha$  sécrétés par des macrophages activés, activent la voie des MAPK (principalement les voies p38 et JNK mais aussi ERK) qui stimule la production de cytokines (IL1 $\beta$ , IL6 et IL8) et active la COX2 (cyclo-oxygénase 2) par des phénomènes de régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle ou par l'intermédiaire de l'activation du NF $\kappa$ B ce qui aboutit au recrutement de cellules immunitaires et à l'amplification de la réaction inflammatoire <sup>261-262</sup>.

## Interventions thérapeutiques

Chaque effecteur de la voie Ras-Raf-MEK-ERK peut théoriquement être ciblé par un inhibiteur pharmacologique. Dans le cancer, l'objectif est le contrôle de l'activation aberrante des cellules tumorales. Cibler cette voie permet d'agir même sans connaître la mutation responsable.

### Inhibiteurs de Raf

Des inhibiteurs de Raf ont été développés et évalués dans plusieurs études cliniques<sup>263-265</sup>. Cependant, l'existence de plusieurs isoformes de Raf et ses interactions avec diverses voies de signalisation intracellulaires peuvent rendre délétère l'utilisation des inhibiteurs<sup>239</sup>. Le **sorafenib** (BAY 43-9006, Nexavar®) est le seul inhibiteur spécifique de Raf (avec une plus grande spécificité pour C-Raf que pour B-Raf<sup>266-267</sup>) utilisé aujourd'hui en pratique clinique. Il possède également d'autres cibles comme le VEGFR, le PDGFR et le Flt-3 (*fms-like tyrosine kinase receptor 3*). Il est utilisé dans le traitement du cancer du rein métastatique<sup>268-269</sup> et dans le carcinome hépatocellulaire localement avancé<sup>270</sup>. C'est une molécule bien tolérée dont les principaux effets secondaires incluent rash cutané, syndrome main-pied, diarrhée et hypertension. Il fait l'objet d'un essai de phase III dans le cancer de la thyroïde et d'un essai de phase II dans le glioblastome récidivant.

Le **Plexikon** (PLX-4720), inhibiteur spécifique de B-Raf, fait l'objet d'études précliniques dans le mélanome<sup>271</sup>.

### Inhibiteurs de MEK

Même si MEK n'est pas fréquemment muté dans le cancer, sa surexpression est classique du fait de l'activation d'amont<sup>239</sup>. Le nombre réduit des sites de phosphorylation nécessaire à son activation facilite le développement d'inhibiteurs. Le **PD98059**, premier inhibiteur spécifique de MEK mis en évidence<sup>272</sup> et l'**UO126** sont validés comme outils de recherche fondamentale dans l'exploration de la voie MEK-ERK, mais les premiers essais cliniques utilisant ces molécules ont été décevants et elles ne sont pas utilisées dans la pratique clinique. D'autres inhibiteurs de MEK tels que le **PD184352** (phase I et II dans le cancer colorectal, du poumon non à petites cellules, du pancréas, du rein, du sein et dans le mélanome), le **PD0325901** (phase I et II dans le cancer du colon, du poumon non à petites cellules, du pancréas, du sein et dans le mélanome), le **AZD6244** (phase I et II dans le cancer du colon, du pancréas, du poumon, du sein et dans le carcinome hépatocellulaire) et le **RDEA119** (phase I et II dans les cancers avancés) sont actuellement en cours d'essai clinique<sup>260</sup>. Seul le léflunomide, dont le métabolite actif est le **A771726**, est utilisé depuis de nombreuses années dans le traitement de fond de la polyarthrite rhumatoïde.

### Inhibiteurs de ERK

Il n'existe pas d'inhibiteur spécifique de ERK.

## La voie PI3K-AKT-mTOR

La voie PI3K-AKT-mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) joue un rôle essentiel dans le métabolisme des cellules cancéreuses. En effet, elle participe à la régulation de l'initiation de la transcription des ARNm et de la synthèse protéique, à l'organisation du cytosquelette d'actine, au trafic membranaire, à la dégradation protéique, à la signalisation PKC et à la synthèse des ribosomes.

Elle peut être activée par les récepteurs de la famille ERB, les récepteurs de l'IGF (*insulin-like growth-factor*) et par Ras. L'activation de la voie PI3K-AKT-mTOR entraîne la phosphorylation de la protéine **4EBP1** qui active la transcription de différents ARNm comme les ARNm de c-MYC, de la cycline D1 et de l'ornithine decarboxylase induisant la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. La voie m-TOR induit également la phosphorylation de la **S6K** qui active tout la sous-unité 40S des ribosomes permettant ainsi d'augmenter l'activité traductionnelle (**Figure 7**).

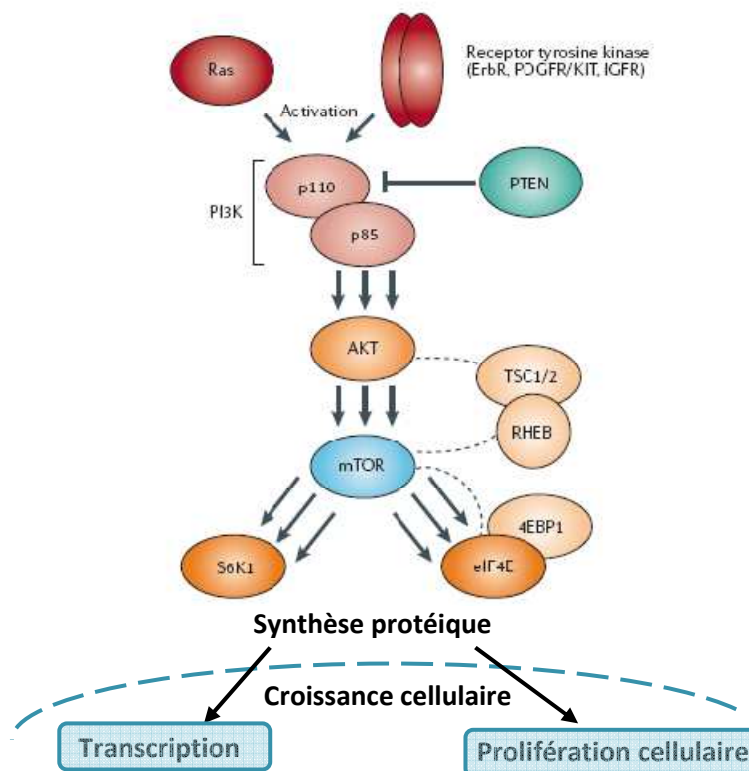


Figure 7 : Mécanisme d'action de la voie de signalisation PI3K-Akt-mTOR

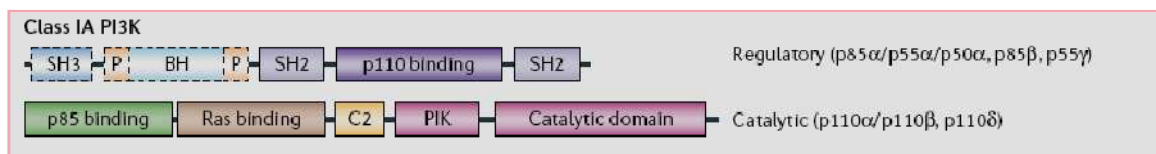
## Les effecteurs de la voie PI3K-AKT-mTOR, leurs stimuli et leurs substrats

### PI3K

#### Structures et fonctions

Il existe 8 **PI3K** regroupées en 3 classes (I, II et III), qui diffèrent de part leur structure, leur spécificité de substrat, leur distribution tissulaire et leurs mécanismes d'activation. Elles jouent un rôle majeur dans la régulation de la survie cellulaire, la prolifération, la croissance, la migration, le métabolisme, le trafic intracellulaire ou encore la morphologie cellulaire. Elles sont fréquemment dérégulées dans les cancers.

Elles constituent une famille d'enzymes à double spécificité possédant à la fois une activité lipide kinase et une activité sérine thréonine kinase. Les PI3K de classe I sont les mieux caractérisées<sup>177</sup>. Ce sont des hétérodimères composés d'une sous-unité régulatrice et d'une sous-unité catalytique p110 dont on distingue deux sous-groupes permettant de différencier les PI3K de classe IA et les PI3K de classe IB (**Figure 8**). Les PI3K de classe IA sont activées en aval des RTK (*Récepteurs à Tyrosine Kinase*), des TKNR (*Tyrosine Kinases Non Réceptrices*) et de Ras et les PI3K de classe IB sont activées en aval des RCPG (*Récepteurs Couplé aux Protéines G*) et de Ras.



**Figure 8: PI3K de classe IA.** La figure représente la structure des domaines des sous-unités régulatrice et catalytique de la PI3K de classe IA. *Engelman et al., Nat Genet, 2006.*

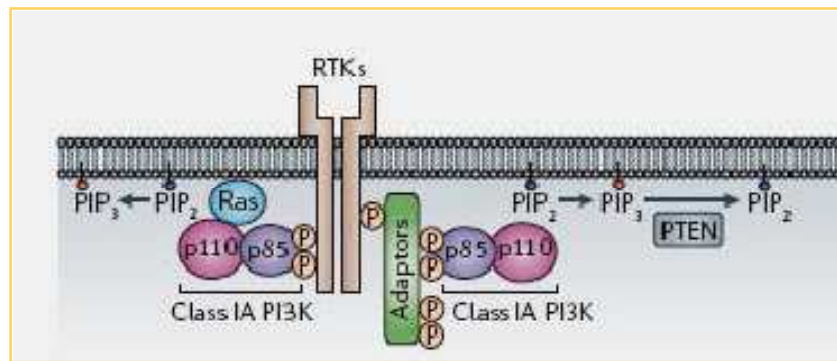
Les PI3K phosphorylent les phosphoinositides en position 3 du noyau inositol, catalysant ainsi la conversion du Phosphatidylinositol (PtdIns) en PtdIns3P, du PtdIns4P en PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> et du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> en PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> (ou PIP<sub>3</sub>). Les PI3K génèrent un second messenger lipidique, le D3-phosphoinositide, qui permet le recrutement à la membrane plasmique de plusieurs protéines de signalisation intracellulaire possédant des domaines PH (*Plekstrin Homology*) telles que les protéines PDK1 et Akt, des protéines à domaine FYVE (*Fab1p YOPB Vps27 EEA1*) ou Phox (PX).

#### Mécanisme d'activation et de régulation des PI3K de classe IA

L'activation et l'auto-transphosphorylation des RTK permettent le recrutement à la membrane de diverses protéines de signalisation par l'intermédiaire de leur domaine SH2. C'est ce



que l'on observe avec les PI3K dont les deux domaines SH2 de leur sous-unité régulatrice interagissent avec les tyrosines phosphorylées présentes sur le récepteur lui-même ou sur des protéines adaptatrices associées aux récepteurs (**Figure 9**). Cela induit la translocation des PI3K à proximité de la membrane où réside la protéine Ras qui amplifie leur activation ainsi que leurs substrats lipidiques.



**Figure 9: Mécanisme d'activation des PI3Ks de classe IA.** Les PI3K de classe IA sont activées par les RTK. Certains récepteurs (récepteurs à l'insuline et à l'IFG1) utilisent des adaptateurs moléculaires (en vert à droite du RTK) pour recruter les PI3K de classe IA *via* leur domaine SH2, tandis que d'autres RTK (PDGFR) les recrutent directement (à gauche du RTK). La 3-phosphatase PTEN déphosphoryle le PIP<sub>3</sub>, inhibant ainsi la signalisation médiée par la PI3K, tandis que la protéine SHIP catalyse la conversion du PIP<sub>3</sub> en PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>. *Engelman et al., Nat Genet, 2006.*

### Protéines régulatrices des substrats des PI3K

**La 3-phosphatase PTEN** (*Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome 10*), encore appelée MMAC (*Mutated in Multiple Advanced Cancer*) est une phosphatase à double spécificité possédant à la fois une activité tyrosine phosphatase<sup>273-274</sup> et une activité lipide phosphatase par laquelle elle est capable de déphosphoryler en position 3 le noyau inositol des phosphoinositides. PTEN exerce donc une régulation négative sur la voie PI3K-Akt-mTOR. Par ce biais, elle joue un rôle de suppresseur de tumeur et intervient dans le contrôle de la survie et de la prolifération cellulaire<sup>275</sup>. PTEN est codée par un gène localisé dans la région chromosomique 10q23 fréquemment inactivée par mutation ponctuelle ou délétion de type perte d'hétérozygotie (LOH)<sup>276</sup>. Dans les cellules normales, la localisation de PTEN est essentiellement nucléaire alors qu'elle est majoritairement cytoplasmique dans les cellules tumorales<sup>277</sup>. La présence de PTEN dans le noyau est inversement corrélée à la prolifération cellulaire et directement corrélée à la différenciation cellulaire.

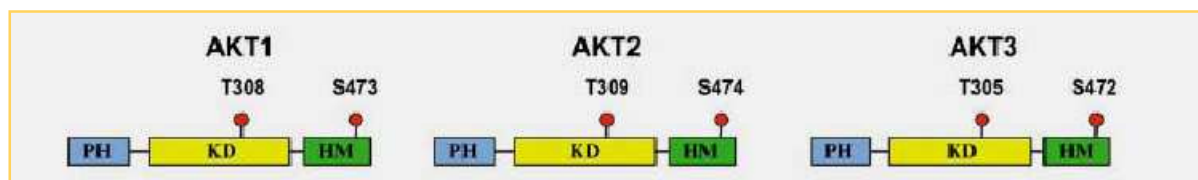
Les 5-phosphatases SHIP1 et SHIP2 appartiennent à La famille des protéines SHIP (*SH2 domain-containing Inositol 5'-Phosphatase*). Ces protéines, hydrolysent spécifiquement le phosphate en position 5 du noyau inositol du PIP<sub>3</sub> et de l'Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>. Elles présentent plusieurs domaines d'association protéique qui leur permettent de jouer un rôle d'adaptateur ou de compétiteur dans l'assemblage de certains complexes de signalisation.

## La sérine thréonine kinase AKT ou PKB

### Structures et fonctions

La protéine AKT ou PKB (*Protein Kinase B*) est une sérine thréonine kinase qui appartient à la superfamille des **kinases AGC** (PKA *c-AMP dependent Protein Kinase A*, PKG *Protein Kinase G*, PKC *Protein Kinase C*). Elle constitue un élément central de la signalisation intracellulaire en réponse aux facteurs de croissance, à l'insuline, aux cytokines ou autres stimuli.

Trois isoformes d'AKT ont été identifiées : AKT1/PKB $\alpha$ , AKT2/PKB $\beta$  et AKT3/PKB $\gamma$ . Elles sont codées par 3 gènes différents situés sur 3 chromosomes différents (14q32 pour AKT1, 19q13 pour AKT2 et 1q44 pour AKT3). AKT1 a une expression quasi-ubiquitaire dans les tissus, AKT2 prédomine dans les tissus sensibles à l'action de l'insuline et AKT3 est préférentiellement exprimé dans le cerveau et les testicules. Un épissage alternatif du gène AKT3/PKB $\gamma$  génère une quatrième isoforme, PKB $\gamma$ 1. Les trois isoformes d'Akt sont constituées d'un domaine PH amino-terminal, d'un domaine kinase catalytique central et d'un domaine régulateur carboxy-terminal (**Figure 10**).



**Figure 10 : Structure des 3 isoformes de la famille Akt.** Bellacosa et al., *Advances in cancer research*, 2005.

Le domaine PH, commun à de nombreuses autres protéines de signalisation, permet une interaction avec les produits de la PI3K tels que le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> et le PIP<sub>3</sub><sup>278-279</sup>. Le domaine catalytique partage de grandes analogies avec les autres kinases de la superfamille AGC notamment les protéines PKA, PKC, p70S6K et p90RSK. On y observe plus de 87% d'homologie de séquence entre les trois isoformes d'Akt<sup>280</sup>. La région carboxy-terminale possède un motif hydrophobe HM caractéristique des protéines kinases AGC. Il est identique dans les trois isoformes d'Akt et joue un rôle majeur puisque sa délétion abolit totalement l'activité enzymatique de PKB<sup>281</sup>.

### Mécanisme d'activation

L'activation d'AKT repose sur son recrutement à la membrane plasmique et sa liaison aux produits des PI3Ks, le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> et le PIP<sub>3</sub>. AKT1 est phosphorylée sur son résidu thréonine 308 situé dans la boucle d'activation du site catalytique et sur son résidu sérine 473 situé dans le domaine HM. Des études suggèrent cependant que seule la phosphorylation du résidu thréonine 308 est nécessaire et suffisante pour activer l'enzyme et pour lui permettre de réguler certaines de ses cibles<sup>282</sup>. AKT2 est phosphorylée sur ses résidus thréonine 309 et sérine 474 et AKT3 est phosphorylée sur ses résidus thréonine 305 et sérine 472 en réponse à une stimulation par l'IGF-1.

Le recrutement membranaire d'AKT1 induit une modification conformationnelle de la protéine qui permet l'exposition du résidu thréonine 308 à la kinase PDK1 (*3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase1*), et probablement du résidu sérine 473 à la PDK2<sup>283-284</sup>. Ainsi, PDK1 localisé à la membrane plasmique, interagit avec les produits de la PI3K grâce à son domaine PH, et phosphoryle AKT sur la thréonine 308. Le mécanisme de phosphorylation de la sérine 473 est secondaire à une auto-phosphorylation<sup>284</sup> ou à une phosphorylation par la kinase PDK2. Cette dernière ne serait autre que le complexe mTORC2 (mTOR-Rictor-GβL-mSin1)<sup>285-286</sup>.

Dans certaines conditions, AKT peut être activée de façon indépendante de la PI3K, notamment en réponse à un choc thermique, ou à une entrée massive de calcium intra-cellulaire<sup>287</sup>.

Une fois phosphorylée AKT peut à son tour phosphoryler ses cibles dans divers compartiments cellulaires notamment dans le noyau où elle est transloquée<sup>281, 288</sup>.

### Protéines régulatrices d'AKT

L'état de phosphorylation des résidus thréonine 308 et sérine 473 peut être dissocié. Il a été démontré que la déphosphorylation de la thréonine 308 était plus rapide que celle de la sérine 473<sup>289</sup>. Deux phosphatases impliquées dans la régulation du niveau de phosphorylation d'Akt ont été décrites. La phosphatase PP2A, sensible à l'acide okadaïque, qui régule la phosphorylation de la thréonine 308, et la phosphatase PHLPP, staurosporine insensible à l'acide okadaïque, qui régule la phosphorylation de la sérine 473<sup>290</sup>.

**La phosphatase PP2A** est une phosphatase à activité sérine thréonine impliquée dans la régulation de nombreux mécanismes cellulaires comme le contrôle de voies de signalisation (notamment le relais PI3K-AKT), la progression du cycle cellulaire, la réplication de l'ADN, la transcription de gènes et la traduction des protéines. Leur perte de fonction a été associée à la transformation cellulaire<sup>291</sup>.

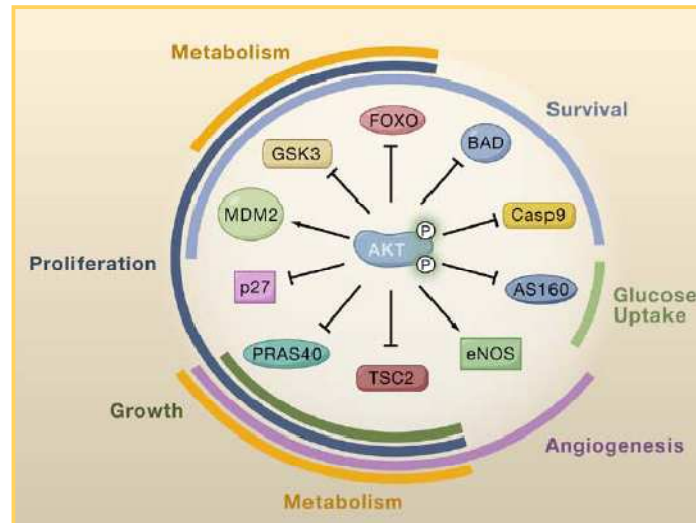
**La phosphatase PHLPP** (*Pleckstrin Homology domain Leucin-rich repeat Protein Phosphatase*) est également une phosphatase à activité sérine thréonine, membre de la sous famille des

phosphatases PPM (*Protein Phosphatase Mg<sup>2+</sup> activated*). Elle nécessite la présence des cofacteurs Mg<sup>2+</sup> et/ou Mn<sup>2+</sup> pour leur activité catalytique et n'est pas inhibée par les traditionnels inhibiteurs de phosphatases comme l'acide okadaïque. Elle contrôle l'amplitude et la durée de la signalisation dépendante d'Akt (et aussi de PKC) en déphosphorylant spécifiquement son motif hydrophobe. On lui décrit 3 isoformes PHLPP1 $\alpha$ , PHLPP1 $\beta$  et PHLPP2 localisées sur des régions chromosomiques fréquemment perdues dans les cancers par perte d'hétérozygotie (LOH). PHLPP1 $\alpha$  et PHLPP1 $\beta$  sont des variants d'épissage issus du même gène localisé sur une région chromosomique (18q21.33) sujette à perte d'hétérozygotie dans les cancers coliques, tandis que PHLPP2 est issu d'un seul gène d'une région sujette à perte d'hétérozygotie dans les cancers du sein et de l'ovaire (16q22.3-16q23.1)<sup>292</sup>.

### Conséquences biologiques de l'activation d'AKT

AKT régule de nombreuses fonctions cellulaires (**Figure 11**). Elle joue un rôle majeur dans la **survie cellulaire** en inactivant des protéines pro-apoptotiques telles que la caspase 9 et Bad<sup>293-294</sup>, en bloquant la transcription de gènes pro-apoptotiques comme Fas ligand, TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) ou TRADD (*TNF receptor type 1 associated death domain*)<sup>295-296</sup>, en activant la transcription de gènes anti-apoptotiques comme Bcl-2, Mcl-1 et Akt elle-même par le biais de l'activation du facteur de transcription CREB (*Cyclic AMP response element binding protein*)<sup>297-298</sup> et en activant NF $\kappa$ B qui induit la transcription de gènes de survie<sup>299</sup>. Elle est également impliquée dans la **régulation du cycle cellulaire** par la phosphorylation et la rétention cytoplasmique des inhibiteurs du cycle cellulaire<sup>300-302</sup>, dans la **croissance cellulaire** et dans la **traduction** par le biais de l'activation d'une sérine thréonine kinase mTOR<sup>303</sup>, dans le **métabolisme cellulaire** en inactivant la GSK 3 (*glycogène synthase kinase 3*) et en activant la glycolyse et le transport du glucose<sup>304-306</sup>, ou encore dans la **prolifération**, la **migration** et l'**invasion**, la **motilité** et l'**angiogénèse**.

En outre, l'activation aberrante de cette kinase, par mutation et/ou amplification des protéines de « l'Aktosome » (RTK, Ras, RCPG, PI3K, PDK1, PDK2, PTEN, SHIP, PP2A ou PHLPP) est fréquente dans de nombreuses maladies comme le diabète de type 2 ou le cancer<sup>307</sup>.



**Figure 11: Effets biologiques d'AKT.** La phosphorylation par Akt des protéines d'aval conduit à leur activation (flèches pleines) ou à leur inhibition (flèches bloquées). *Manning et al., Cell, 2007.*

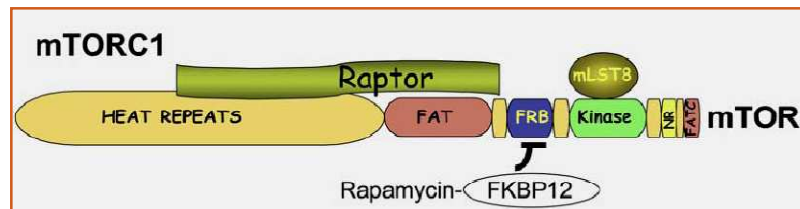
## mTOR (mammalian Target Of Rapamycin)

La protéine **mTOR** également appelée FRAP1 (*FKBP12-Rapamycin-Associated Protein*), RAPT (*Rapamycin Target*) ou SEP (*Sirolimus Effector Protein*), est une protéine ubiquitaire de 289 kDa dont le gène est situé sur le chromosome 1p36.2. Elle a été mise en évidence en 1991 dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Il s'agit d'une sérine thréonine kinase ayant une structure hautement conservée de la levure au mammifère, avec 95% d'homologie de séquence entre la souris, le rat et l'homme. mTOR, en réponse au microenvironnement et aux conditions nutritives (facteurs de croissance, acides aminés) et énergétiques (ratio AMP/ATP), joue un rôle central dans la **régulation de la croissance** et de la **prolifération cellulaire**. Son activité kinase est spécifiquement inhibée par la rapamycine, une lactone macrocyclique produite par la bactérie *Streptomyces hygroscopicus*. Cette dernière se lie à une immunophiline de 12 kDa, FKBP12 (*FK506-binding protein*), formant un complexe qui se fixe au domaine catalytique FRB (*FK506 binding protein Rapamycin Binding domain*) de mTOR, induisant ainsi l'inhibition de son activité. Chez l'homme, la protéine mTOR se trouve sous la forme de deux complexes multiprotéiques, mTORC1 et mTORC2, dont la structure, le mode de régulation, la fonction et la sensibilité à la rapamycine diffèrent<sup>308</sup>.

## Le complexe mTORC1

### - Structure de mTORC1

Le complexe mTORC1, sensible à la rapamycine, est constitué d'au moins trois protéines : mTOR, mLST8/GβL et Raptor (**Figure 12**). PRAS40, (*Prolin-rich Akt/PKB substrate 40 kD*), un quatrième composant a récemment été mis en évidence.



**Figure 12: Structure du complexe mTORC1.** Bhaskar et al., *Dev Cell*, 2007.

Le domaine amino-terminal de **m-TOR** est composé de plus de 20 motifs HEAT (*Huntingtin Elongation factor3 A subunit of PP2A TOR*) répétés en tandem, impliqués dans les interactions protéine-protéine. Il est suivi d'un domaine FAT (*FRAP ATM TRRAP*) qui module l'activité kinase de mTOR, d'un domaine FRB (*FKBP12 Rapamycin Binding Domain*) nécessaire à l'interaction de mTOR avec le complexe rapamycine-FKBP12, puis d'un domaine catalytique. Le domaine NR ou RD (*Repressor Domain*) situé à l'extrémité carboxy-terminale de la protéine, domaine auto-inhibiteur putatif, est suivi du domaine FATC (*FAT C terminus*) indispensable à l'activité kinase de mTOR. La délétion d'un simple acide aminé de ce domaine abolit l'activité de mTOR<sup>309-310</sup>. **Raptor** est une protéine de 150 kDa dont le rôle est de recruter les substrats de mTOR qui possèdent un domaine TOS (*TOR Signalling*). Dans des conditions de privation en nutriments, Raptor se lie à mTOR avec une haute affinité ce qui le maintient dans une conformation inactive. En milieu riche, cette interaction est moins forte ce qui permet à mTOR de phosphoryler ses cibles<sup>311</sup>. **mLST8/GβL** est une protéine de 36 kDa impliquée dans l'activation de mTOR par le biais des acides aminés.

**PRAS40** (*Prolin-rich Akt/PKB Substrate 40 kD*) régule négativement l'activité de mTORC1 en inhibant la liaison à ses substrats. La surexpression de PRAS40 inhibe les phosphorylations de 4E-BP1 et de S6K. Son inhibition spécifique augmente l'activation des cibles de mTORC1 en réponse à une stimulation par les acides aminés<sup>312-314</sup>.

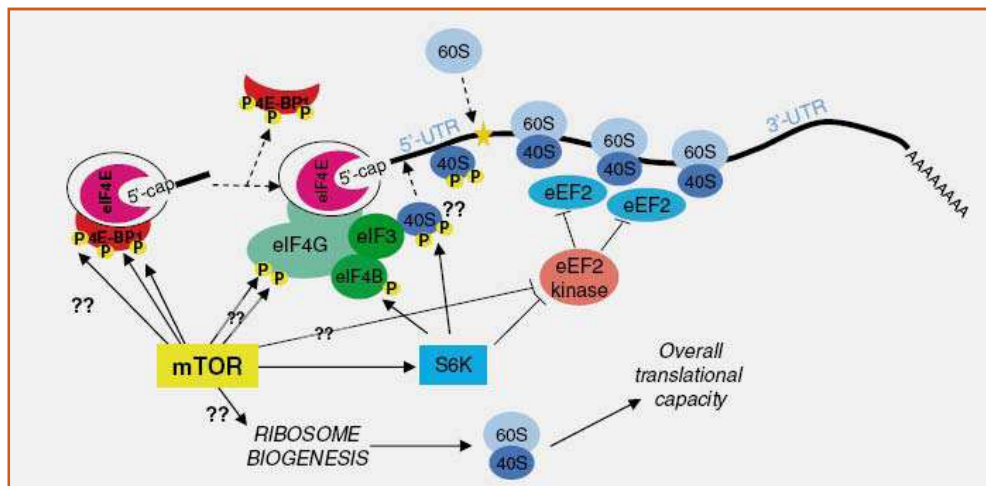
### - Fonctions de mTORC1

Son rôle majeur repose sur le contrôle de **la synthèse protéique (Figure 13)**. Il intervient par le biais de la phosphorylation des substrats impliqués dans la traduction d'ARN messagers. Parmi les nombreux effecteurs de mTORC1, les mieux caractérisés sont la protéine kinase ribosomale p70S6K1

(p70S6K ou **S6K**) et la protéine **4E-BP1** (*4E-Binding Protein 1*). De nombreux travaux portant sur l'activité de la rapamycine ont utilisé le statut de phosphorylation de S6K sur la thréonine 389 et de 4E-BP1 sur les thréonines 37, 41 et 70, comme témoins de l'activité de mTOR.

Le complexe mTORC1 est également impliqué dans le contrôle de la **biogenèse des ribosomes**, de l'**autophagie** et du **métabolisme cellulaire** (du glucose et des lipides notamment).

**S6K** est une sérine thréonine kinase de la famille AGC. Elle est phosphorylée par mTOR après interaction entre Raptor et son motif TOS. Cela induit la fixation de PDK1<sup>315-316</sup> qui phosphoryle à son tour la protéine<sup>317-318</sup>. Une fois activée, S6K phosphoryle la petite protéine ribosomale S6 (*RPS6*). Ainsi, l'activation de S6K augmente la traduction des ARNm codant pour les protéines de la machinerie ribosomale<sup>319-320</sup>. La traduction des ARNm est un processus complexe qui nécessite l'action concertée de facteurs d'initiation, de facteurs d'élongation et de facteurs de terminaison. Le facteur **eIF4E** initie la traduction protéique des ARNm à leur sortie du noyau par la formation du complexe eIF4F (eIF4A, eIF4E et eIF4G), et le recrutement du facteur eIF3 et de la sous unité ribosomale 40S indispensables à la traduction. La formation du complexe eIF4F est régulée par une famille de protéines représentées par 3 petits polypeptides (**4E-BP1/2/3**). Les protéines 4E-BPs répriment la traduction en rentrant en compétition avec eIF4G pour sa liaison à eIF4E. La protéine 4E-BP1, qui comprend un domaine TOS nécessaire à sa liaison à mTOR, présente 7 sites de phosphorylation connus, dont au moins quatre nécessaires pour l'interaction avec eIF4E. Lorsque **4E-BP1** est hypophosphorylée, elle présente une grande affinité pour eIF4E ce qui inhibe la traduction. A l'inverse, lorsque **4E-BP1** est hyperphosphorylée, notamment par mTORC1, elle se dissocie d'eIF4E qui peut alors former le complexe eIF4F et initier la traduction<sup>321</sup>. La rapamycine qui inhibe la phosphorylation des 4E-BPs et augmente son affinité avec eIF4E empêche la traduction protéique. Enfin, il est important de noter que S6K peut également influencer la traduction protéique en participant à l'activation du complexe d'initiation de la traduction. En effet, dans des conditions de privation en acides aminés, S6K inhibe la traduction en séquestrant eIF3, alors qu'après stimulation par des nutriments ou des facteurs de croissance, mTOR phosphoryle S6K, libérant ainsi eIF3 qui va pouvoir initier la synthèse protéique. Ce processus inhibé par la rapamycine est donc dépendant de mTORC1.



**Figure 13: Lien entre mTOR et la machinerie traductionnelle.** Averous et al., *Oncogene*, 2006.

- **Mécanisme d'activation et régulation du complexe mTORC1**

Le complexe mTORC1 est un capteur du statut nutritionnel (acides aminés), énergétique (FC, insuline, oncogènes) et métabolique (ratio AMP/ ATP), impliquant une régulation par de nombreux mécanismes moléculaires.

Le complexe suppresseur de tumeur **TSC1/TSC2** (*Tuberous Sclerosis Complex*) intervient dans la régulation de l'activité de mTORC1. L'inhibition de ce complexe active mTORC1 par le biais de l'activation de **Rheb** (Figure 14). A noter que des mutations affectant les gènes *tsc1* ou *tsc2* sont à l'origine de la sclérose tubéreuse de Bourneville, une maladie génétique caractérisée par l'apparition de tumeurs bénignes de type hamartomes, localisées dans le cerveau, les reins, le cœur, les yeux, les poumons ou la peau.

AKT peut également activer le complexe mTORC1 indépendamment du complexe TSC1/TSC2, par l'intermédiaire de la protéine PRAS40<sup>322</sup>. PRAS40, régulateur négatif de l'activité de mTORC1, est un substrat d'Akt dont la phosphorylation génère un site de liaison pour la protéine chaperone 14-3-3 qui dissocie PRAS40 de mTORC1 (Figure 14).



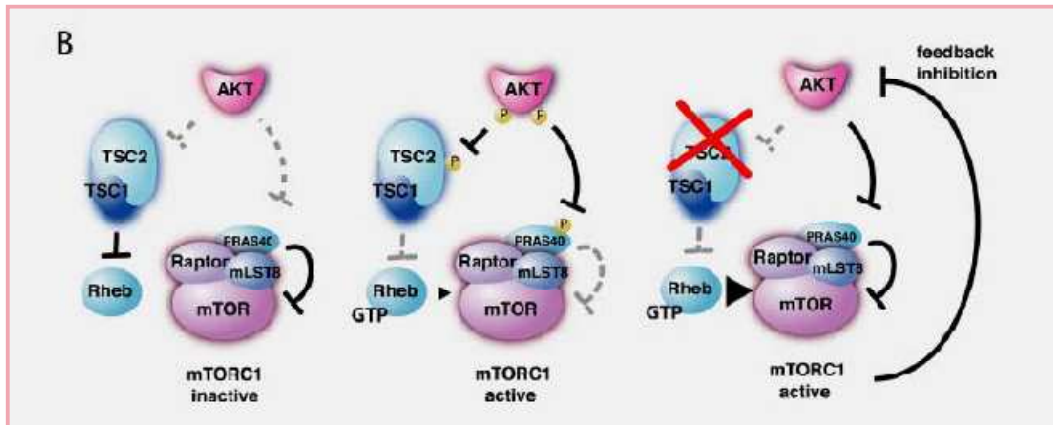


Figure 14 : Co-régulation de mTOR par Rheb et PRAS40. Guertin et al., Cancer Cell, 2007.

### Le complexe mTORC2

#### - Structure de mTORC2

Le complexe mTORC2 est constitué d'au moins quatre protéines : mTOR, mLST8/GβL, Rictor et Sin1 (Figure 15). Il est insensible à la rapamycine car le couple FKBP12-rapamycine ne peut pas se lier à mTOR au sein de ce complexe<sup>323-325</sup>. Contrairement à mTORC1 où seul Raptor est indispensable à l'activité du complexe protéique, l'intégrité de mTORC2 nécessite la présence de toutes les protéines du complexe<sup>325</sup>. Contrairement à mTORC1, l'intégrité de mTORC2 n'est pas altérée par la déprivation en sérum ou en acides aminés<sup>323</sup>.

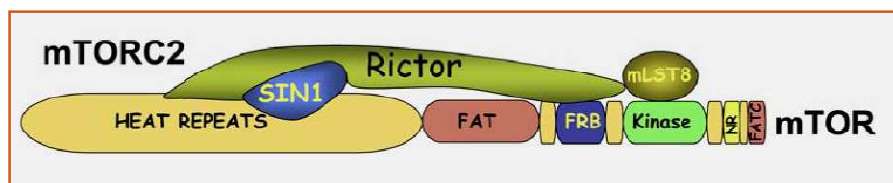


Figure 15: Structure du complexe mTORC2. Bhaskar et al., Dev Cell, 2007.

**Rictor** (*Rapamycin-insensitive companion of mTOR*) est une protéine de 200 kDa qui n'est pas entièrement caractérisée. Sa quantité intracellulaire est inversement proportionnelle à celle de Raptor alors que la quantité de mTOR reste sensiblement la même<sup>311</sup>. Il a par ailleurs été montré que la déplétion de Rictor par un siRNA augmentait la quantité de Raptor et aboutissait à l'augmentation du niveau de phosphorylation de S6K.

Il existe une interdépendance forte entre **SIN1**, **mLST8/GβL** et **Rictor** pour leur interaction avec mTOR. En effet, SIN1 (*SAPK Interacting protein 1*) est indispensable à l'interaction entre mTOR et Rictor. De même, SIN1 ne peut interagir avec mTOR que dans des cellules où Rictor est exprimé<sup>282, 326</sup>. Il a également été montré que Rictor ne pouvait s'associer à mTOR qu'en présence de mLST8/GβL

<sup>327</sup> qui semble avoir un rôle beaucoup plus important au sein du complexe mTORC2 qu'au sein du complexe mTORC1. SIN1 permettrait de présenter des sites d'interactions pour des substrats du complexe mTORC2, comme Akt.

### - **Fonctions de mTORC2**

Le rôle biologique du complexe mTORC2 n'est pas aussi bien connu que celui de mTORC1. Les invalidations des différents composants des deux complexes et de mTOR lui-même ont montré que mTORC1 est fondamental pour les étapes précoces de l'embryogenèse alors que mTORC2 est nécessaire plus tardivement au cours de la gestation. L'inhibition de Rictor ne modifie pas le statut de phosphorylation de S6K contrairement aux composants de mTORC1, démontrant que mTORC2 possède probablement des cibles d'aval différentes de celles de mTORC1.

mTORC2 joue un rôle dans l'organisation du cytosquelette en modulant l'activité de la protéine kinase C alpha (PKC $\alpha$ ) et la polarisation du cytosquelette d'actine au cours de la croissance cellulaire.

Il a par ailleurs été montré que SIN1 jouait un rôle important dans la stabilisation de l'interaction entre Rictor et mTOR, et qu'il était indispensable à la phosphorylation d'Akt sur son résidu Sérine 473. Un modèle d'inactivation génétique d'un composant de mTORC2 (fibroblastes embryonnaires murins SIN1<sup>-/-</sup>) a permis de déterminer que la kinase PDK2 responsable de la phosphorylation d'AKT au niveau de son motif hydrophobe jusqu'alors non formellement identifiée, n'est autre que mTORC2<sup>282, 286</sup>. Ce modèle a également permis de montrer que la phosphorylation de la sérine 473 est indispensable pour la phosphorylation de certaines cibles d'AKT, notamment les membres de la famille des facteurs de transcription Forkhead et pour la protection vis-à-vis du stress apoptotique. En revanche, d'autres cibles d'AKT comme GSK3, TSC2, mTORC1 et S6K1 ne sont pas influencées par l'inactivation de SIN1. Ces résultats suggèrent que la phosphorylation d'AKT sur la sérine 473 pourrait être un reflet de sa spécificité plutôt que de sa pleine activité<sup>282, 286, 326</sup>. A noter que la phosphorylation du résidu thréonine d'AKT par la PDK1 n'est pas influencée par mTORC2.

## **PI3K-AKT-mTOR et oncogénèse**

La voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR joue un rôle clef dans la régulation de différents effecteurs cellulaires et participe à l'équilibre entre survie et mort cellulaire. Une des caractéristiques des cellules cancéreuses est la rupture de cet équilibre entraînant une prolifération cellulaire non contrôlée. Différentes anomalies de la voie PI3K-AKT-mTOR peuvent, sans être un événement suffisant dans l'oncogénèse, constituer un événement favorisant le développement d'une tumeur. On peut par exemple observer une activation de récepteurs à tyrosine kinase (notamment PDGFR-

KIT, IGFR, et HER 1-4) qui deviennent autonomes par rapport aux facteurs de croissance, une surexpression de Ras, une perte de fonction de PTEN, une mutation de PI3K ou d'AKT, ou encore une mutation inactivatrice d'une protéine de régulation de mTOR associée à AKT telle que TCS1 ou TCS2. Enfin, la protéine p53 activée joue un rôle de régulateur négatif de la voie mTOR, or la fonction de p53 est souvent perdue dans les cancers et entraînerait donc une activation constitutive de m-TOR.

Il est à noter qu'aucune mutation de mTOR n'a été décrite à ce jour, ce qui en fait une cible thérapeutique particulièrement intéressante.

## Interventions thérapeutiques

Les inhibiteurs de la voie PI3K-Akt-mTOR entraînent un blocage de la progression dans le cycle cellulaire et ont donc un effet antiprolifératif.

### Inhibiteurs de PI3K

De nombreux **inhibiteurs de PI3K** ont été développés comme la wortmannine en phase préclinique, le LY-294002 en phase préclinique, le **PX-866** en essai de phase I (dans le cancer du sein, du côlon, du pancréas, du poumon non à petites cellules, de la prostate et dans le gliome), le **GDC-0941** en étude de phase I (dans le lymphome, le cancer du sein, du poumon non à petites cellules, et dans les tumeurs solides), le **CAL-101** en essai de phase I (dans le myélome, le lymphome et les leucémie), le **XL-147** en essai de phase I (dans le cancer du poumon non à petites cellules et les tumeurs solides) et le **XL-765** en essai de phase I (dans le cancer du poumon non à petites cellules, et dans le gliome)<sup>328</sup>. La **wortmannine**, est un métabolite fongique qui inhibe de manière irréversible l'activité de la sous-unité p110 de la PI3K de classe 1 en modifiant de façon covalente un résidu lysine présent dans son domaine catalytique tandis que le **LY-294002**, un dérivé de flavonoïde, inhibe de manière réversible l'activité de cette sous-unité. Ces deux molécules inhibent également d'autres cibles de la voie métabolique comme la protéine mTOR<sup>329</sup>. Ces deux molécules ont été fréquemment utilisées pour étudier le rôle de la voie des PI3K dans différents processus biologiques mais n'ont jamais été utilisés en pratique clinique en raison de leur insolubilité en solution aqueuse et de leur toxicité.

### Inhibiteurs d'AKT

De même, de nombreux **inhibiteurs d'AKT** ont été développés comme le **A-443654** en phase préclinique, le **GSK690693** en essai de phase I (dans la leucémie et le lymphome), le **VQD-002** (API-2) en essai de phase I et II (dans le cancer du poumon non à petites cellules, de la prostate et dans la leucémie et le lymphome), le **KP372-1** en phase préclinique et le KRX-0401 (**Perifosine**) en

essai de phase II (dans le myélome multiple, les leucémies, le cancer du poumon non à petites cellules et les tumeurs solides)<sup>328</sup>.

### Inhibiteurs de PDK1

Il existe également des **inhibiteurs non spécifiques de PDK1** comme le **OSU-03012** et le **Celecoxib** (Celebrex<sup>®</sup>) qui est aussi un inhibiteur de COX2.

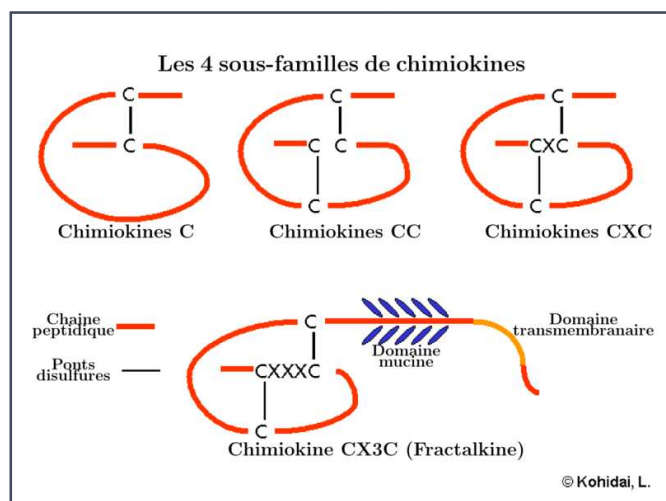
### Inhibiteurs de mTOR

La rapamycine, ou sirolimus, est un antibiotique qui a initialement été étudié pour ses propriétés antifongiques, puis pour ses propriétés immunosuppressives (Rapamune<sup>®</sup>, utilisé en pratique courante dans le traitement anti-rejet de greffe). Secondairement, ses propriétés anti-prolifératives et pro-apoptotiques ont été mises en évidence sur les cellules tumorales, à l'origine du développement des rapalogues (analogues de la rapamycine), la rapamycine elle-même n'ayant pas été développée dans le domaine de la cancérologie. Ces rapalogues sont le temsirolimus, l'everolimus et le deforolimus. Ce sont des inhibiteurs de mTORC1.

Le **temsirolimus**, ou CCI-779 (Torisel<sup>®</sup>), est un analogue hydrosoluble de la rapamycine, d'administration orale ou intraveineuse. Contrairement aux autres molécules, il s'agit d'une prodrogue qui s'hydrolyse en quelques minutes et est ainsi transformée en sirolimus. Les études précliniques ont montré qu'une administration intermittente de ce médicament diminuait ses propriétés immunosuppressives tout en permettant de conserver ses propriétés anti-tumorales. La principale toxicité dose limitante du temsirolimus est une thrombopénie réversible et exceptionnellement symptomatique. Les autres toxicités sont des réactions cutanées, des mucites, et des perturbations du bilan lipidique. Une toxicité pulmonaire tardive, à type de pneumopathie interstitielle, a également été décrite<sup>330</sup>. Ce médicament est actuellement commercialisé dans le carcinome rénal à cellules claires métastatique. L'**everolimus**, ou RAD001 (Afinitor<sup>®</sup>), est un autre analogue de la rapamycine qui s'administre par voie orale. Les toxicités sont là encore modérées, avec quelques rashes cutanés, des thrombopénies, leucopénies, et des dyslipidémies. Ce médicament est en cours de commercialisation dans les cancers du rein résistants aux anti-angiogéniques. Différents essais cliniques ont aussi été réalisés avec notamment une activité dans les tumeurs endocrines<sup>331</sup>. Le **deforolimus**, ou AP23573 est le troisième analogue de la rapamycine, d'administration intraveineuse, et dont les propriétés inhibitrices sur mTOR ont été démontrées in vitro. Les toxicités dose-limitantes les plus importantes dans les essais de phase I étaient des ulcérations buccales, et des rashes cutanés. Il n'était pas observé d'effet immunosuppresseur<sup>332</sup>.

## Mécanisme du recrutement

Les chimiokines sont des petites cytokines de 8 à 12 kDa, pro-inflammatoires, chimioattractantes, et majoritairement solubles. Elles sont caractérisées par la présence de quatre résidus cystéine déterminant leur structure tridimensionnelle et sont classées en quatre sous-familles en fonction de l'espacement entre les deux premières cystéines situées en région N-terminale (**Figure 16**): la famille **CXC** ou alpha, possède un acide aminé entre les deux premières cystéines ; la famille **CC** ou beta, possède deux cystéines adjacentes ; la famille **CX3C** ou delta, dont l'unique membre, la Fractalkine, possède trois acides aminés entre les deux premières cystéines ; et la famille **C** ou gamma, dont l'unique membre ne possède qu'une seule cystéine. La chimiokine **CXCL12** (*stromal cell-derived factor-1*) appartient à la famille alpha.



**Figure 16: Représentation des 4 familles de chimiokines**

Elles se lient spécifiquement à des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéine G<sup>333-335</sup>. Plus de 50 chimiokines et de 20 récepteurs ont été identifiés à ce jour<sup>336-337</sup>. La plupart des chimiokines peuvent se lier à plusieurs récepteurs et le même récepteur peut accepter plusieurs chimiokines. La chimiokine CXCL12 se lie aux récepteurs **CXCR4** et CXCR7 mais CXCR4 ne peut recevoir que CXCL12. La quasi-exclusivité de l'interaction entre CXCL12 et CXCR4 explique l'importance du rôle biologique de cette voie de signalisation. Il a en effet été montré que l'inactivation des gènes codant pour CXCL12 et pour CXCR4 était létale au stade embryonnaire chez la souris en raison d'un défaut de migration des cellules souches hématopoïétiques du foie fœtal à la

moelle osseuse embryonnaire et d'un défaut de développement du système cardio-vasculaire et du cerveau<sup>338-339</sup>.

## La chimiokine CXCL12

Chez l'homme, il existe deux isoformes de la chimiokine CXCL12, CXCL12 $\alpha$  et CXCL12 $\beta$ , issues de l'épissage alternatif d'un même gène. La chimiokine CXCL12 exprimée par l'endothélium de la moelle osseuse, les fibroblastes et les ostéoblastes joue un rôle déterminant dans la migration cellulaire et dans le maintien des cellules souches hématopoïétiques CXCR4+ dans le microenvironnement de la moelle osseuse<sup>338, 340-342</sup>. CXCL12 est exprimée de façon physiologique par de nombreux organes tels que le poumon, le foie, le muscle squelettique, le cerveau, le rein, le cœur, la peau et la moelle osseuse<sup>343</sup>. Elle est également exprimée en cas de souffrance tissulaire hypoxique (infarctus du myocarde<sup>344-345</sup>, ischémie de membres<sup>346-347</sup>), toxique (hépatite médicamenteuse<sup>348</sup>, post-chimiothérapie<sup>349</sup>), hypovolémique (hémorragie abondante<sup>350</sup>) ou liée à l'irradiation. Il a été montré que le facteur HIF1 (*hypoxia-inducible factor*) surexprimé en cas de souffrance tissulaire (hypoxie, stress cellulaire ou lésion traumatique) activait l'expression de CXCL12 par les cellules endothéliales et favorisait donc par ce biais le recrutement des cellules souches de tissus différenciés CXCR4+ qui participent à la régénération<sup>351</sup>. L'expression de CXCL12 est également activée par le facteur de transcription NF- $\kappa$ B<sup>352</sup>. A l'inverse, l'expression de CXCL12 est diminuée par les corticoïdes<sup>353</sup> et le TGF $\beta$ 1<sup>354</sup>. Les corticoïdes exercent un double effet négatif en cas de souffrance tissulaire puisqu'ils diminuent à la fois le recrutement des cellules inflammatoires CXCR4+ et celui des cellules souches destinées à la régénération au niveau du site endommagé<sup>353-354</sup>.

## Le récepteur CXCR4

Le récepteur CXCR4 peut être considéré comme un marqueur de cellules souches puisqu'il est exprimé par les cellules souches embryonnaires pluripotentes, par les cellules souches de tissus différenciés<sup>339</sup> (neurales, musculaires lisses, myocardiques, endothéliales, hépatocytaires, d'épithélium pigmentaire de la rétine) ainsi que par des cellules germinales primordiales<sup>343</sup>. CXCR4 est également exprimé par les cellules souches hématopoïétiques CD34+, les lymphocytes T, les lymphocytes B, les monocytes, les macrophages, les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles et les cellules matures de nombreux organes. Comme CXCL12, en situation de souffrance tissulaire, CXCR4 est surexprimé dans les tissus.

Son expression est régulée par des facteurs de transcription de la famille des gènes PAX (*Paired-box*) impliqués dans l'organogénèse<sup>355-356</sup>. Le promoteur du gène codant pour CXCR4 comporte plusieurs sites de liaison pour les gènes PAX<sup>356-357</sup>. Neuf gènes PAX différents (1 à 9) ont été décrits. Il existe une spécificité d'expression des gènes PAX selon les tissus permettant d'assurer une migration adaptée des cellules souches selon leur devenir programmé au cours de l'organogénèse<sup>343</sup>. A noter que les gènes PAX sont exprimés de façon aberrante dans certaines tumeurs comme les rhabdomyosarcomes ou les cancers bronchiques à petites cellules qui expriment également fortement le CXCR4<sup>358</sup>. L'expression de CXCR4 est également régulée par des facteurs impliqués dans la souffrance tissulaire tels que le NF- $\kappa$ B<sup>352</sup>, le HIF1<sup>359</sup>, les glucocorticoïdes<sup>360</sup>, la lysophosphatidylcholine<sup>361</sup>, le TGF $\beta$ 1<sup>362</sup>, le VEGF<sup>363</sup>, l'IFN $\alpha$ <sup>364</sup> et les interleukines (IL2, IL4 et IL7)<sup>365-366</sup>.

## Mécanisme d'activation de la voie CXCL12-CXCR4

La fixation de la chimiokine CXCL12 sur son récepteur CXCR4 entraîne sa dimérisation et met en jeu une protéine G intracellulaire. À l'état inactif la protéine G constitue un hétérotrimère comportant trois sous-unités G $\alpha$ , G $\beta$  et G $\gamma$ . La sous-unité G $\alpha$  est liée à une molécule de GDP (*guanosine diphosphate*). L'activation de CXCR4 induit des modifications structurales qui favorisent son couplage à la protéine G. Il en résulte un échange du GDP par du GTP (*guanosine triphosphate*) qui conduit à la dissociation du complexe hétérotrimérique en G $\alpha$ -GTP et G $\beta\gamma$ . Les sous-unités dissociées activent alors différents effecteurs intracellulaires ou membranaires. CXCR4 est lié à la sous-unité G $\alpha$  et ses résidus tyrosines situés en région C-terminale sont phosphorylés, probablement du fait de l'activation et de sa liaison aux récepteurs des kinases JAK2 et JAK3<sup>367</sup>. La déphosphorylation du GTP en GDP de la sous-unité G $\alpha$  par la protéine RGS (*Regulator of G-protein signaling*) met fin au signal d'activation. Le complexe G $\alpha\beta\gamma$  se recompose, stabilisant alors la liaison du GDP au niveau de la sous-unité G $\alpha$ . Le complexe CXCL12-CXCR4 est rapidement internalisé par le biais d'un mécanisme impliquant une kinase spécifique des récepteurs couplés aux protéine G (GRK)<sup>368</sup> suivi de la liaison à la  $\beta$ -arrestine<sup>369</sup>. Le CXCR4 internalisé peut être à nouveau exprimé à la surface des cellules. En plus de mettre fin à l'activation de CXCR4, l'internalisation du récepteur est nécessaire à l'activation de plusieurs voies de signalisation impliquées dans le chimiotactisme et l'activation de la voie ERK<sup>370-371</sup>.

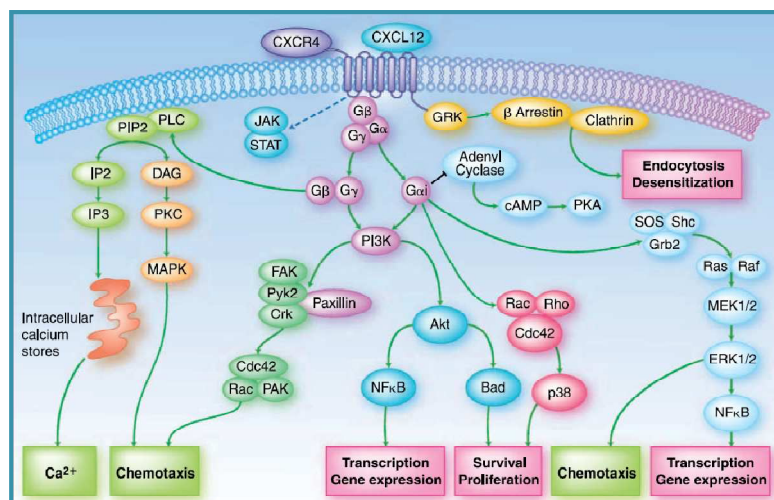
Les polynucléaires neutrophiles des malades porteurs du syndrome de Whim (maladie orpheline associant verrues, hypogammaglobulinémie, infections bactériennes récidivantes et rétention médullaire de neutrophiles mûres) présentent une altération de la réponse

chimiotactique à CXCL12 en rapport avec un défaut de désensibilisation du récepteur CXCR4. Dans cette maladie, CXCR4 est tronqué dans sa partie C-terminale ce qui empêche l'action de la GRK et donc son internalisation<sup>372</sup>.

On décrit 4 isoformes à la sous-unité  $G\alpha$  ( $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$  et  $G\alpha_{12}$ ) chacune induisant des signaux intracellulaires différents<sup>373-374</sup>. Il a longtemps été admis que le CXCR4 se liait uniquement à l'isoforme  $G\alpha_i$ , cependant des données récentes suggèrent que CXCR4 se lie également avec les autres isoformes de la sous-unité  $G\alpha$ <sup>368</sup>. La toxine pertussique inhibe la liaison du récepteur avec  $G\alpha_i$ .

## Effets biologiques de la voie CXCL12-CXCR4

La voie CXCL12-CXCR4 a fait l'objet de beaucoup de travaux de recherche expérimentale dans le cadre des systèmes hématopoïétique et lymphopoïétique. La liaison de CXCL12 à son récepteur induit divers signaux cellulaires tels que la motilité, le chimiotactisme, l'adhésion, la survie, la prolifération et la sécrétion de métalloprotéases matricielles, de facteurs pro-angiogéniques et de facteurs de transcription (**Figure 17**).



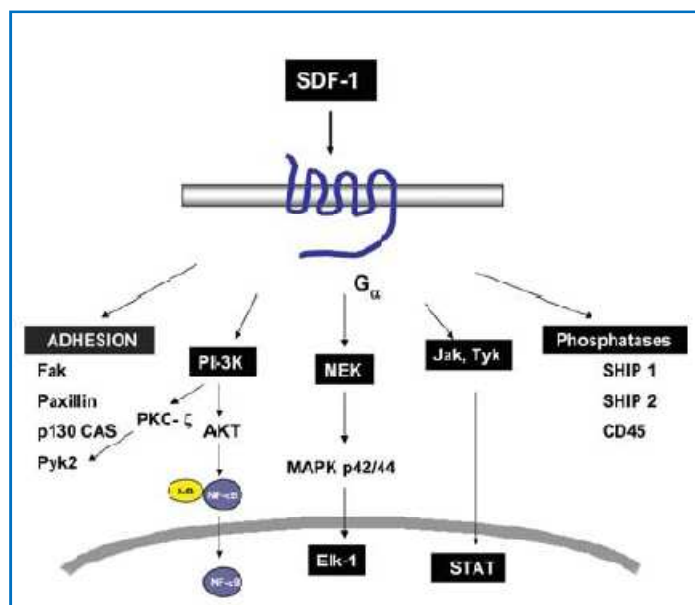
**Figure 17: Voie de signalisation CXCL12-CXCR4.**

*Teicher et al., Clin Cancer Res, 2010.*

Ces différents signaux sont médiés par l'activation des **canaux calciques**, de **molécules d'adhésion** riches en proline, de la PKC notamment la **PKCζ** qui aurait un rôle important dans le recrutement des cellules souches<sup>375</sup>, des facteurs de transcription **STAT**, des phosphatases **SHIP1**, **SHIP2** et **CD45**<sup>376</sup>, de la voie MAPK-ERK-ELK1 et de la voie PI3K-AKT-NFκB<sup>352, 367, 370, 377-379</sup> (**Figure 18**). L'interaction CXCL12-CXCR4 active également la voie de signalisation Ras, plusieurs kinases src telles



que Src, Lyn, Fyn, Lck, la molécule activatrice des lymphocytes T ZAP-70, vav<sup>380</sup> ainsi que des petites GTPases jouant un rôle fondamental dans la migration cellulaire<sup>381-384</sup>.



**Figure 18 : Voies de signalisation activées par l'interaction CXCL12-CXCR4.**

*Kucia et al., stem cells, 2005.*

L'**activation des canaux calciques** semble être induite par l'hétérodimère Gβγ qui active la phospholipase C, en particulier la PLCβ. Celle-ci qui catalyse la réaction d'hydrolyse du PIP<sub>2</sub> (*phosphatidyl inositol bisphosphate*) en IP<sub>3</sub> (*inositol-3-phosphate*) et DAG (*diacylglycérol*) ce qui provoque un influx calcique intracellulaire<sup>374</sup> et l'activation de nombreuses protéines kinases comme la PKC. L'activation d'intégrines à la surface des cellules favorise leur **adhésion** à diverses molécules comme la fibronectine, le fibrinogène, VCAM1 (molécule d'adhésion vasculaire) et ICAM1 (molécule d'adhésion intracellulaire)<sup>342, 355, 371, 385-386</sup>. Les kinases **JAK2**, **JAK3**<sup>370</sup> et **Tyk-2**<sup>387</sup> activent les facteurs de transcription **STAT** (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) par phosphorylation de leurs résidus tyrosine qui induit leur dimérisation et leur entrée dans le noyau. Ces derniers sont impliqués dans la régulation de différents processus cellulaires tels la croissance, la différenciation, la survie ou l'apoptose. L'activation des STAT ne semble pas concerner les cellules souches hématopoïétiques humaines CD34<sup>+</sup><sup>388</sup> ou de nombreuses lignées de cellules lympho-hématopoïétiques matures<sup>371</sup>.

Des expériences réalisées à partir de lignées de cellules embryonnaires humaines de rein ont montré que la coopération des deuxième et troisième domaines intracellulaires de CXCR4 et de sa région C-terminale était nécessaire à la **réponse chimiotactique** suggérant qu'elle implique plusieurs voies de signalisation complémentaires<sup>389</sup>. En effet, il a été montré que les deux voies métaboliques PI3K-AKT<sup>374, 390</sup> et MAPK-ERK étaient impliquées dans le chimiotactisme. L'activation de la PI3K

entraîne la phosphorylation de plusieurs molécules d'adhésion riches en proline comme la protéine tyrosine kinase PYK2, la p130CAS (Crk-associated substrate), FAK (*focal adhesion kinase*), la paxilline, Nck, Crk, et la Crk like protéine (Crk-L)<sup>367, 379</sup>. Le proto-oncogène Crk (ou c-Crk ou p38) appartient à la famille des protéines adaptatrices capables de se lier à des protéines phosphorylées sur des résidus tyrosine par l'intermédiaire de leurs domaines SH2 et SH3. La voie des MAPK-ERK intervient par le biais de la protéine kinase C (PKC) ou par le biais de la sous-unité Gαi qui active ERK<sup>374, 391</sup>. Les **phosphatases SHIP1 et SHIP2**, ainsi que la phosphatase membranaire hématopoïétique **CD45**, sont également impliquées dans le chimiotactisme<sup>392</sup>.

L'interaction CXCL12-CXCR4 joue par ailleurs un rôle important dans la **régénération cellulaire**. Dans des conditions de souffrance tissulaire telle que l'hypoxie, le stress cellulaire ou les lésions traumatiques, le facteur HIF1 (*hypoxia-inducible factor*) et le facteur de transcription NF-κB activent l'expression de la chimiokine CXCL12 par les cellules endothéliales et de son récepteur<sup>351-352</sup>. CXCL12 favorise ainsi la constitution d'un micro-environnement favorable à la régénération tissulaire en recrutant les cellules souches de tissus différenciés CXCR4+ au sein des tissus endommagés<sup>345-348, 393-396</sup>.

Le fait que CXCR4 soit exprimé par diverses cellules épithéliales malignes et plusieurs cancers hématologiques et que les mécanismes induits par l'interaction CXCL12-CXCR4 soient couramment impliqués dans la progression tumorale laisse supposer que cette voie puisse être impliquée dans la pathogénie du cancer en particulier dans la formation de métastases par le biais d'un mécanisme similaires à celui de la régénération tissulaire<sup>343</sup>. Par ailleurs, de la même façon que la souffrance tissulaire constitue un signal chimiotactique pour les cellules souches impliquées dans la régénération, l'inflammation chronique pourrait favoriser la formation de métastases des cellules souches cancéreuses<sup>343</sup>.

Aucune déficience de la voie CXCL12-CXCR4 n'a été décrite chez l'homme.

## Modulateurs de la voie CXCL12-CXCR4

CXCR4 est activé par des molécules impliquées dans l'inflammation et la souffrance cellulaire comme l'anaphylatoxine C3a (issue du complément), la <sup>des-Arg</sup>C3a (issue de la dégradation de C3a par la carboxypeptidase) et l'acide hyaluronique<sup>356, 385, 397</sup>; dans la coagulation comme le fibrinogène, le récepteur soluble de l'urokinase suPAR et la thrombine; ou dans l'activation cellulaire telles VCAM-1, ICAM-1 et le PMV (*Platelet-derived microvesicles*)<sup>383, 398</sup>.

A l'inverse, CXCR4 est inhibé dans les lymphocytes B et les lymphocytes T par MIP-1β ou RANTES, qui activent un autre récepteur de chimiokine couplé aux protéines G, le CXCR5<sup>399-400</sup>. Le

mécanisme de cette désensibilisation pourrait impliquer la protéine RGS. Toute anomalie de l'extrémité N-terminale et/ou du premier domaine extracellulaire de CXCR4 qui constituent le site de fixation de CXCL12 peut également inhiber l'activité du récepteur. Ainsi, l'hyposulfatation de sa région N-terminale<sup>401</sup> ou le clivage de CXCR4 par une protéase dérivée des leucocytes<sup>402</sup> inhibent la voie métabolique. La protéase dérivée des leucocytes sécrétée lors de phénomènes inflammatoires entraînant ainsi l'accumulation de monocytes et de lymphocytes sur le site inflammatoire.

Par ailleurs, des molécules comme certains antifongiques de la famille des polyènes (amphotéricine B, nystatine) peuvent inhiber la voie métabolique en perturbant la teneur lipidique de la membrane plasmique et donc l'incorporation du CXCR4<sup>383</sup>.

## **La théorie des cellules souches cancéreuses**

Plusieurs travaux suggèrent que les cellules cancéreuses pourraient se développer à partir de cellules souches de tissus différenciés. Ces dernières ont une longue durée de vie les exposant à l'accumulation d'erreurs génétiques favorisant leur transformation maligne<sup>403-405</sup>. Ce phénomène, initialement mis en évidence dans les leucémies<sup>406</sup>, a également été montré dans les tumeurs solides<sup>407-408</sup>. Selon cette théorie, les cellules souches cancéreuses existent à l'état quiescent ce qui peut expliquer la résistance tumorale relative aux agents cytostatiques qui ciblent les cellules en division. Par ailleurs, elles sont capables d'auto-renouvellement ce qui peut expliquer les récurrences tumorales après traitement.

Le CXCR4 est exprimé par les cellules souches normales des tissus différenciés ainsi que par les cellules souches cancéreuses qui en sont dérivées. On peut comprendre ainsi que la formation de métastases puisse être secondaire à l'attraction des cellules tumorales CXCR4+ par des organes exprimant fortement le CXCL12 comme les ganglions lymphatiques, les poumons, le foie ou les os selon un mécanisme similaire à celui observé dans la migration et le recrutement des cellules souches normales. Plusieurs travaux expérimentaux ont en effet montré que la formation de métastases osseuses dans le cancer du sein<sup>407</sup>, de l'ovaire<sup>409</sup> et de la prostate<sup>410</sup>, ainsi que dans le rhabdomyosarcome<sup>355</sup> et le neuroblastome<sup>411</sup> était secondaire au passage sanguin de cellules tumorales CXCR4+ sous l'influence du CXCL12.

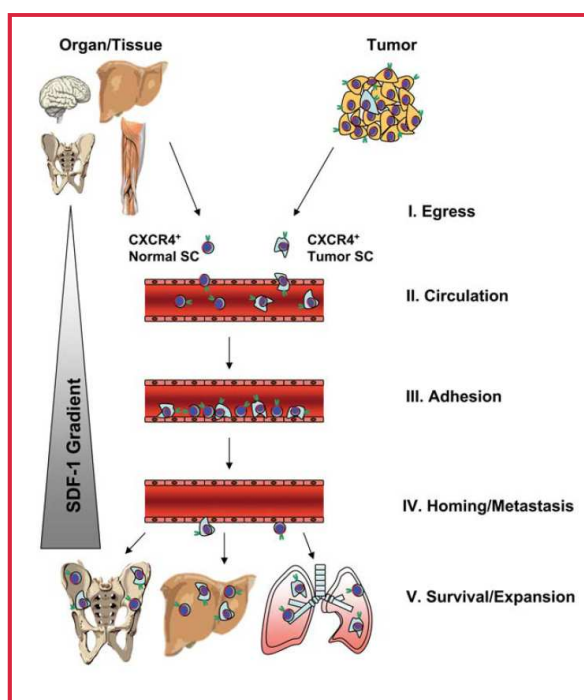
## **La théorie des cellules souches endométriales**

Même si de nombreuses études ont mis en évidence l'existence de cellules souches endométriales provenant de la moelle osseuse, des études récentes montrent également la présence de cellules souches différenciées dans l'endomètre humain<sup>412</sup>. Des cellules souches épithéliales,

endothéliales et mésenchymateuses contribuant à la régénération rapide de l'endomètre après les menstruations ont été décrites<sup>413</sup>. La présence de cellules souches mésenchymateuses dans l'endomètre ectopique de malades endométriosiques a par ailleurs été montrée<sup>414</sup>. Ainsi, les phénomènes impliqués dans le recrutement des cellules endométriales au niveau de sites endométriosiques ectopiques pourraient être comparables à ceux impliqués dans le recrutement des cellules souches de tissus différenciés pour la régénération tissulaire ou de cellules souches cancéreuses pour la formation de métastases.

## Modèle du recrutement cellulaire

La **mobilisation**, la **migration** et le **recrutement** des cellules souches différenciées est un processus qui s'effectue en plusieurs étapes<sup>341, 415</sup> (**Figure 19**). Les cellules souches doivent quitter leur niche pour les cellules normales et la tumeur primitive pour les cellules souches cancéreuses destinées à former des métastases puis emprunter la circulation sanguine ou lymphatique. Les cellules migrent selon un gradient chimiotactique spécifique qui les oriente vers l'organe correspondant ou vers le site métastatique. Arrivées à destination, les cellules se fixent à la paroi endothéliale des capillaires puis la franchissent grâce à la sécrétion de métalloprotéases matricielles (MMP) qui détruisent la matrice extra-cellulaire. Les cellules souches se greffent ainsi au niveau de leur nouveau site d'accueil et se développent dans un micro-environnement favorable.



**Figure 19. Rôle de l'interaction CXCL12-CXCR4 dans la migration des cellules souches normales et des cellules souches métastatiques.** Kucia et al., *Stem Cells*, 2005.

### Mobilisation et détachement des cellules souches

Le détachement des cellules souches du site initial a été décrit dans le système hématopoïétique. Deux hypothèses opposées ont été évoquées pour expliquer le détachement des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. La première suggère que la moelle osseuse sécrète des enzymes protéolytiques dégradant le CXCL12 et inactivant le CXCR4. En faveur de cette hypothèse, il a été montré que la diminution de la concentration endogène de CXCL12 dans la moelle osseuse après perfusion de G-CSF ou de cyclophosphamide pouvait provoquer la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques dans la circulation sanguine<sup>341, 416</sup>. La deuxième hypothèse évoque au contraire une stimulation de la moelle osseuse par du CXCL12 exogène<sup>415</sup> induisant la sécrétion de la métalloprotéase matricielle MMP-9 par les cellules souches hématopoïétiques. Ce mécanisme favoriserait le transfert des cellules souches hématopoïétiques de leur niche osseuse à une niche endothéliale<sup>341, 396</sup> les rendant ainsi disponibles pour un passage dans la circulation sanguine. L'activation de la migration des cellules hématopoïétiques par des petits analogues peptidiques de CXCL12 (CTCE0021)<sup>417</sup> est un argument en faveur de cette dernière hypothèse.

### Motilité cellulaire et chimiotactisme dirigé

Une fois dans la circulation sanguine, les cellules souches sont soumises à une chimioattraction qui les oriente vers une nouvelle niche tissulaire ou vers le lieu de métastase. CXCL12 constitue un facteur chimiotactique puissant pour les cellules souches normales et les cellules souches cancéreuses<sup>340, 342, 355, 418-420</sup>. Elle intervient également sur la motilité cellulaire par le biais de réarrangements conformationnels des protéines du cytosquelette. Il a été montré que le CXCL12 augmentait la distance et la vitesse de déplacement de certaines cellules cancéreuses cell<sup>355, 418</sup>. Ces phénomènes sont altérés par deux inhibiteurs de la PI3K, le LY-294002 et la wortmannine, ainsi que par la toxine de pertussique qui inhibe spécifiquement la signalisation médiée par Gαi<sup>355, 370, 421</sup>. Le rôle de la voie PI3K-AKT dans la motilité cellulaire est également suggéré par une étude qui a montré que des cellules murines porteuse de la mutation de PTEN, régulateur négatif de l'activation d'AKT, présentaient une augmentation de la phosphorylation d'AKT ainsi qu'une meilleure réponse chimiotactique à CXCL12<sup>422</sup>. La motilité cellulaire et le chimiotactisme médiés par CXCL12 impliqueraient également la voie MAPK-ERK et la voie des phosphatases<sup>376</sup>.

### Adhésion cellulaire

Une fois dans la circulation sanguine, les cellules souches adhèrent à l'endothélium des capillaires situés au niveau du site cible. Il a été montré que CXCL12 activait des molécules d'adhésion telles les intégrines LFA1 (*Lymphocyte function-associated antigen*), VLA4 (*very late activation antigen*) et VLA5 à la surface des cellules souches hématopoïétiques humaines CD34+

favorisant ainsi l'adhésion des cellules à la fibronectine, au fibrinogène, au stroma et aux cellules endothéliales<sup>342, 395, 423</sup>. Il existe une interaction spécifique entre le LFA1 et la molécule d'adhésion intracellulaire ICAM1 et entre le VLA4 et la molécule d'adhésion vasculaire VCAM1 qui est inhibée par la toxine pertussique et la cytochalasine D. Cela montre l'implication des protéines en aval de la signalisation médiée par Gai et l'exigence d'un cytosquelette intact<sup>342</sup>. De plus, il existe une activation mutuelle entre CXCR4 et les molécules d'adhésion puisque ces dernières favorisent l'expression et l'activité de CXCR4<sup>424</sup>.

Des mécanismes similaires ont été décrits dans l'adhésion des cellules tumorales<sup>383</sup>. Pour exemple, il a été montré que les cellules de cancer bronchique à petites cellules pouvaient adhérer au stroma dérivé de moelle osseuse en réponse à une stimulation par CXCL12 par l'intermédiaire de l'interaction VLA4-VCAM1<sup>425</sup>.

### Sécrétion cellulaire

Les cellules souches circulantes sécrètent de nombreuses molécules telles que des facteurs de croissance, des cytokines ou des enzymes protéolytiques leur permettant d'interagir avec l'environnement et d'intervenir dans la régulation autocrine-paracrine de leur réserve<sup>426-428</sup>. L'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B régule la sécrétion de ces molécules. Il a été montré que le CXCL12 stimulait la sécrétion de métalloprotéases matricielles (MMP-2 et MMP-9), d'oxyde nitrique et de facteurs proangiogéniques comme le VEGF par les cellules normales et les cellules cancéreuses<sup>371, 386, 398, 423</sup>. Ces facteurs sont impliqués dans la traversée de la barrière endothéliale, dans l'angiogénèse et dans le dialogue entre les cellules CXCR4+ et l'endothélium (VEGF, HGF).

CXCL12 joue par ailleurs un rôle important dans l'angiogénèse à la fois directement par chimioattraction des cellules endothéliales CXCR4+ et indirectement par le biais de la sécrétion de facteurs angiogéniques comme le VEGF<sup>429-430</sup> selon des mécanismes similaires à ce que l'on peut observer dans les tumeurs<sup>410, 418</sup>. Ainsi, en réponse à CXCL12, les cellules cancéreuses sécrètent des facteurs angiogéniques<sup>431</sup> et des métalloprotéinases<sup>432-433</sup>.

### Survie et prolifération cellulaire

Les cellules souches différenciées doivent survivre et se développer au niveau de leur site d'accueil. Le rôle des chimiokines dans la survie et la prolifération cellulaire est controversé. Il a été montré que le CXCL12 se comportait comme un facteur de survie autocrine pour les cellules mononucléaires de moelle osseuse par le biais de l'activation de la voie PI3K-AKT<sup>434</sup>. D'autres travaux, au contraire, ne montrent aucun impact de CXCL12 sur la survie et la prolifération cellulaire des cellules souches normales CD34+, des lignées cellulaires érythroblastiques, de mégacaryoblastes et de cellules myéloïdes<sup>371</sup> alors que dans plusieurs lignées cellulaires ainsi que dans les cellules

normales CD34+, CXCL12 induit la phosphorylation de ERK et de AKT connues pour être impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire.

Par ailleurs, il a été démontré que le CXCL12 stimulait la prolifération des astrocytes par le biais de l'activation de ERK<sup>435</sup>, des cellules de cancer de prostate<sup>410, 436</sup> et des cellules issues de gliomes et de glioblastomes avec un effet corrélé à l'activation prolongée de AKT et de ERK<sup>437</sup>.

Dans les lignées cellulaires où CXCL12 ne semble pas avoir d'impact direct sur la survie et la prolifération cellulaire un effet indirect médié par l'adhésion intercellulaire ou avec des facteurs de survie co-exprimés dans les tissus surexprimant CXCL12. Il a été montré que les signaux générés par l'adhésion cellulaire pouvaient prévenir la mort cellulaire par "anoïkis" (mort cellulaire initiée à la suite du détachement d'une cellule de la matrice extracellulaire)<sup>438</sup>. Enfin, il est possible que le CXCL12 augmente la prolifération cellulaire par le biais de la sécrétion d'autres facteurs de croissance autocrine.

## Interventions thérapeutiques

Les cibles thérapeutiques conduisant à bloquer la voie CXCL12-CXCR4 doivent intéresser l'interaction entre le ligand et son récepteur ou les voies d'aval. Un inhibiteur de CXCR4, le **plérixafort** ou BKT140 ou Mozobil®, et des anticorps anti-CXCR4 ou anti-CXCL12 ont été testés dans différents cancers<sup>439</sup>. Le plérixafort est une petite molécule avec deux noyaux cyclames reliés par un pont phénylène. Cette molécule est commercialisée en France depuis 2010 et est utilisée dans l'auto-greffe de moelle dans les lymphomes non-hodgkiniens et les myélomes multiples.

## **CHAPITRE II**

# **DEMARCHE EXPERIMENTALE**



## Démarche expérimentale

---

Seule l'exérèse chirurgicale des lésions d'endométriose permet un traitement curatif de la maladie. Dans le cas de l'endométriose profonde, en particulier en cas d'atteinte rectale, la chirurgie est extensive et associée à une morbidité significative. Elle est doit être réservée à des patientes très douloureuses ayant résisté ou échappé au traitement médical, ou réalisée dans le cadre d'une stratégie d'assistance à la procréation médicale. La population intéressée est en effet constituée de femmes jeunes porteuses d'une maladie bénigne. Les traitements médicaux utilisés reposent sur une hormonothérapie visant à bloquer la fonction ovarienne. Ils inhibent la production d'œstrogènes par l'ovaire, mais ne permettent pas de contrôler la production locale d'œstrogènes par l'aromatase au sein des lésions d'endométriose. Leur effet n'est que suspensif et souvent transitoire avec une récurrence de la symptomatologie douloureuse après 6 mois de traitement chez plus de la moitié des patientes. Par ailleurs, ces traitement présentent de nombreux effets secondaires souvent mal tolérés<sup>440-441</sup> et sont contraceptifs donc incompatibles avec une grossesse.

Il n'existe à ce jour aucun traitement médical ciblant les mécanismes à l'origine de la maladie endométriosique. Des études expérimentales ont récemment ouvert d'autres perspectives thérapeutiques que les traitements hormonaux classiques comme les anti-aromatases<sup>3-4</sup> et les anti-oxydants<sup>4</sup>. Ces voies de recherche sont encourageantes, mais il persiste des zones d'ombre physiopathologiques empêchant d'appréhender complètement les complexités biologiques et cliniques de cette maladie hétérogène. En effet, même s'il existe vraisemblablement des mécanismes métaboliques communs entre les différents types d'endométriose, l'endométriose profonde constitue une forme anatomo-clinique à part. L'objectif de notre travail était à la fois d'affiner nos connaissances en explorant différents mécanismes potentiellement impliqués dans le développement de la maladie et d'identifier des molécules capables d'intervenir sur ces mécanismes.

Notre démarche expérimentale a été articulée autour de deux concepts. Le premier repose sur l'hypothèse que la maladie endométriosique prend naissance dans l'endomètre eutopique, et le second repose sur le modèle physiopathologique du reflux tel que l'a décrit John A.Sampson dans les années 1920. Comme plusieurs travaux expérimentaux l'ont suggéré, nous avons considéré que le point de départ de la maladie était l'endomètre eutopique dans lequel des dérèglements métaboliques seraient initiés. Au cours du reflux menstruel, les cellules endométriales modifiées dispersées dans la cavité péritonéale ne seraient pas éliminées par le système immunitaire local<sup>1, 76-77</sup>. Il en résulterait une inflammation chronique locale responsable d'une production accrue de

cytokines<sup>66, 68, 70</sup>, de prostaglandines<sup>73</sup>, de facteurs de croissance et de facteurs pro-angiogéniques favorisant eux-mêmes le développement de l'endométriose selon une autorégulation positive<sup>50</sup>. De manière concomitante, les anomalies métaboliques initiales seraient amplifiées et aboutiraient à des signaux de prolifération<sup>4, 64</sup>, de survie cellulaire<sup>5, 54</sup> et de néoangiogénèse<sup>62-63</sup>. Les implants endométriosiques ainsi constitués évolueraient pour leur propre compte et auto-entretiendraient leur développement. L'ensemble de ces anomalies résulterait en partie d'une dérégulation hormonale au sein des lésions endométriosiques<sup>5</sup>. Sous l'influence d'un micro-environnement inflammatoire propice, les modifications des cellules endométriales conduiraient à favoriser leur recrutement, leur adhésion et leur implantation à la surface du péritoine. Il a été montré que les cellules endométriosiques surexprimaient des enzymes protéolytiques<sup>55</sup> créant des zones d'adhérence au péritoine favorables à l'implantation des cellules<sup>56-59</sup>, ainsi que des molécules d'adhésion<sup>60-61</sup>. Plusieurs travaux ont montré des similitudes de comportement entre les cellules endométriosiques et les cellules cancéreuses. Les cellules endométriosiques présentent en effet une capacité de dissémination en s'implantant au niveau de sites ectopiques variés (ganglionnaires et à distance du pelvis), d'invasion en infiltrant l'espace sous-péritonéal et la paroi des organes, de prolifération et de néoangiogénèse<sup>108</sup>. Certains mécanismes à l'origine de l'endométriose seraient communs à ceux impliqués dans le développement du cancer.

Il existe à ce jour peu de travaux portant sur les caractéristiques cellulaires spécifiques des lésions d'endométriose profonde. Dans un premier temps nous avons voulu mettre en évidence le phénotype hyperprolifératif des cellules endométriosiques profondes à l'image du phénotype hyperprolifératif des cellules endométriosiques de kystes ovariens<sup>4</sup>. Un travail réalisé dans l'équipe montrait que l'augmentation de la prolifération des cellules endométriosiques de kystes ovariens était liée à une activation de la voie ERK par le biais du stress oxydant<sup>4</sup>. Par analogie, nous avons testé ces deux voies métaboliques dans l'endométriose profonde. En outre, plusieurs études ont suggéré que le stress oxydant était impliqué dans la pathogénie de l'endométriose. De même, il a été montré que la voie des MAPKinases jouait probablement un rôle clef dans le développement de la maladie<sup>442</sup>. Puis par analogie avec le cancer, nous nous sommes intéressés à la voie AKT. Le rôle d'AKT dans l'endométriose a été suggéré par plusieurs constatations. La mutation du gène P3KCA responsable de l'activation constitutive d'AKT est la mutation la plus fréquemment rencontrée dans les carcinomes ovariens à cellules claires<sup>443</sup> associés à l'endométriose<sup>108-109</sup>. Une activation d'AKT dans les cellules épithéliales d'endométrioses ovariens<sup>444</sup>, probablement en rapport avec l'hyperœstrogénie locale<sup>445</sup>, a été rapportée. Par ailleurs, il a été montré que le défaut d'un antagoniste spécifique du récepteur à l'œstradiol dans les cellules stromales de l'endomètre eutopique engendrait une activation d'AKT<sup>446</sup>.

Nous avons travaillé à partir de prélèvements humains réalisés au cours d'interventions chirurgicales. L'endomètre témoin et le liquide péritonéal témoin étaient prélevés chez des femmes au cours d'interventions permettant d'affirmer l'absence d'endométriose. L'endomètre eutopique, l'endomètre ectopique et le liquide péritonéal de femmes endométriosiques étaient prélevés au cours de la chirurgie d'endométriose profonde avec atteinte rectale. Ces prélèvements ont été utilisés pour des études cellulaires, histologiques, immunohistochimiques mais également comme greffe tissulaire dans un modèle murin d'endométriose.

Nos travaux nous ont permis de confirmer le phénotype hyperprolifératif des cellules endométriosiques avec une prolifération cellulaire accrue au sein de l'endomètre eutopique ainsi qu'au niveau du nodule endométriosique profond. Nous avons montré que ce phénotype hyperprolifératif était en rapport avec une activation de la voie ERK médiée par une augmentation du stress oxydant endogène ainsi qu'avec une activation de la voie AKT. L'activation de ces deux voies métaboliques était aussi bien observée au sein de l'endomètre eutopique qu'au niveau du nodule endométriosique profond mais de façon amplifiée. Ces données nous ont permis d'identifier des molécules agissant sur chacune de ces voies susceptibles de contrôler la prolifération des cellules endométriosiques. Nous avons montré qu'une molécule anti-oxydante, la N-acétylcystéine (NAC), des inhibiteurs de protéine kinase en particulier le métabolite actif du léflunomide (A771726), et un inhibiteur de mTOR (temsirolimus), étaient capables de contrôler la prolifération des cellules endométriosiques. Le léflunomide, et le temsirolimus, étaient également capables de contrôler la progression de nodules endométriosiques profonds implantés dans des souris Nudes. Nous avons également testé un anti-métabolite, le 5-FU, couramment utilisé en cancérologie digestive. Celui-ci permettait aussi de contrôler la prolifération des cellules endométriosiques profondes ainsi que le développement de kystes endométriosiques implantés dans des souris Nudes.

Le léflunomide, le temsirolimus et le 5-FU sont utilisés en pratique clinique. Le léflunomide est utilisé dans le traitement de fond de la polyarthrite rhumatoïde. Le temsirolimus, le sorafenib et le 5-FU sont des chimiothérapies utilisées en cancérologie. L'efficacité de ces traitements confirme les points communs entre la maladie endométriosique et le cancer. Cependant, leur toxicité nous a conduits à tester une molécule potentiellement plus adaptée pour une maladie bénigne. Nous avons choisi un agoniste des cannabinoïdes (WIN 55212-2) connu pour ses propriétés antiprolifératives, antifibrosantes et antalgiques donc particulièrement intéressant dans l'endométriose profonde qui réunit ces trois caractéristiques. Nos travaux permettent de confirmer son action antiproliférative *in vitro* et *in vivo* par le biais de l'inhibiteur de la voie AKT ainsi que son action antifibrosante.

Ayant la confirmation que les cellules endométriosiques profondes ont un profil phénotypique modifié en rapport avec l'activation de certaines voies métaboliques, nous avons

cherché à explorer un autre aspect physiopathologique de la maladie, celui du recrutement des cellules endométriales au sein de la cavité péritonéale. Pour ce, nous avons étudié le couple CXCR4-CXCL12 connu pour être impliqué dans le recrutement des cellules tumorales<sup>447</sup>. Le récepteur de la chimiokine, CXCR4, est exprimé dans l'endomètre de femmes saines<sup>448</sup> et surexprimé dans les lésions endométriosiques<sup>449</sup>. La surexpression de CXCR4 par les cellules endométriosiques pourrait être en rapport avec une activation de ERK<sup>450</sup>. Nous avons montré une attraction spécifique des cellules endométriosiques profondes surexprimant le CXCR4 par le CXCL12 présent en quantité accrue dans le liquide péritonéal des femmes endométriosiques.

L'ensemble de ces travaux permettent d'avancer dans la connaissance physiopathologique de la maladie et ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le traitement de l'endométriose. Le léflunomide et le temsirolimus mériteraient d'être testées dans le cadre d'essais cliniques chez des patientes sans désir de grossesse pour lesquelles seule une chirurgie mutilante permettrait de contrôler la symptomatologie douloureuse.

## Matériel et méthode

---

### Prélèvement des tissus humains

Des biopsies d'endomètre eutopique et de lésion d'endométriose profonde ainsi que le prélèvement de liquide péritonéal ont été obtenues au décours du traitement chirurgical de patientes porteuses d'une endométriose profonde avec atteinte rectale (**LRE**, *Low Rectal Endometriosis*). La LRE était définie en pré-opératoire par une endométriose infiltrant la musculature du rectum sous-péritonéal<sup>142</sup>. La présence d'une endométriose profonde était systématiquement confirmée par un pathologiste expérimenté dans cette pathologie (Docteur S Arkwright). Toutes les patientes avaient été traitées avant l'intervention par des agonistes de la LHRH (*Luteinizing-Hormone Releasing Hormone*) pour une durée minimale de 1 mois. Des biopsies d'endomètre témoin et le prélèvement de liquide péritonéal témoin ont été obtenues chez des femmes au décours de coéloscopies réalisées pour diverses raisons (bilan d'infertilité, un kyste ovarien non endométriosique, un myome...) permettant d'affirmer l'absence de lésions macroscopiques d'endométriose. L'autorisation de ces prélèvements a été obtenue par toutes les femmes qui ont signé un consentement éclairé et l'étude a reçu un avis favorable auprès du comité éthique de l'hôpital Cochin de Paris (référence dossier : avis sur collection cellules, tissus, organes n°05-2006, pour un projet scientifique intitulé : Génomique et protéomique de l'endométriose).

Les biopsies ont été réalisées en milieu stérile et immédiatement déposées dans du milieu de culture DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplémenté de 10% de SVF (sérum de veau fœtal), d'Hepes à 100µM, de pyruvate à 20mM et d'antibiotiques (pénicilline 100 UI/mL, streptomycine 100µg/mL et ciprofloxacine 20µg/mL) (milieu DMEM complet) puis acheminées au laboratoire. Aucune hormone stéroïdienne n'a été ajoutée au milieu de culture. Les taux d'œstrogènes (e<sub>2</sub>) et de progestérone (p<sub>4</sub>) étaient indétectables dans le milieu de culture cellulaire par immunodiagnostic (Advia Centaur XP Immunoassay System, Siemens Healthcare Diagnostics, Saint-Denis, France). L'absence d'hormone stéroïdienne dans le milieu de culture cellulaire permettait de garantir des conditions analogues à celle des patientes traitées par agonistes de la LHRH. Le délai entre le prélèvement de tissus humains et le début de la procédure d'isolement des cellules n'a jamais excédé une heure. La composition du milieu de culture a été identique tout au long de l'étude. Le liquide péritonéal a été congelé à -20°C dès prélèvement.

## Extraction cellulaire et culture

Des cultures primaires d'endomètre sain, d'endomètre eutopique et de lésions endométriosiques profondes ont été préparées à partir des biopsies chirurgicales. Les biopsies ont été lavées au PBS (tampon phosphate), découpées au bistouri froid en petits fragments et digérées dans un mélange de collagénase (2mg/mL, Gibco Invitrogen, Cergy pontoise, France) et dispase à 5‰ pendant 90 minutes à 37°C. En cas de biopsies hémorragiques, les globules rouges ont été lysés par du milieu hypotonique (NH<sub>4</sub>Cl 0.15mol/L, KHCO<sub>3</sub> 1mmol/L, Na<sub>2</sub>EDTA 0.1mol/L). Les cellules ont été filtrées sur un premier tamis de 100µm afin d'éliminer les fragments non digérés. Les **cellules stromales** ont été séparées des **cellules épithéliales** par filtration sur un deuxième tamis de 40 µm<sup>66</sup>. Les cellules épithéliales ont été retenues par le tamis tandis que les cellules stromales ont été emportées dans le filtrat. Les deux populations cellulaires obtenues ont été ensemencées dans des boîtes de culture Primaria® de 75cm<sup>2</sup> (Becton Dickinson Labware, Le Pont de Claix, France) dans du milieu de culture DMEM complet, et cultivées jusqu'à confluence.

Pour chaque patiente porteuse d'endométriose profonde, nous avons obtenu 4 populations cellulaires : cellules stromales d'endomètre eutopique (**Es**), cellules épithéliales d'endomètre eutopique (**Ee**), cellules stromales endométriosiques profondes (**Ds**), cellules épithéliales endométriosiques profondes (**De**). Pour chaque témoin, nous avons obtenu 2 populations cellulaires : cellules stromales d'endomètre témoin (**Cs**) et cellules épithéliales d'endomètre témoin (**Ce**).

La qualité de la purification cellulaire a été contrôlée par immunofluorescence directe à l'aide d'un double marquage par des anticorps spécifiques, l'anticorps anti-cytokératine couplé à la FITC (*Fluorescein isothiocyanate*) (1/100<sup>ème</sup>) et l'anticorps anti-vimentine couplé au Cy3 (*Cyanine 3*) (1/100<sup>ème</sup>)(Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA)<sup>66</sup>. La fluorescence a été analysée grâce à un microscope fluorescent Olympus (Hambourg, Germany) et les images ont été capturées par le logiciel Cell Imaging Station (Olympus). Les cellules épithéliales d'endomètre eutopique **Ee** et les cellules épithéliales d'endométriose profonde **De** présentaient un marquage positif à la cytokératine et un marquage négatif à la vimentine, tandis que les cellules stromales d'endomètre eutopique **Es** et les cellules stromales d'endométriose profonde **Ds** présentaient un marquage positif à la vimentine et un marquage négatif à la cytokératine.

Toutes les expériences ont été réalisées sur une culture primaire de chaque population cellulaire et les différentes analyses ont été réalisées en triple.

## Etude de la prolifération et de la viabilité cellulaire

Les cellules à confluence, ont été récoltées après traitement par la trypsine. Elles ont été comptées par la méthode du Bleu Trypan,ensemencées dans des plaques de culture 96 puits (Nunc, Roskilde, Danemark) à la concentration de  $10^4$  cellules par puits et cultivées dans du milieu DMEM complet. Les cellules ont été incubées 48 heures dans du milieu DMEM complet seul ou avec

- une concentration de 6,4 mmol/L de NAC (*N-acetyl-L-Cystéine*),
- une concentration de 200 $\mu$ mol/L d'un inhibiteur de ERK, le métabolite actif du léflunomide (A77-1726),
- 0,3 à 24 $\mu$ mol/L d'un inhibiteur de mTOR, le temsirolimus,
- 0,3 à 40  $\mu$ mol/L d'un agonistes des cannabinoïdes (WIN 55212-2)

à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>.

La prolifération cellulaire été évaluée par incorporation de thymidine tritiée (1 $\mu$ Ci/puits, Amersham, GE Healthcare) pendant les 18 dernières heures<sup>170</sup>. Les résultats ont été exprimés en coups par minute (cpm).

L'apoptose a été mesurée par la coloration de Hoechst 33342 (Molecular Probes) et la viabilité cellulaire a été appréciée sur l'intégrité membranaire grâce au cristal violet. Pour le Hoechst, les cellules on été incubées dans 100 $\mu$ l de PBS contenant 1 $\mu$ g/ml de Hoechst 33342 pendant 30 minutes. L'intensité de la fluorescence a été mesurée par spectrofluorométrie à 350 nm pour l'excitation et 461 nm pour l'émission. Pour le cristal violet, les cellules ont été incubées dans une solution de 0,5% de cristal violet mélangée à 30% d'éthanol pendant 30 min à température ambiante. Après deux lavages au PBS, les cellules colorées étaient resuspendues dans 100% de méthanol et l'absorbance était mesurée par colorimétrie à 540 nm.

Les études de prolifération cellulaire et de viabilité ont été réalisées sur toutes les populations cellulaires.

## Étude de la production des formes réactives de l'oxygène

Les cellules à confluence ont été récoltées après traitement par la trypsine. Elles ont été comptées par la méthode du Bleu Trypan,ensemencées dans des plaques de culture 96 puits (Nunc, Roskilde, Danemark) à la concentration de  $10^4$  cellules par puits et incubées dans du milieu DMEM complet à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> pendant 18 heures. La production des FRO (anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>-•</sup>, peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et oxyde nitrique NO) par les cellules seules, puis par les cellules traitées par de la **NAC** à 6.4 mmol/L et par les cellules traitées par des concentrations croissantes (0.3 à 40 $\mu$ mol/L) d'un **agoniste des cannabinoïdes** (WIN 55212-2) a été évaluée par spectrofluorimétrie

(Fusion, Packard Instrument Company, Meriden, Connecticut) à l'aide de fluorochromes spécifiques : le **DHE** (*Dihydroéthidium*) à 125µM (Interchim, Montluçon, France) pour l'anion superoxyde, le **H<sub>2</sub>DCFDA** (*Diacétate de 2'-7'-dichlorodihydrofluoroscéine*) à 100µM (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) pour le peroxyde d'hydrogène, et le **DAF<sub>2</sub>DA** (*Diacétate de 4,5 diaminofluoroscéine*) à 100µM (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) pour l'oxyde nitrique<sup>130</sup>. La production de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de NO a été mesurée pendant 5 heures. La production des FRO a été calculée comme suit : (intensité de la fluorescence après 5h d'incubation – intensité de la fluorescence à T0) / 300 min / nombre de cellules<sup>170</sup>.

## Évaluation de l'expression des récepteurs aux cannabinoïdes

La présence des récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2 a été étudiée sur les lysats des cellules stromales et épithéliales d'endomètre eutopique, de lésion endométriosique profonde et d'endomètre témoin. Elle a été évaluée par western blot sur lysats cellulaires. Les cellules ont été récoltées après traitement à la trypsine et centrifugées. Le culot cellulaire a été repris dans du tampon RIPA (TrisHCl 10 mM, pH 7.5, NaCl 5M, Triton-X100 1%, SDS 0.1%) auquel a été ajouté extemporanément 25mM de sodium fluoride, un cocktail d'antiprotéase à 1%, et 0.5mM d'orthovanadate de sodium activé. Le culot cellulaire a été congelé à -20°C. Après décongélation et centrifugation, les dosages protéiques ont été réalisés sur le surnageant par la méthode colorimétrique au Coomassie. Trente µg de protéines pour chaque échantillon ont été séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 10% en milieu dénaturant (SDS-PAGE) puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. La membrane a été saturée par du lait écrémé à 5% pendant 1h, puis incubée avec l'anticorps anti-CB1 (1/200<sup>ème</sup>, 1µg /ml) ou l'anticorps anti-CB2 (1/200<sup>ème</sup>, 1µg /ml) (Interchim, Montluçon, France) issus de lapin pendant une nuit à 4°C. Après lavages, la membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin conjugué à HRP (1/1000<sup>ème</sup>) pendant 1h à température ambiante. L'expression de CB1 et de CB2 a été ensuite révélée à l'aide de la trousse ECL (Enhanced Chemo-Luminescence, Pierce Perbio Sciences, Brebières, France)<sup>451</sup>.

## Evaluation de l'implication de la voie ERK et de la voie AKT

L'expression de la protéine ERK et de sa forme activée (phosphorylée) pERK, et de la protéine AKT et de sa forme activée (phosphorylée) pAKT, ont été étudiées par western blot et par immuno-histochimie.



### Western blot

Les westerns blot ont été réalisés sur les lysats des cellules stromales et épithéliales d'endomètre eutopique, de lésion endométriosique profonde et d'endomètre témoin et sur les lysats de cellules stromales d'endomètre eutopique et de lésions endométriosiques profondes préalablement incubées à 37° pendant 12 heures avec du WIN 55212-2 à 20µM.

Les cellules arrivées à confluence ont été récoltées après traitement par la trypsine et centrifugées. Le culot cellulaire a été repris dans du tampon RIPA (TrisHCl 10 mM, pH 7.5, NaCl 5M, Triton-X100 1%, SDS 0.1%) auquel a été ajouté extemporanément 25mM de sodium fluoride, un cocktail d'antiprotéase à 1%, et 0.5mM d'orthovanadate de sodium activé. Le culot cellulaire a été congelé à -20°C. Après décongélation et centrifugation, les dosages protéiques ont été réalisés sur le surnageant par la méthode colorimétrique au Coomassie. Trente µg de protéines pour chaque échantillon ont été séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 10% en milieu dénaturant (SDS-PAGE) puis transférés sur une membrane de nitrocellulose.

**Pour l'évaluation de ERK**, la membrane a été saturée par du lait écrémé à 5% pendant une heure à température ambiante, puis incubée avec l'anticorps anti-ERK (1/200<sup>ème</sup>, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California) ou l'anticorps anti-pERK (1/200<sup>ème</sup>, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California) issus de lapins pendant une nuit à 4°C.

**Pour l'évaluation d'AKT**, la membrane a été saturé par du TBSA (BSA à 5% dans du TBS 0.1% Tween-20) pendant une nuit à 4°C puis incubée avec l'anticorps anti-AKT (1/1000<sup>ème</sup>, Cell signaling Technology) ou l'anticorps anti-pAKT (1/1000<sup>ème</sup>, Cell signaling Technology) issus de lapins pendant 1 heure. Pour phospho-p70S6k (sérine371/thréonine 389), la membrane a été saturée par du TBSA une heure à température ambiante et puis incubée avec l'anticorps anti-phospho-p70S6k (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) issu de lapin pendant une nuit à 4°C.

Après lavages, la membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin conjugué à HRP (*horseradish peroxydase*) (1/1000<sup>ème</sup>) pendant 1h à température ambiante. Un contrôle protéique a été réalisé par incubation des membranes avec l'anticorps anti-β-actine issu de souris (1/50000<sup>ème</sup>, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA). L'expression de ERK, pERK, AKT, pAKT, phospho-p70S6k et de la β-actine ont ensuite été révélées à l'aide de la trousse ECL (Enhanced Chemo-Luminescence, Pierce Perbio Sciences, Brebières, France)<sup>451</sup>.

### Immunohistochimie

Les lames histologiques de 4 mm d'épaisseur préparées à partir de nodules endométriosiques profonds ont été déparaffinées. Le démasquage des antigènes a été réalisé en incubant les lames dans un tampon de citrate à 10 mmol/L (pH 6.0) deux fois pendant 10 minutes

dans un bain marie à 95°C. Les lames ont été incubées à 20 % (v/v) avec un sérum de chèvre dans du PBS avec 4 % (w/v) de sérum d'albumine bovin pendant 30 minutes à température ambiante. Les lames ont ensuite été incubées avec l'anticorps primaire phospho-p44/42 MAP kinase (clone 20G11, 1/100<sup>ème</sup>; Cell Signaling technology) ou avec l'anticorps primaire phospho-AKT (clone 736E11, dilué 1/25<sup>ème</sup>; cell signaling technology) pendant toute la nuit à 4°C. L'anticorps secondaire a été détecté grâce au kit 3,3'diaminobenzidine peroxidase substrate (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Le marquage a été considéré positif lorsque la coloration du noyau et/ou du cytoplasme était franche.

## Evaluation de l'expression de CXCR4

L'expression du récepteur CXCR4 a été étudiée par western blot et par cytométrie de flux.

### Western blot

Les westerns blot ont été réalisés sur les lysats des cellules stromales d'endomètre eutopique, de lésion endométriosique profonde et d'endomètre témoin. Les cellules arrivées à confluence ont été récoltées après traitement par la trypsine et centrifugées. Le culot cellulaire a été repris dans du tampon RIPA (TrisHCl 10 mM, pH 7.5, NaCl 5M, Triton-X100 1%, SDS 0.1%) auquel a été ajouté extemporanément 25mM de sodium fluoride, un cocktail d'antiprotéase à 1%, et 0.5mM d'orthovanadate de sodium activé. Le culot cellulaire a été congelé à -20°C. Après décongélation et centrifugation, les dosages protéiques ont été réalisés sur le surnageant par la méthode colorimétrique au Coomassie. Quarante µg de protéines pour chaque échantillon ont été séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 10% en milieu dénaturant (SDS-PAGE) puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. La membrane a été saturée avec du lait écrémé à 5 % pendant une heure à température ambiante. L'anticorps anti-CXCR4 issu de lapin (1/2000<sup>ème</sup>, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Californie) a été incubé pendant une nuit à 4°C. Après lavages, la membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin conjugué à HRP (1/1000<sup>ème</sup>) pendant une heure à température ambiante. Un contrôle protéique a été réalisé par incubation des membranes avec l'anticorps anti-β-actine issu de souris (1/50000<sup>ème</sup>, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA). L'expression de CXCR4 et de la β-actine ont ensuite été révélées à l'aide de la trousse ECL (Enhanced Chemo-Luminescence, Pierce Perbio Sciences, Brebières, France).

### Cytométrie de flux

Les cellules à confluence ont été lavées une fois avec du PBS puis décollées avec de la dispase à 5%. Une fois récoltées, elles ont été lavées avec un tampon de lavage constitué de PBS supplémenté de 1 % de SVF et de 1 % d'antibiotiques (pénicilline 100 UI/mL, streptomycine 100µg/mL) puis resuspendues à la concentration de 10<sup>6</sup> cellules/100µl dans le tampon de lavage. Les

cellules ont ensuite été incubées pendant 45 minutes à 4°C dans l'obscurité avec un anticorps anti-CXCR4 de type IgG1 issu de souris couplé à un marqueur fluorescent, l'APC (*allophycocyanine*) (BD biosciences, San Diego). Un anticorps isotype de type IgG1 issu de souris couplé à APC a été utilisé comme contrôle négatif (BD biosciences, San Diego). Les cellules marquées ont ensuite été lavées avec le tampon de lavage, puis fixées dans 300 µl de PBS contenant du paraformaldéhyde à 1 %. Elles ont été détectées par le cytomètre de flux BD FACSCANTO II (BD biosciences, San Diego). Les résultats ont été analysés par le logiciel flow jo.

### **Evaluation de la migration des cellules d'endomètre eutopique**

Des plaques de 6 puits de culture cellulaire Transwell® (8 µM, BD biocoat matrigel chambre d'invasion - référence : 354481-Becton Dickinson, Bedford, USA) ont été utilisées pour évaluer la capacité de migration des cellules stromales d'endomètre eutopique. Les cellules stromales ont étéensemencés à une concentration de  $2 \times 10^5$  dans des inserts de matrigel avec du milieu de culture DMEM enrichi de 10 % de SVF. Le puits contenait du milieu de culture DMEM enrichi de 5% de BSA (chimioattractant) ainsi que la protéine recombinante CXCL12 (200ng/mL) (R&D des systèmes, Abingdon, le Royaume-Uni). Pour le contrôle négatif, le puits ne contenait pas de CXCL12. Après une incubation de 22 heures à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>, les cellules qui n'avaient pas migré vers la surface inférieure de l'insert ont été éliminées à l'aide d'un coton-tige. Les cellules adhérentes à la membrane ont été fixées avec du méthanol pendant 2 minutes, puis marquées avec du bleu de toluidine à 1 % pendant 2 minutes et lavées 3 fois avec du PBS. Elles ont été visualisées à l'aide d'un microscope électronique (Zeiss Observer 21). Les images ont été capturées par le logiciel Image J.

### **Evaluation de la concentration de CXCL12 et de IL6 dans le liquide péritonéal par ELISA**

Le liquide péritonéal conservé -20°C a été décongelé. La quantification de CXCL12 a été effectuée directement sur le liquide péritonéal grâce au kit ELISA CXCL12 (R&D des systèmes, Abingdon, le Royaume-Uni). La quantification de IL6 a été effectuée directement sur le liquide péritonéal grâce au kit ELISA IL6 (R&D des systèmes, Abingdon, le Royaume-Uni).

### **Evaluation de l'expression de αSMA par Western Blot**

Les westerns blot ont été réalisés sur les lysats des cellules stromales et épithéliales d'endomètre eutopique, de lésion endométriosique profonde et d'endomètre témoin et sur les lysats

de cellules stromales d'endomètre eutopique et de lésions endométriosiques profondes préalablement incubées à 37° pendant 12 heures avec du WIN 55212-2 à 20µM.

Les cellules arrivées à confluence ont été récoltées après traitement par la trypsine et centrifugées. Le culot cellulaire a été repris dans du tampon RIPA (TrisHCl 10 mM, pH 7.5, NaCl 5M, Triton-X100 1%, SDS 0.1%) auquel a été ajouté extemporanément 25mM de sodium fluoride, un cocktail d'antiprotéase à 1%, et 0.5mM d'orthovanadate de sodium activé. Le culot cellulaire a été congelé à -20°C. Après décongélation et centrifugation, les dosages protéiques ont été réalisés sur le surnageant par la méthode colorimétrique au Coomassie. Trente µg de protéines pour chaque échantillon ont été séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 10% en milieu dénaturant (SDS-PAGE) puis transférés sur une membrane de nitrocellulose.

La membrane a été saturée par du lait écrémé à 5% pendant une heure à température ambiante, puis incubée avec l'anticorps anti-αSMA issus de souris (Sigma Aldrich, St Louis, MO) pendant une nuit à 4°C.

## Modèle animal

Le modèle animal a été réalisé sur des souris immuno-déficientes nues (nu/nu) (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France). Toutes les souris étaient femelles âgées de 6 à 8 semaines. Elles avaient accès libre à l'eau et la nourriture et étaient maintenues dans un environnement stérile. Les expériences ont été conduites en accord avec la réglementation ministérielle. Pour toutes les procédures chirurgicales, les souris ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale de 400µl de tribromoethanol (Avertine®).

Les biopsies d'endométriose profonde rectale, prélevées sur pièce opératoire, ont immédiatement été placées dans du milieu DMEM complet enrichi en Fortum (1% d'une solution à 3mg/ml) et transférées au laboratoire. Elles ont été préparées sous hotte, en milieu stérile. Les fragments de biopsie d'endométriose profonde rectale humaine ont été mesurés (largeur et longueur) et pesés. L'un deux a été inclus en paraffine pour examen histologique. Une mini-laparotomie médiane sous-ombilicale a été réalisée à J0. Deux fragments ont été cousus au péritoine pariétal de la paroi abdominale antérieure de la souris par un point de prolène 6.0. Une injection sous-cutanée de 0.5µg de β-œstradiol a été réalisée à J1 et J2 afin de faciliter l'implantation du fragment d'endométriose. A J7, une laparotomie exploratrice a été réalisée afin de vérifier la viabilité des implants. **Le groupe traité** a reçu du WIN-55212-2 à la dose de 3 mg/kg dans 100µl, 5 jours sur 7 pendant 15 jours par voie intra-péritonéale. **Le groupe témoin** a reçu 100µL de PBS en intra-péritonéal au même rythme. A l'issue des deux semaines de traitement, les souris ont été sacrifiées

par élongation et les implants endométriosiques ont été prélevés et inclus en paraffine pour examen histologique. Les lames ont été colorées à l'hématoxyline-éosine.

### Analyse statistique

Toutes les valeurs des expériences réalisées *in vitro* sont la moyenne d'expériences indépendantes réalisées en triple pour chaque population cellulaire de chaque malade. Les statistiques ont été analysées à l'aide du logiciel Excel. Les moyennes ont été comparées par un test de Student. Une valeur de  $p < 0.05$  est considérée comme significative.

**Article 1** Le temsirolimus diminue les lésions d'endométriose profonde chez la souris

---

The American Journal of  
**PATHOLOGY**

Cellular and Molecular Biology of Disease

Official Journal of the American Society for Investigative Pathology

The mTOR/AKT Inhibitor Temsirolimus Prevents  
Deep Infiltrating Endometriosis in Mice

Mahaut Leconte,<sup>\*†</sup> Carole Nicco,<sup>\*</sup> Charlotte Ngô,<sup>\*</sup>  
Christiane Chéreau,<sup>\*</sup> Sandrine Chouzenoux,<sup>\*</sup>  
Wioleta Marut,<sup>\*</sup> Jean Guibourdenche,<sup>§</sup>  
Sylviane Arkwright,<sup>¶</sup> Bernard Weill,<sup>\*</sup>  
Charles Chapron,<sup>‡</sup> Bertrand Dousset,<sup>†</sup> and  
Frédéric Batteux<sup>\*</sup>

*AJP August 2011, Vol. 179, No. 2*

## **Analyse**

L'objectif de ce travail était de mettre en évidence une prolifération accrue des cellules endométriosiques profondes, de la rapporter à une activation de la voie ERK par le biais du stress oxydant et à une activation de la voie AKT, d'identifier ces voies métaboliques comme cibles pour le traitement de l'endométriose et de proposer une molécule capable d'agir sur la progression de la maladie en bloquant une de ces voies.

Nous montrons une prolifération accrue des cellules endométriosiques profondes en rapport avec une augmentation du stress oxydant endogène. L'augmentation du stress oxydant intracellulaire provient d'un déséquilibre entre la production des formes réactives de l'oxygène et leur détoxification<sup>164</sup>. Comme dans le cancer<sup>170</sup>, le traitement des cellules endométriosiques par une molécule anti-oxydante, la N-acétylcystéine (NAC), réduit la production de peroxyde d'hydrogène et par là-même diminue la prolifération cellulaire. Cependant, alors que l'activité anti-oxydante de la NAC est identique dans l'endomètre eutopique et dans les lésions d'endométriose profonde, on remarque que la répercussion sur la prolifération cellulaire est inégale. En effet, l'effet antiprolifératif est plus marqué dans les cellules issues de l'endomètre eutopique. Cela suggère l'intervention d'autres mécanismes ou la présence de mécanismes amplifiés au sein des cellules issues des lésions profondes, leur permettant de maintenir leur statut hyperprolifératif. Par ailleurs, contrairement aux cellules endométriosiques<sup>4</sup>, le faible niveau de base du stress oxydant endogène des cellules endométriales normales explique que leur prolifération soit peu sensible aux variations de concentration de peroxyde d'hydrogène.

Nous montrons que l'action du stress oxydant sur la prolifération cellulaire s'effectue par le biais de la voie ERK. Le stress oxydant est connu pour activer la voie ERK de façon ligand-indépendante, dans plusieurs types cellulaires<sup>221</sup>. Nos résultats sont concordants avec les données de la littérature qui rapportent une activation de la voie ERK<sup>4, 66, 452</sup> et des gènes impliqués dans cette voie<sup>99, 124, 453</sup> dans l'endométriose. L'inhibition de la prolifération des cellules endométriosiques par un inhibiteur spécifique de la voie ERK, le léflunomide, renforce ces données.

Ainsi, nous montrons pour la première fois une augmentation de la prolifération des cellules endométriosiques profondes par le biais de l'activation de la voie ERK par le stress oxydant endogène. Notre équipe a déjà mis en évidence un phénomène similaire au niveau des cellules issues d'endométriomes ovariens<sup>4</sup>. Cependant, alors que dans les endométriomes ovariens,

## Le temsirolimus diminue les lésions d'endométriiose profonde chez la souris

l'hyperprolifération prédominait dans les cellules épithéliales, elle s'observe majoritairement dans les cellules stromales des lésions profondes. Ceci confirme l'hétérogénéité de la maladie endométriosique et suggère que l'endométriiose ovarienne est une maladie « épithéliale » tandis que l'endométriiose profonde est une maladie « stromale ».

Le rôle d'AKT dans l'endométriiose a été suggéré par plusieurs constatations. La mutation du gène P3KCA responsable de l'activation constitutive d'AKT est la mutation la plus fréquemment rencontrée dans les carcinomes ovariens à cellules claires<sup>443</sup> associés à l'endométriiose<sup>108-109</sup>. Une activation d'AKT dans les cellules épithéliales d'endométriomes ovariens<sup>444</sup>, probablement en rapport avec l'hyperœstrogénie locale<sup>445</sup>, a été rapportée. Par ailleurs, il a été également montré que le défaut d'un antagoniste spécifique du récepteur à l'œstradiol dans les cellules stromales de l'endomètre eutopique engendrait une activation d'AKT<sup>446</sup>.

Nous montrons pour la première fois dans cette étude que la protéine AKT est activée dans les cellules stromales issues des lésions endométriosiques profondes et ce, de façon œstrogéno-indépendante. L'inhibition de la prolifération cellulaire par un inhibiteur spécifique de mTOR, le temsirolimus, confirme le rôle d'AKT dans le phénotype hyperprolifératif des cellules endométriosiques. Nous avons par ailleurs confirmé l'effet entiprolifératif du temsirolimus chez des souris Nude à qui nous avons implantés des fragments d'endométriiose profonde. Ces données suggèrent que la voie AKT-mTOR, impliquée dans la croissance et la survie cellulaire<sup>454-455</sup>, intervient dans le développement de l'endométriiose et nous conduit à proposer cette molécule comme candidat pour le traitement de l'endométriiose profonde.

- Le phénotype hyperprolifératif des cellules endométriosiques profondes est lié à une activation de la voie ERK par le biais du stress oxydant et à une activation de la voie AKT
- L'endométriiose profonde est une maladie stromale
- Le stress oxydant, la voie ERK et la voie AKT constituent une cible pour le traitement de l'endométriiose profonde
- Les inhibiteurs de mTOR en particulier le temsirolimus pourraient faire l'objet d'essais cliniques pour le traitement de l'endométriiose profonde



**Article 2** Les inhibiteurs de protéine kinase contrôlent la progression de l'endométriiose *in vivo* et *in vitro*

---



Protein kinase inhibitors can control the progression of endometriosis *in vitro* and *in vivo*

Charlotte Ngô,<sup>1,2</sup> Carole Nicco,<sup>1</sup> Mahaut Leconte,<sup>1,3</sup> Christiane Chéreau,<sup>1</sup> Sylviane Arkwright,<sup>4</sup> Marie-Cécile Vacher-Lavenu,<sup>4</sup> Bernard Weill,<sup>1</sup> Charles Chapron<sup>2,†</sup> and Frédéric Batteux<sup>1,\*†</sup>

*J Pathol* 2010; **222**: 148–157

### Analyse

L'objectif de ce travail était de montrer que la voie ERK, impliquée dans le phénotype hyperprolifératif des cellules endométriosiques, peut constituer une cible pour le traitement de l'endométriose et de proposer une molécule capable d'agir sur la progression de la maladie en bloquant cette voie métabolique.

Nous montrons par deux techniques, le western blot et l'ELISA, une activation de la voie ERK dans les lésions d'endométriose mais également dans l'endomètre eutopique des patientes endométriosiques. Le fait que cette activation soit absente ou indétectable dans l'endomètre des témoins suggère que la mesure de la forme phosphorylée de ERK, pERK, par ELISA sur une biopsie d'endomètre pourrait être proposée comme test diagnostique. Aujourd'hui, le diagnostic d'endométriose repose sur l'analyse histologique d'une pièce d'exérèse chirurgicale. De plus, le délai moyen entre l'apparition des symptômes et l'établissement du diagnostic est de 8 à 10 ans. L'existence d'un test diagnostique réalisable sur une simple biopsie d'endomètre pratiquée par un gynécologue de ville serait un outil révolutionnaire.

Nous montrons que les inhibiteurs de protéine kinase, bloquant l'activation de ERK par l'intermédiaire d'une inhibition spécifique de MEK, contrôlent la progression de l'endométriose à la fois *in vitro* et *in vivo*. Cependant, même si le PD98059 et l'UO126 sont des inhibiteurs de MEK validés comme outils de recherche fondamentale, ils ont été abandonnés dans la recherche clinique du fait de leur efficacité modérée dans les cancers avancés pour lesquels ils ont été testés. En revanche, le A771726, métabolite actif du léflunomide, connu pour ses activités immunomodulatrices et inhibitrice de tyrosine kinase, est utilisé en pratique clinique courante pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. Cette molécule ayant déjà montré son efficacité dans un modèle animal d'endométriose chez le rat<sup>456</sup>, nous proposons le léflunomide comme candidat pour le traitement de l'endométriose. Ses propriétés analgésiques et anti-inflammatoires sont par ailleurs particulièrement intéressantes dans l'endométriose. Une des principales limites à son utilisation clinique est sa tératogénéicité mais cet effet transitoire est à mettre en balance chez des patientes porteuses d'une endométriose sévère résistante à tout autre traitement médical pour lesquelles une chirurgie extensive serait nécessaire.

## Les IPK contrôlent la progression de l'endométriose in vitro et in vivo

- La voie ERK constitue une cible pour le traitement de l'endométriose
- La quantification de pERK par ELISA sur une biopsie d'endomètre pourrait être un test diagnostique pour l'endométriose
- Les inhibiteurs de protéine kinase en particulier le léflunomide pourraient faire l'objet d'essais cliniques pour le traitement de l'endométriose

**Article 3** Effets antiprolifératifs de l'anastrozole, du méthotrexate et du 5-fluorouracile sur l'endométriose *in vitro* et *in vivo*

---

## Fertility and Sterility.

### Antiproliferative effects of anastrozole, methotrexate, and 5-fluorouracil on endometriosis *in vitro* and *in vivo*

Charlotte Ngô, M.D.,<sup>a,b</sup> Carole Nicco, Ph.D.,<sup>a</sup> Mahaut Leconte, M.D.,<sup>a,c</sup> Christiane Chéreau, Pharm.D.,<sup>a</sup> Bernard Weill, M.D., Ph.D.,<sup>a</sup> Frédéric Batteux, M.D., Ph.D.,<sup>a</sup> and Charles Chapron, M.D.<sup>b</sup>

Vol. 94, No. 5, October 2010

### Analyse

L'objectif de ce travail était de tester des molécules antiprolifératives dans l'endométriose par analogie avec le cancer dont le comportement cellulaire présente de nombreuses similitudes et de les comparer à la progestérone, traitement hormonal couramment utilisé chez les patientes endométriosiques.

Nous montrons que la progestérone ne diminue pas la prolifération des cellules endométriosiques ce qui étaye l'hypothèse de la résistance des lésions à cette molécule aujourd'hui bien connue<sup>1</sup>.

Nous montrons que le méthotrexate, antimétabolite utilisé dans certains cancers, la polyarthrite rhumatoïde et les grossesses extra-utérines ne diminue pas la prolifération des cellules endométriosiques *in vitro*.

Nous montrons que l'anastrozole, inhibiteur de type II de l'aromatase, ne diminue pas la prolifération des cellules endométriosiques voire augmente la prolifération des cellules endométriales normales. Ce phénomène a déjà été montré *in vitro* mais le mécanisme n'est pas clair<sup>457</sup>. Les inhibiteurs de l'aromatase, à la frontière entre traitement hormonal et traitement anti-tumoral, sont principalement utilisés dans le traitement adjuvant des cancers du sein hormono-dépendants chez les femmes ménopausées. Ils ont ouvert une nouvelle perspective dans le traitement de l'endométriose depuis une dizaine d'années<sup>131-132</sup> en raison de la surexpression de l'aromatase dans les lésions d'endométriose et dans l'endomètre eutopique des patientes endométriosiques<sup>5, 133</sup>. La surexpression de l'aromatase est responsable d'une production locale d'œstrogènes et de la résistance aux progestatifs et aux agonistes de la GnRH. Les inhibiteurs de l'aromatase sont utilisés avec parcimonie car ils induisent une déplétion osseuse qui peut être sévère. De plus, ils doivent être associés à un traitement bloquant la fonction ovarienne imposant une ménopause chimique chez les femmes non ménopausées<sup>134</sup>.

Nous montrons que le 5-fluorouracile, antimétabolite utilisé de façon courante dans le traitement adjuvant des cancers digestifs, contrôle très efficacement la prolifération des cellules endométriosiques tant *in vivo* qu'*in vitro*. Sur le plan physiopathologique son efficacité repose sur le caractère « tumoral » des cellules endométriosiques. La principale toxicité du 5-FU est cardiaque avec une toxicité moindre de la forme orale, la capécitabine (XELODA®). Un risque d'aménorrhée définitive a été observé dans moins de 10% des cas avec un risque d'autant plus faible que la patiente est jeune<sup>458</sup>. Cette molécule pourrait être testée dans le cadre d'essais thérapeutiques pour

## **Effets antiprolifératifs de l'anastrozole, du méthotrexate et du 5-FU sur l'endométriose**

des patientes porteuses d'une endométriose sévère résistante à tout autre traitement médical pour laquelle une chirurgie extensive serait nécessaire.

- Le traitement de l'endométriose peut être non hormonal
- L'engouement des anti-aromatases doit être pondéré
- Les antimétabolites pourraient avoir une place dans le traitement de l'endométriose

**Article 4** Effets antiprolifératifs des agonistes des cannabinoïdes sur l'endométriose profonde *in vitro* et *in vivo*

---

The American Journal of  
**PATHOLOGY**  
Cellular and Molecular Biology of Disease

Official Journal of the American Society for Investigative Pathology

Antiproliferative Effects of Cannabinoid Agonists on Deep Infiltrating Endometriosis

Mahaut Leconte,<sup>\*†</sup> Carole Nicco,<sup>\*</sup> Charlotte Ngô,<sup>\*‡</sup>  
Sylviane Arkwright,<sup>§</sup> Christiane Chéreau,<sup>\*</sup>  
Jean Guibourdenche,<sup>¶</sup> Bernard Weill,<sup>\*</sup>  
Charles Chapron,<sup>‡</sup> Bertrand Dousset,<sup>†</sup>  
and Frédéric Batteux<sup>\*</sup>

*AJP December 2010, Vol. 177, No. 6*

### Analyse

L'objectif de ce travail était de montrer les effets antiprolifératif et antifibrosant des agonistes des cannabinoïdes sur les lésions d'endométriose profonde.

Nous avons choisi le WIN 55212-2 en raison de son caractère non sélectif et de l'expression ubiquitaire de ses deux récepteurs, CB1 et CB2, par les lésions profondes d'endométriose, l'endomètre eutopique mais également l'endomètre sain.

Nous montrons que WIN 55212-2 exerce un effet antiprolifératif sur les cellules endométriosiques profondes. Cet effet a déjà été montré dans le cancer en particulier dans le cancer du sein<sup>459</sup>, de la prostate<sup>459-460</sup>, dans le cancer colorectal<sup>461</sup> et dans le mélanome<sup>462</sup>.

Nous montrons que le WIN 55212-2 à forte concentration diminue la production de peroxyde d'hydrogène et d'anion superoxyde dans les cellules endométriosiques profondes. L'effet antioxydant des agonistes des cannabinoïdes a déjà été montré dans les macrophages<sup>463</sup> et les cardiomyocytes<sup>464</sup>. Contrairement à ce que nous pensions, le niveau d'activation de ERK n'était pas modifié dans les cellules traitées par WIN 55212-2. Nous l'expliquons par une activation directe de ERK par les agonistes des cannabinoïdes<sup>462, 465</sup> contrebalançant l'inhibition de la voie par l'effet antioxydant de ces derniers. Ces données montrent que l'effet antiprolifératif de WIN sur les cellules endométriosiques profondes ne s'exerce pas par le biais de la voie ERK.

En revanche, nous montrons que le WIN 55212-2 inhibe la voie AKT dans les cellules endométriosiques profondes. L'effet antiprolifératif des agonistes des cannabinoïdes par le biais de cette voie est connu<sup>466-467</sup>. Nous émettons donc l'hypothèse que l'effet antiprolifératif de WIN est lié à une inhibition de la voie AKT.

L'activation isolée de la voie AKT pourrait expliquer l'absence d'effet cytotoxique de WIN sur les cellules endométriosiques profondes alors qu'il a été rapporté dans plusieurs types cellulaires<sup>466-469</sup>. En effet, l'apoptose induite par les agonistes des cannabinoïdes dans les cellules gliales de rat est initiée par l'action combiné de l'inhibition de la voie ERK et de la voie AKT<sup>466</sup>.

Par ailleurs, nous montrons que le WIN 55212-2 inhibe l'expression du  $\alpha$ SMA, marqueur de la transformation myofibroblastique, dans les cellules stromales endométriosiques profondes. Les effets antifibrosants des agonistes des cannabinoïdes ont déjà été montré dans la peau<sup>470</sup>, le cœur<sup>471</sup>, le pancréas<sup>472</sup> ainsi que dans le foie<sup>473-474</sup> où leur utilisation prévient la cirrhose<sup>475</sup>. Cet effet est particulièrement intéressant dans l'endométriose profonde, puisque réduire la composante fibreuse des lésions endométriosiques pourrait faciliter la chirurgie voir permettre des exérèses moins mutilantes.



## Effets antiprolifératifs des agonistes des cannabinoïdes sur l'endométriose profonde

Nous confirmons *in vivo* l'effet antiprolifératif des agonistes des cannabinoïdes par la diminution du volume des nodules endométriosiques profonds implantés dans des souris nudes immuno-déficientes traitées par WIN 5512-2. Ces données nous conduisent à proposer cette molécule comme candidat pour le traitement de l'endométriose profonde.

- L'agoniste des cannabinoïdes, WIN 5512-2, exerce un effet antiprolifératif et antifibrosant sur les cellules endométriosiques profondes. Son effet antiprolifératif est confirmé *in vivo* sur un modèle murin d'endométriose.
- L'effet antiprolifératif du WIN 5512-2 est lié à une inhibition de la voie AKT.
- Les agonistes des cannabinoïdes pourraient avoir une place dans le traitement de l'endométriose profonde

**Article 5 Rôle de l'interaction CXCL12-CXCR4 dans la physiopathologie de l'endométriose profonde**

---

Role of the CXCL12-CXCR4 axis on deep endometriosis development

*Article soumis à Human Reproduction*

## Role of the CXCL12-CXCR4 axis on endometriosis development

Mahaut Leconte, MD., <sup>\*</sup>, <sup>†</sup> Sandrine Chouzenoux, PhD., <sup>\*</sup> Carole Nicco, PhD., <sup>\*</sup> Christiane Chéreau, PharmD., <sup>\*</sup> Pietro Santulli, MD., PhD. <sup>\* ‡</sup> Bernard Weill, MD., PhD., <sup>\*</sup> Charles Chapron, MD., <sup>‡</sup> Bertrand Dousset, MD., <sup>†, §</sup> and Frédéric Batteux, MD., PhD. <sup>\*, §</sup>

<sup>§</sup>F.B. and B.D. contributed equally to this work

<sup>\*</sup> Laboratoire d'Immunologie, EA 1833, Université Paris Descartes, Paris, France; <sup>†</sup> Department of Digestive and Endocrine Surgery; <sup>‡</sup> Department of Obstetrics and Gynecology II and Reproductive Medicine; Hôpital Cochin, Assistance Publique, Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France.

### RUNNING HEAD

CXCL12-CXCR4 and endometriosis

**Reprint requests:** Frédéric Batteux, MD., PhD., Laboratoire d'immunologie, Hôpital Cochin, 75679 Paris cedex 14.

Phone 33-1-58-41-20-09

Fax 33-1-58-41-20-08

E-mail: frederic.batteux@cch.aphp.fr

### INTRODUCTION

Endometriosis, a common disease that affects about 6 to 10% of women of childbearing age <sup>1</sup>, is characterized by the presence of endometrial tissue outside of the uterine cavity <sup>1, 31</sup>. Deep infiltrating endometriosis (DIE) is an aggressive form of the disease that penetrates the muscularis of pelvic organs (bladder, intestine, ureter, etc.) <sup>6</sup>. DIE is responsible for chronic pelvic pain whose intensity is correlated with the depth of lesions <sup>29, 34</sup>, induces disability and infertility <sup>476</sup>. The pathophysiology of endometriosis remains poorly understood. The main theory, proposed in the 1920s by Sampson, is the retrograde menstruation of endometrial tissue through fallopian tubes into the peritoneal cavity <sup>1</sup>. The development of the disease in the pelvis is attributed to the attachment and the survival of endometrial cells in the peritoneal cavity, progressive invasion of the peritoneum with neoangiogenesis leading to the spreading of the disease <sup>1, 477</sup>. Several mechanisms such as metaplasia of the coelomic epithelium, environmental factors, genetic predisposition, immunological abnormalities, and chronic inflammation have been proposed to explain the pelvic development of endometriosis <sup>1, 478-479</sup>. Chemokines are small molecules that can be produced during the inflammatory process and responsible for the attraction of cells depending on their expression of selective chemokine receptors. Recent findings have demonstrated that eutopic endometrium of patients with endometriosis have an activated phenotype in regards to the endogeneous activation of the mitogen-activated protein kinase ERK1/2 (Extracellular Regulated Kinase) <sup>480-482</sup> and of the AKT/mTOR pathway <sup>480-481</sup>. This could lead to the over expression of chemokine receptors or to the expression of new chemokine receptors like CXCR4, on endometriotic cells <sup>449</sup>. Interestingly, peritoneal mesothelial cells are able to produce CXCL12 (SDF1 $\alpha$ ), the CXCR4 ligand, in mice <sup>483</sup>. Altogether, these findings are in agreement with the hypothesis of a possible role for the CXCL12/CXCR4 axis in the specific homing of eutopic endometrial cells within the peritoneal cavity during endometriosis. The aim of this work is to elucidate the role of this pathway on the development of deep infiltrating endometriosis.

### MATERIALS AND METHODS

#### *Sample Collection*

Biopsies of eutopic endometrium and deep infiltrating endometriotic nodules were obtained from 14 patients undergoing surgical treatment for DIE with rectal involvement. Low Rectal Endometriosis was defined preoperatively, based on the following clinical and endoscopic ultrasonographic criteria: a) rectal invasion of the infraperitoneal rectum located within 8 cm of the dentate line, reachable on rectal examination b) full-thickness invasion of the muscular layer greater than 15 mm on rectal endoscopic ultrasonography <sup>484</sup>.

## Rôle de l'interaction CXCL12-CXCR4 dans l'endométriose profonde

DIE was confirmed in all cases by a pathologist experienced in endometriosis pathology (SA). Control endometrial specimens were obtained from 12 patients without macroscopic endometriosis undergoing laparoscopy for other reasons (tubal infertility, non endometriotic ovarian cyst, myoma). Ethics approval for this study has been obtained from the ethics committee at Cochin Hospital (n°05-2006 "génomique et protéomique de l'endométriose"). Written informed consent was obtained from each patient and control. Specimens were collected under sterile conditions and immediately transported to our laboratory in DMEM (Dulbecco medium, Gibco Invitrogen, Cergy Pontoise, France) with 10% charcoal-treated FCS. The period of time elapsed between the biopsy and the procedure of cell isolation never exceeded one hour. The same culture medium was used throughout the study.

### ***Cell Isolation and Culture***

Primary endometrial and deep endometriotic cell cultures were prepared from biopsies as previously described<sup>480</sup>. Biopsy specimens were rinsed and minced into small pieces then digested with 5% dispase and collagenase (2 mg/ml, Gibco Invitrogen, Cergy Pontoise, France) for 1h at 37°C and separated using serial filtration. Red blood cells were removed by hypotonic lysis (0.15M NH<sub>4</sub>Cl, 1mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1mM Na<sub>2</sub>EDTA). Debris were removed using 100 µm aperture sieves. Epithelial cells were retained on 40 µm aperture sieves while stromal cells remained in the filtrate. Stromal cells were plated onto Primaria flasks (Becton Dickinson Labware, Le Pont de Claix, France) and cultured in DMEM (Gibco Invitrogen, Cergy Pontoise, France) with 10% FCS. For each patient with DIE, two populations of cells were obtained: eutopic endometrial stromal cells (**Es**), and deep infiltrating endometriotic stromal cells (**Ds**). For each control we used one cell population of control endometrial stromal cells (**Cs**).

The purity of stromal and epithelial cells suspensions was assessed by staining with 1:100 FITC-labelled anti-cytokeratine and 1:100 Cy3-labelled anti-vimentin antibodies (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA). Fluorescence was analyzed using an Olympus fluorescent microscope (Hambourg, Germany) and images were captured using the Cell Imaging station (Olympus). Both populations were negative for CD3 (T cells), CD45 (leukocytes) and CD11b (monocytes and granulocytes) staining. All the experiments were performed on primary cultures of each cell population and the various tests were performed in triplicates.

### ***Immunoblotting of Cell Lysates***

Cells were lysed in ice-cold RIPA buffer (10mM TrisHCl, pH 7.5, 5M NaCl, 1% Triton X-100, 0.1 % SDS) supplemented with 25mM sodium fluoride, 0.5mM sodium orthovanadate and anti-protease 1%. Equal amounts of protein (30 µg) were loaded and separated by 10% SDS-PAGE. Transfer and blocking were performed. For CXCR4 staining, polyacrilamide membranes were saturated with 5% skim milk for one hour at room temperature, and then incubated with rabbit anti-human CXCR4 IgG

## Rôle de l'interaction CXCL12-CXCR4 dans l'endométriose profonde

antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California) overnight at 4°C.  $\beta$ actin was used as housekeeping protein. Specific antibodies were detected using a 1:1000 dilution of horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG Ab and visualized by an Enhanced ChemoLuminescence system (Pierce Perbio Sciences, Berbières, France)<sup>451</sup>.

### **FACS**

For flow cytometry, cells were washed once with phosphate-buffered saline (PBS) and then harvested with 5% dispase. Detached cells were washed with PBS contained 1% FCS and 1% penicillin/streptomycin (wash buffer), and resuspended in washed buffer ( $10^6$  cells/100ul). Cells were incubated for 45 min at 4°C in the dark with an APC (AlloPhycoCyanin) labeled mouse IgG1 against human CXCR4 (BD biosciences, San Diego). An APC labeled mouse IgG1 isotype control was used as negative control (BD biosciences, San Diego). The labeled cells were washed in the wash buffer, fixed in PBS containing 1% paraformaldehyde and then analyzed with BD FACSCANTO II flow cytometer (BD biosciences). Results were analysed using the FlowJo software. The experiments were conducted on three patients and three control women.

### **Transwell Migration Assay**

A 6-well transwell chamber (8 $\mu$ m, BD biocoat matrigel invasion chamber- ref: 354481- Becton Dickinson, Bedford, USA) was used to evaluate the motility and invasive ability of eutopic endometrial stromal cells. Purified eutopic endometrial stromal cells were seeded at  $2 \times 10^5$  cells per well into the upper region of BD biocoat matrigel invasion chambers with DMEM containing 10% FCS. Lower chamber was filled with DMEM containing 5% BSA as a chemoattractant and 200ng/mL recombinant human CXCL12 (SDF1 $\alpha$ ) (R&D systems, Abingdon, United Kingdom). For the negative control, CXCL12 was omitted in the lower chamber. After 22 hours incubation, cells that had not migrated through the membrane were wiped out with a cotton swab. Cells on the lower surface of the membrane were fixed with methanol for 2 min, stained with 1% toluidine blue for 2 min and washed 3 times with PBS. Stained cells that had migrated to the lower surface were visualized under a microscope and photographed. The experiments were conducted on three patients and three control women.

### **ELISA assay**

For CXCL12 ELISA assay, peritoneal liquid were obtained from 25 DIE patients undergoing a surgical procedure and from 35 control patients hospitalized for a non-inflammatory disease requiring a surgical procedure (splenectomy, hernia,...). Classical ELISA from R&D Systems (R&D systems, Abingdon, United Kingdom) was used to analyze CXCL12 concentration within the peritoneal liquid under the manufacturer recommendations. For IL6 ELISA assay, peritoneal liquid were obtained from 41 DIE patients undergoing a surgical procedure and from 30 control patients hospitalized for a

non-inflammatory disease requiring a surgical procedure (splenectomy, hernia,...). Classical ELISA from R&D Systems (R&D systems, Abingdon, United Kingdom) was used to analyze CXCL12 concentration within the peritoneal liquid under the manufacturer recommendations.

### ***Statistical Analysis***

All the results are the means of independent triplicate experiments for each cellular population from each patient. Means were compared by the Student's test. A level of  $p < 0.05$  was accepted as significant.

## **RESULTS**

### ***Biopsies***

Fourteen patients were included in the study. Twelve biopsies of eutopic endometrium and fourteen biopsies of deep endometriotic nodules were obtained from those patients. Twelve **Es** cell lines were extracted from 12 samples of eutopic endometrium and 14 **Ds** cell lines were extracted from 14 samples of deep infiltrating endometriotic nodules. One cell line was eliminated for failure of culture and another cell line was eliminated for bacterial contamination. A total of 11 **Es**, and 13 **Ds** cell lines were included for study.

Twelve control women were included in the study. Twelve biopsies of healthy endometrium were obtained and provided 12 stromal control endometrial cell lines. Two cell lines were eliminated for failure of culture. Finally, 10 **Cs** cell lines have been used in this study.

### ***Evaluation of expression of CXCR4 on eutopic endometrium and deep infiltrating stromal cells from patients with endometriosis by immunoblotting***

CXCR4 was present in all cell lines but in higher amounts in the stromal cell lines derived from eutopic endometrium (**Es**,  $0.53 \pm 0.08$ ) compared to the stromal cell lines derived from control endometrium (**Cs**,  $1.29 \pm 0.06$ ) and to the stromal cell lines derived from deep infiltrating endometriotic nodule (**Ds**,  $0.53 \pm 0.07$ ) (**Figure 1A**).

The CXCR4 expression in **Es** cells was 2.43-fold higher when compared with **Cs** cells and **Ds** cells ( $p < 0.05$ , respectively) (**Figure 1B**).

### ***Evaluation of expression of CXCR4 in eutopic endometrium and deep infiltrating stromal cells from patients with endometriosis by flow cytometry***

**Es**, **Ds** and **Cs** cells were analyzed for CXCR4 expression (**Figure 2A**). The mean fluorescence intensity of CXCR4 expression in **Es** cells ( $149 \pm 30$ ) is significantly higher compared to **Cs** ( $746 \pm 25$ ) and **Ds** ( $228 \pm 40$ ) cells ( $p < 0.05$ , respectively) (**Figure 2B**).

### ***Effect of CXCL12 on invasion of eutopic endometrial stromal cells***

## Rôle de l'interaction CXCL12-CXCR4 dans l'endométriose profonde

The stimulating effect of CXCL12 on migration and invasion of stromal cells was evaluated using transwell chamber assay (**Figure 3A**). The potential of invasion and migration of **Cs** cells in the lower chamber through Matrigel-coated polycarbonate filters was similar with or without CXCL12. On the contrary, **Es** cells are significantly more attracted when CXCL12 is present in the lower chamber than when CXCL12 is not present ( $142 \pm 3$  vs  $38 \pm 2$  respectively,  $p < 0.01$ ) (**Figure 3B**). Thus, CXCL12 is a potent chemo-attractant for Es cells but not for Cs cells. This phenomenon shows a deviation of the phenotype of the Es cells concerning their ability to interact with CXCL12 which is in agreement with their increased CXCR4 expression.

### ***Analysis of CXCL12 Concentration in the Peritoneal Liquid***

CXCL12 concentration in the peritoneal liquid was significantly higher in the DIE patients than in the control ( $p < 0.05$ ) (**Figure 4**).

### ***Analysis of IL6 Concentration in the Peritoneal Liquid***

IL6 concentration in the peritoneal liquid was significantly higher in the DIE patients than in the control ( $p < 0.05$ ) (**Figure 5**).

## **DISCUSSION**

The most widely accepted explanation for development of endometriosis is a retrograde menstruation with implantation of endometrial cells according to Sampson's theory. However, the amount of endometrial cells found in the peritoneal fluid is not higher than that of healthy women<sup>485</sup>. The stimuli necessary to provide attachment and outgrowth of endometrial cells after arrival in the peritoneal cavity remain unknown. We hypothesize that the susceptibility of a woman to develop endometriosis is based on the modification of endometrial cells in conjunction with peritoneal factors able to stimulate cellular attraction, and adhesion in addition to cell growth.

In previous studies, we have confirmed that endometrial and deep endometriotic stromal cells of DIE patients have a hyperproliferative phenotype compared with stromal cells from control endometrium<sup>480-482</sup>. In the other hand, the potential role of the peritoneal environment in the development of the disease has been widely studied<sup>478</sup>. It is agreed that a local inflammation occurs in the peritoneal cavity and there are substantial evidences that immunological factors and angiogenesis enhance the implantation of endometrial cells and the progression of the disease. Indeed, proinflammatory cytokines and growth factors were found elevated in the peritoneal fluid of women with endometriosis and could contribute to the proliferation of endometriotic implants and neoangiogenesis<sup>173-174, 477</sup>.

The purpose of our study was to demonstrate the presence of a chemoattractant able to stimulate the attraction and the anchoring of the endometrial cells in the peritoneal cavity.



## Rôle de l'interaction CXCL12-CXCR4 dans l'endométriose profonde

We investigated the expression of a chemokine receptor CXCR4 expressed physiologically by healthy endometrium<sup>448</sup> on endometrial and deep endometriotic stromal cells of DIE patients. The both western blot and flow cytometry experiments confirm that the eutopic endometrium of DIE patients overexpresses CXCR4 compared to healthy endometrial cells and deep endometriotic cells. This overexpression has also been recently observed by Ruiz et al. who show an increase CXCR4 protein levels by immunohistochemistry in endometriotic lesions compared to the endometrium of controls<sup>449</sup>. We suppose that overexpression of CXCR4 is stimulated by the activated phenotype of endometrial cells. Indeed, we evidenced in a previous work on DIE patients, selected for the same criteria as for this work, that endometriotic cells have a hyperproliferative phenotype in a direct relation with an increased endogenous oxidative stress, activation of the ERK and of the mTOR/AKT pathway<sup>481</sup>. The ERK dependent activation of CXCR4 has been shown in cancer. For example, Kukreja et al<sup>450</sup> have observed that CXCR4 expression in human prostate cancer cell lines (PC-3) is dependent on MEK/ERK signalling cascade and NF-KB activation. Furthermore, ERK signalling pathway is likely associated with several mechanisms of cell motility mediated by CXCR4, including regulation of the transcriptional levels of MMP. In a model of oral squamous cell carcinoma cells<sup>486</sup>, it has been observed that the underlying mechanism of CXCR4 favouring migration and invasion by regulating MMP expression involves the activation of the ERK signalling pathway. This phenomenon has also been observed in chondrosarcoma and was amplified by hypoxia<sup>487</sup>. The mechanism of DIE that penetrates pelvic organs and combining several locations<sup>142</sup> could be compared to certain invasive and metastatic forms of cancer. In this line, these data suggest that overexpression of CXCR4 in endometriosis is probably related to the activation of ERK and probably implicated in cell migration and invasion.

The chemokine stromal cell-derived factor-1 (SDF-1 $\alpha$ )/CXCL12 represents the single natural ligand for the chemokine receptor CXCR4<sup>333</sup>. CXCL12 possesses angiogenic properties and is involved in the outgrowth and metastasis of CXCR4-expressing tumors<sup>377, 425, 488-489</sup> and in the lesions of certain inflammatory immune disorders, such as rheumatoid arthritis<sup>490</sup>. Peritoneal mesothelial cells are able to produce CXCL12<sup>483</sup> but the overexpression of CXCL12 in the peritoneal fluid of endometriotic patients has never been shown. We demonstrate for the first time by ELISA assays that the rate of CXCL12 was significantly higher in peritoneal fluid of DIE patients than that in healthy women. As several studies have shown increased production of CXCL12 during the inflammatory process<sup>491-492</sup>, we hypothesize that the increased rate of CXCL12 in peritoneal fluid of DIE patients is related to the inflammatory environment. This could be related to inflammation known in endometriosis that we confirm by an increase of IL6 in the peritoneal fluid of our patients. This increased level of IL6 in the

## Rôle de l'interaction CXCL12-CXCR4 dans l'endométriose profonde

peritoneal fluid of patients with endometriosis confirm previous study showing the production of IL6 by activated macrophages<sup>80, 493</sup>.

A mechanism for cancer metastasis has emerged that highlights the role of chemokines. In this signaling and homing mechanism, target organs produce and release specific chemokines that attract nearby or distant cancer cells bearing specific corresponding receptors. It's based on the principles of the "seed and soil" hypothesis which was first discussed theory by Stephen Paget over a century ago in 1889. Signaling induces directional, site-specific cell migration leading to implantation in a favorable "soil." Recent studies support this signaling mechanism as described in numerous cancer models<sup>425, 489, 494</sup>. As in metastatic cancer, we hypothesized that the CXCL12/CXCR4 axis plays a major role in the development of DIE. Indeed, we show for the first time that stromal endometrial cells are able to be attracted by the peritoneal fluid. In fact, the experiments by transwell assays confirm that the endometrial stromal cells are specifically attracted by CXCL12 while endometrial cells of healthy women don't migrate in CXCL12 environment. Although it is certainly not the only pathway, the CXCL12-CXCR4 axis plays a major role in the regulation of trafficking and homing of endometrial cells in peritoneal cavity.

Our work shows for the first time that endometrial stromal cells of DIE patients have the capacity, in the inflammatory context that represents endometriosis, to be specifically attracted in the peritoneal cavity. This phenomenon based on CXCL12/CXCR4 pathway supports the additive theory of Sampson in the physiopathology of endometriosis. Moreover, our findings identify the CXCR4 receptor as a potential novel therapeutic target for treatment of deep infiltrating endometriosis.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Ms Agnes Colle for editing the manuscript

### Legends to the figure

**Figure 1- Expression of CXCR4 by eutopic endometrial (Es) and deep infiltrating (Ds) stromal cells compared to control endometrial stromal (Cs) cells. A: Determination of CXCR4 by western blot in cell lysates.** Western blotting of CXCR4 were performed on lysates of the various stromal cell lines (10 Cs, 11 Es, and 14 Ds) using a specific anti-CXCR4 antibody. A representative western blot is shown, obtained with stromal cell lines extracted from one patient and from one control. **B: Quantitative analysis of CXCR4.** Quantitative analysis was performed in all stromal cell lines (10 Cs, 11 Es, and 14 Ds) by Western blot analysis. The mean optical density ratio CXCR4/ $\beta$ actine was calculated in all stromal cell lines: \* $p < 0.05$ , endometriotic versus control cells, † $p < 0.05$  eutopic endometrial versus deep infiltrating cells.

**Figure 2 - Cytofluorometrical analysis of the expressed CXCR4 by eutopic endometrial (Es) and deep infiltrating (Ds) stromal cells compared to control endometrial stromal (Cs) cells.** FACS analysis using the monoclonal anti-CXCR4 antibodies. The staining patterns of the CXCR4 antibodies are shown in gray, the respective isotype controls in white. The x-axis indicates fluorescence intensity measured on a log<sub>10</sub> scale, and the y-axis indicates events counts on a linear scale. A representative experiment of three is shown.

### Figure 3 - Effect of CXCL12 on invasion of eutopic endometrial stromal cells

**A:** Eutopic endometrial (Es) and Control endometrial (Cs) stromal cells migrated through the Matrigel-coated membrane were stained with toluidine blue under the condition of serum free DMEM (**CXCL12-**, first line) and 200 ng/mL CXCL12 preincubated (**CXCL12+**, second line). Original magnification x 10. **B: Quantitative analysis of number of migrated cells on transwell assay:** the mean number of migrated cells on 6 visual fields was calculated for control endometrial stromal (Cs) and eutopic endometrial stromal (Es) cells with or without CXCL12. \*\* $p < 0.01$ , CXCL12+ versus CXCL12.

### Figure 4 - Analysis of CXCL12 Concentration in the Peritoneal Liquid by Elisa assay

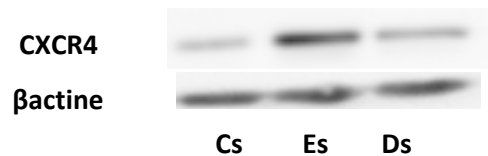
CXCL12 concentrations were analyzed in peritoneal liquid of 35 healthy women (control) and of 25 DIE patient. \* $p < 0.05$ , DIE versus control women.

### Figure 5 - Analysis of IL6 Concentration in the Peritoneal Liquid by Elisa assay

IL6 concentrations were analyzed in peritoneal liquid of 30 healthy women (control) and of 41 DIE patient. \* $p < 0.05$ , DIE versus control women.

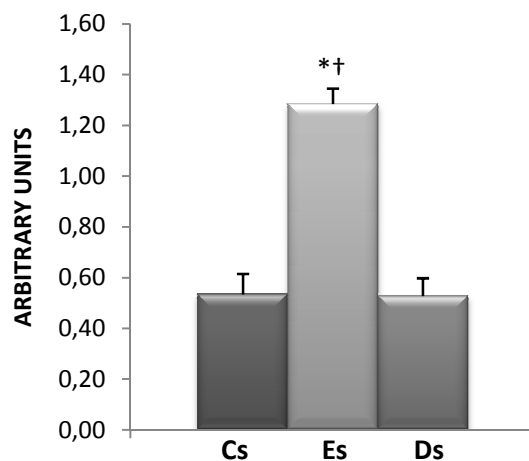
Figure 1

A

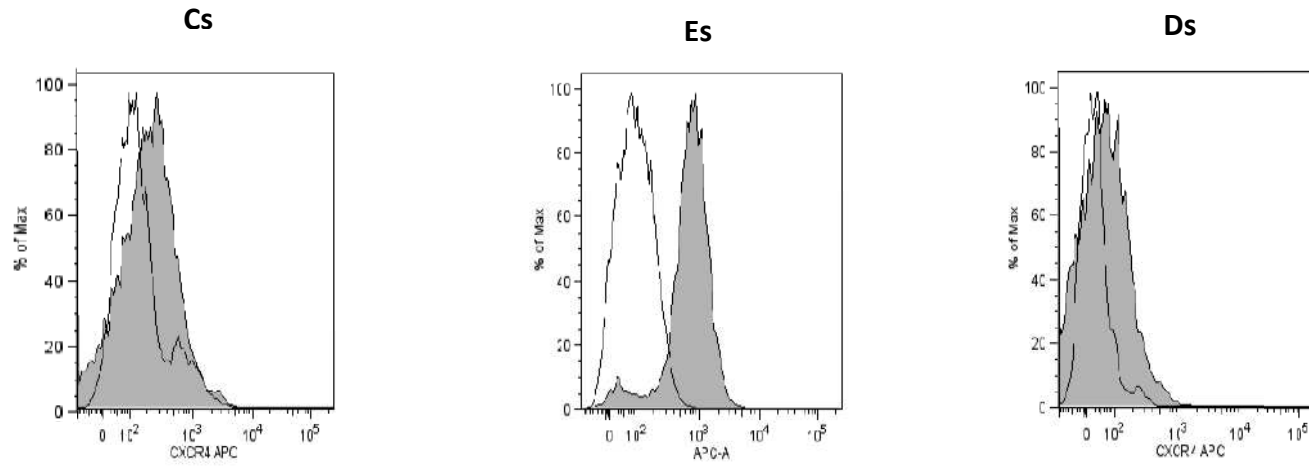


B

QUANTITATIVE ANALYSIS OF CXCR4 WESTERN BLOT



**A**



**B**

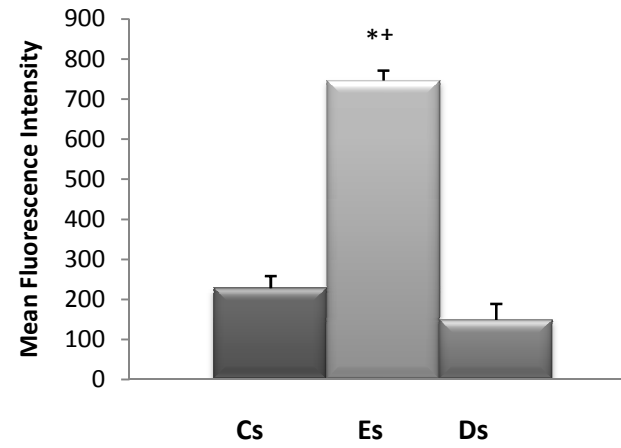


Figure 3-Transwell

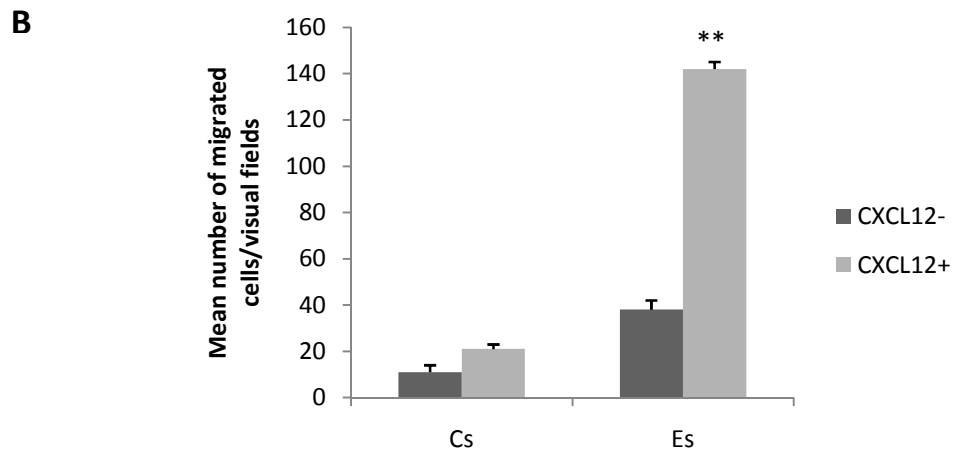
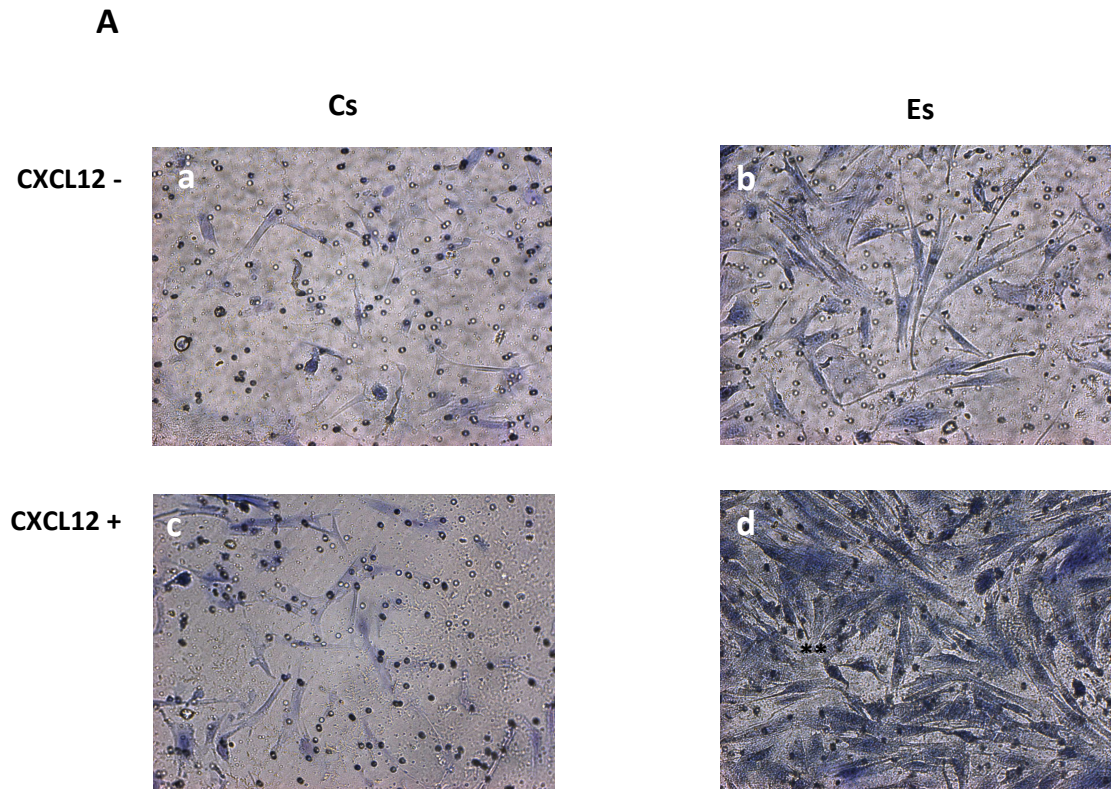


Figure 4-CXCL12

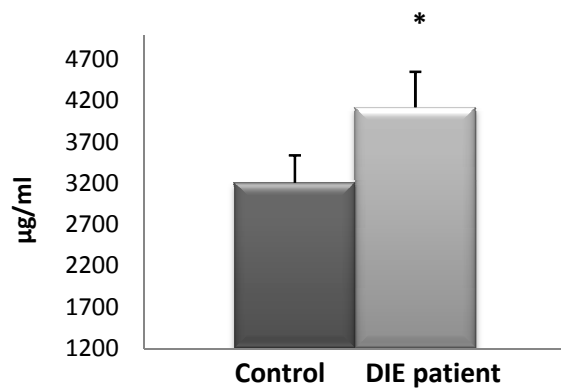
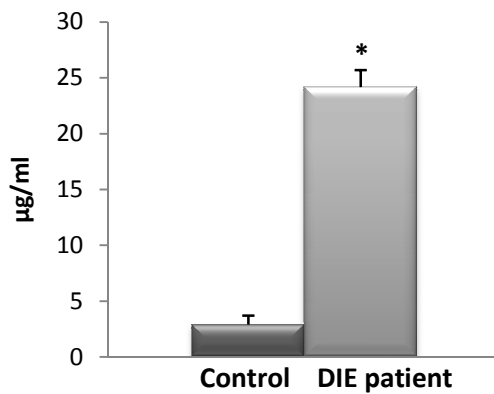


Figure 5-IL6



### REFERENCES

1. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004;364:1789-99.
2. Berkley KJ, Rapkin AJ, Papka RE. The pains of endometriosis. *Science* 2005;308:1587-9.
3. Chapron C, Bourret A, Chopin N, et al. Surgery for bladder endometriosis: long-term results and concomitant management of associated posterior deep lesions. *Hum Reprod* 2010;25:884-9.
4. Chapron C, Fauconnier A, Dubuisson JB, Barakat H, Vieira M, Breart G. Deep infiltrating endometriosis: relation between severity of dysmenorrhoea and extent of disease. *Hum Reprod* 2003;18:760-6.
5. Koninckx PR, Meuleman C, Demeyere S, Lesaffre E, Cornillie FJ. Suggestive evidence that pelvic endometriosis is a progressive disease, whereas deeply infiltrating endometriosis is associated with pelvic pain. *Fertil Steril* 1991;55:759-65.
6. Laursen BS, Bajaj P, Olesen AS, Delmar C, Arendt-Nielsen L. Health related quality of life and quantitative pain measurement in females with chronic non-malignant pain. *Eur J Pain* 2005;9:267-75.
7. Healy DL, Rogers PA, Hii L, Wingfield M. Angiogenesis: a new theory for endometriosis. *Hum Reprod Update* 1998;4:736-40.
8. Gazvani R, Templeton A. Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reproduction* 2002;123:217-26.
9. Vinatier D, Dufour P, Oosterlynck D. Immunological aspects of endometriosis. *Hum Reprod Update* 1996;2:371-84.
10. Leconte M, Nicco C, Ngo C, et al. Antiproliferative effects of cannabinoid agonists on deep infiltrating endometriosis. *Am J Pathol* 2010;177:2963-70.
11. Leconte M, Nicco C, Ngo C, et al. The mTOR/AKT inhibitor temsirolimus prevents deep infiltrating endometriosis in mice. *Am J Pathol* 2011;179:880-9.
12. Ngo C, Nicco C, Leconte M, et al. Protein kinase inhibitors can control the progression of endometriosis in vitro and in vivo. *J Pathol* 2010;222:148-57.
13. Ruiz A, Salvo VA, Ruiz LA, Baez P, Garcia M, Flores I. Basal and steroid hormone-regulated expression of CXCR4 in human endometrium and endometriosis. *Reprod Sci* 2010;17:894-903.
14. Foussat A, Balabanian K, Amara A, et al. Production of stromal cell-derived factor 1 by mesothelial cells and effects of this chemokine on peritoneal B lymphocytes. *Eur J Immunol* 2001;31:350-9.
15. Dousset B, Leconte M, Borghese B, et al. Complete surgery for low rectal endometriosis: long-term results of a 100-case prospective study. *Ann Surg*;251:887-95.
16. Song JS, Kang CM, Yoo MB, et al. Nitric oxide induces MUC5AC mucin in respiratory epithelial cells through PKC and ERK dependent pathways. *Respir Res* 2007;8:28.
17. Bartosik D, Jacobs SL, Kelly LJ. Endometrial tissue in peritoneal fluid. *Fertil Steril* 1986;46:796-800.
18. Alexandre J, Nicco C, Chereau C, et al. Improvement of the therapeutic index of anticancer drugs by the superoxide dismutase mimic mangafodipir. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:236-44.
19. Sugawara J, Fukaya T, Murakami T, Yoshida H, Yajima A. Increased secretion of hepatocyte growth factor by eutopic endometrial stromal cells in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1997;68:468-72.
20. Laird SM, Widdowson R, El-Sheikhi M, Hall AJ, Li TC. Expression of CXCL12 and CXCR4 in human endometrium; effects of CXCL12 on MMP production by human endometrial cells. *Hum Reprod* 2011;26:1144-52.
21. Kukreja P, Abdel-Mageed AB, Mondal D, Liu K, Agrawal KC. Up-regulation of CXCR4 expression in PC-3 cells by stromal-derived factor-1alpha (CXCL12) increases endothelial adhesion and transendothelial migration: role of MEK/ERK signaling pathway-dependent NF-kappaB activation. *Cancer Res* 2005;65:9891-8.



## Rôle de l'interaction CXCL12-CXCR4 dans l'endométriose profonde

22. Yu T, Wu Y, Helman JI, Wen Y, Wang C, Li L. CXCR4 promotes oral squamous cell carcinoma migration and invasion through inducing expression of MMP-9 and MMP-13 via the ERK signaling pathway. *Mol Cancer Res* 2011;9:161-72.
23. Sun X, Wei L, Chen Q, Terek RM. CXCR4/SDF1 mediate hypoxia induced chondrosarcoma cell invasion through ERK signaling and increased MMP1 expression. *Mol Cancer* 2010;9:17.
24. Dousset B, Leconte M, Borghese B, et al. Complete surgery for low rectal endometriosis: long-term results of a 100-case prospective study. *Ann Surg* 2010;251:887-95.
25. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 2004;4:540-50.
26. Burger M, Glodek A, Hartmann T, et al. Functional expression of CXCR4 (CD184) on small-cell lung cancer cells mediates migration, integrin activation, and adhesion to stromal cells. *Oncogene* 2003;22:8093-101.
27. Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, Ino K, Nawa A, Kikkawa F. Involvement of SDF-1alpha/CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 2008;122:91-9.
28. Kim J, Takeuchi H, Lam ST, et al. Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival. *J Clin Oncol* 2005;23:2744-53.
29. Kucia M, Jankowski K, Reza R, et al. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J Mol Histol* 2004;35:233-45.
30. Hansen IB, Ellingsen T, Hornung N, Poulsen JH, Lottenburger T, Stengaard-Pedersen K. Plasma level of CXC-chemokine CXCL12 is increased in rheumatoid arthritis and is independent of disease activity and methotrexate treatment. *J Rheumatol* 2006;33:1754-9.
31. Dotan I, Werner L, Vigodman S, et al. CXCL12 is a constitutive and inflammatory chemokine in the intestinal immune system. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:583-92.
32. Jiang HW, Ling JQ, Gong QM. The expression of stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) in inflamed human dental pulp. *J Endod* 2008;34:1351-4.
33. Boutten A, Dehoux M, Edelman P, et al. IL6 and acute phase plasma proteins in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Clin Chim Acta* 1992;210:187-95.
34. Muller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001;410:50-6.

## Analyse

L'objectif de ce travail était de mettre en évidence le recrutement des cellules endométriales dans la cavité péritonéale des femmes endométriosiques par l'intermédiaire de l'interaction du couple CXCR4-CXCL12 connu pour être impliqué dans le recrutement des cellules tumorales métastatiques<sup>447</sup>. Il a déjà été montré que le récepteur de la chimiokine CXCL12, CXCR4, était exprimé dans l'endomètre de femmes saines<sup>448</sup> et surexprimé dans les lésions endométriosiques<sup>449</sup>.

Nos expériences montrent une surexpression du récepteur CXCR4 par les cellules d'endomètre eutopique des femmes endométriosiques par rapport aux cellules d'endomètre sain. La surexpression de CXCR4 pourrait être en rapport avec le phénotype activé des cellules endométriosiques profondes tel que nous l'avons démontré dans les travaux présentés précédemment<sup>481</sup>. Cette hypothèse est renforcée par le fait que, dans le cancer, il a été montré que l'activation de CXCR4 pouvait être en rapport avec une activation de la voie ERK<sup>450, 486-487</sup>. En outre, la

## Rôle de l'interaction CXCL12-CXCR4 dans l'endométriose profonde

voie ERK est impliquée dans la motilité cellulaire par le biais de l'activation de métalloprotéases matricielles <sup>486</sup>.

Nous montrons par ailleurs une production accrue de la chimiokine CXCL12 dans le liquide péritonéal des femmes endométriosiques. Nous pourrions l'expliquer par l'inflammation locale connue de la cavité péritonéale des femmes endométriosique, et que nous confirmons par une augmentation de l'interleukine IL6 dans le liquide péritonéal de nos patientes. En effet, une surexpression de CXCL12 est couramment observée lors des phénomènes inflammatoires <sup>491, 495</sup>.

Enfin, nous montrons pour la première fois l'attraction spécifique des cellules d'endomètre eutopique surexprimant le CXCR4 par le CXCL12 présent en quantité accrue dans le liquide péritonéal chez les femmes porteuses d'une endométriose profonde. Ce mécanisme accrédite la théorie physiopathologique du reflux menstruel décrite par Sampson. En outre, ces données permettent d'envisager la voie CXCL12-CXCR4 comme une nouvelle perspective pour le traitement de l'endométriose profonde. Un inhibiteur de CXCR4, le plérixafor, utilisé dans l'auto-greffe de moelle dans les lymphomes non-hodgkiniens et les myélomes multiples est commercialisée en France depuis 2010.

- CXCR4 est surexprimé par les cellules d'endomètre eutopique des femmes porteuses d'endométriose profonde
- CXCL12 est surexprimé dans le liquide péritonéal des femmes porteuses d'endométriose profonde
- Il existe une attraction spécifique des cellules d'endomètre eutopique surexprimant le CXCR4 par le CXCL12 présent en quantité accrue dans le liquide péritonéal des femmes porteuses d'endométriose profonde
- L'axe CXCL12-CXCR4 peut être envisagé comme nouvelle perspective dans le traitement de l'endométriose profonde

## **CHAPITRE III PERSPECTIVES**

## Perspectives fondamentales

L'ensemble de ces travaux mettent en relief de multiples possibilités thérapeutiques non hormonales pour le traitement de l'endométriose. Nous montrons une prolifération cellulaire accrue au sein de l'endomètre eutopique et de manière amplifiée au niveau du nodule endométriosique profond chez les malades endométriosiques. Ce phénotype hyperprolifératif est en rapport avec une dérégulation de plusieurs voies métaboliques: augmentation du stress oxydant endogène, activation de la voie ERK et activation de la voie PI3K-AKT-mTOR. Ainsi, nous avons testé des molécules agissant sur chacune de ces voies *in vitro* et pour certaines d'entre elles *in vivo*. Nous avons également montré que la voie CXCL12-CXCR4 était impliquée dans le recrutement des cellules endométriales dans la cavité péritonéale. Cet aspect mériterait d'être approfondi, en particulier en testant des inhibiteurs de CXCR4 comme le plérixafort, qui est aujourd'hui utilisé dans l'auto-greffe de moelle dans les lymphomes non-hodgkiniens et les myélomes multiples.

Grâce à la collaboration des services de chirurgie gynécologique du Professeur Chapron, de chirurgie digestive du Professeur Dousset et du laboratoire d'immunologie du Professeur Batteux, nous possédons une banque de tissus humains endométriosiques unique en France qui permet de mener de front plusieurs travaux de recherches sur l'endométriose. En ce qui concerne l'endométriose profonde avec atteinte rectale, nous opérons une cinquantaine de malades par an. Chacune de ces malades fait l'objet de biopsies d'endomètre eutopique, de nodule profond et de liquide péritonéal.

L'un des projets à venir est d'explorer le versant pro-angiogénique de la maladie qui a été montré par de nombreux travaux<sup>62-63</sup>. Ainsi, nous aimerions tester le **sorafenib** (Nexavar®) qui a la double spécificité d'être un inhibiteur de Raf<sup>266-267</sup> et un anti-angiogénique. Il est utilisé dans le traitement du cancer du rein métastatique<sup>268-269</sup> et dans le carcinome hépatocellulaire localement avancé<sup>270</sup>. Ses activités antiprolifératives, anti-VEGF et anti-PDGF seraient évaluées sur les cellules endométriosiques profondes et sur un modèle animal murin.

## Perspectives cliniques

### Proposition d'un essai clinique

Parmi les molécules que nous avons testées dans nos différents travaux, un inhibiteur sélectif de la protéine mTOR, le temsirolimus, a montré un effet antiprolifératif sur les cellules endométriosiques profondes confirmé *in vivo* sur un modèle animal de souris immuno-déficientes.

Ces données encourageantes nous conduisent à proposer un essai clinique afin de tester cette molécule chez les femmes endométriosiques.

Le temsirolimus métabolisé en sirolimus après un premier passage hépatique, existe uniquement sous la forme d'un soluté destiné à la voie veineuse. Le sirolimus (rapamycine), en revanche, couramment utilisé dans la prévention du rejet de greffe en transplantation rénale, existe sous une forme administrable par voie orale. Pour les patientes porteuses d'une endométriose qui représentent une population de femmes jeunes en bon état général, il nous a paru plus adapté de tester un traitement par voie orale plutôt que par une voie veineuse qui alourdirait la prise en charge.

Le sirolimus est une substance naturelle (lactone) macrocyclique produite par la bactérie *Streptomyces hygroscopicus*. Il forme un complexe avec l'immunophiline FKBP12 qui inhibe spécifiquement l'activité kinase de mTOR en se liant à son domaine catalytique FRB. Il s'agit d'un antibiotique étudié initialement pour ses propriétés antifongiques, puis pour ses propriétés immunosuppressives. Ses caractéristiques antiprolifératives et pro-apoptotiques ont secondairement été mises en évidence sur les cellules tumorales<sup>496</sup>. Ainsi, les rapalogues (analogues de la rapamycine), dont le temsirolimus fait parti, ont été développés alors que le sirolimus lui-même n'est pas utilisé dans le domaine de la cancérologie. Ils possèdent une activité anti-angiogéniques qui a été confirmée par de nombreux travaux<sup>497-499</sup>. Ces molécules sont relativement bien tolérées et utilisées dans la pratique courante dans le traitement des cancers du rein métastatiques<sup>500-501</sup>.

Par analogie avec une étude de phase II évaluant l'utilisation du sirolimus dans le CHC sur cirrhose<sup>502</sup>, nous avons choisi un schéma d'administration orale de 20 mg en une prise hebdomadaire (soit 10 comprimés de 2 mg) suivi de 30 mg une prise hebdomadaire après un mois de traitement en cas de bonne tolérance. Le rythme hebdomadaire se justifie par une longue demi-vie de la molécule et la posologie est basée sur l'évaluation du rapport bénéfice risque évalué par des études de phase I<sup>339, 503</sup>. Ses effets secondaires principaux sont un **retard à la cicatrisation** du fait de ses propriétés immunosuppressives ainsi que des réactions d'**hypersensibilité** rares mais graves (**annexe 1**).

Le bénéfice attendu du traitement serait de diminuer les douleurs endométriosiques dont l'intensité est en rapport avec l'extension des lésions par réduction du volume lésionnel afin d'éviter une chirurgie ou de permettre une chirurgie moins extensive donc moins morbide.

## Schéma de l'étude

Le schéma de l'étude est représenté **annexe 2**.

Nous proposons une étude prospective monocentrique avec bénéfice individuel direct. Son objectif principal serait **d'évaluer l'efficacité du sirolimus sur les douleurs pelviennes endométriosiques profondes par le biais de son activité antiproliférative**. Les objectifs secondaires seraient (1) de déterminer si le sirolimus diminue le volume et le nombre de sites atteints par l'endométriose profonde, (2) de déterminer si le sirolimus diminue le volume de l'atteinte endométriosique annexielle, (3) d'évaluer l'effet du sirolimus sur la prolifération des cellules endométriosiques eutopiques et ectopiques ex vivo et (4) d'évaluer l'effet du sirolimus sur la voie mTOR-AKT des cellules endométriosiques eutopiques et ectopiques ex vivo.

Les patientes éligibles de plus de 18 ans seraient porteuse d'une endométriose pelvienne profonde avec atteinte rectale sous-douglassienne diagnostiquée par au moins deux examens d'imagerie concordants (parmi une échographie pelvienne endo-vaginale, une IRM pelvienne et une échographie endorectale), symptomatiques après échec du traitement hormonal, et donc **candidates à un traitement chirurgical**. La présence d'une atteinte ovarienne ou non, d'un projet de grossesse à moyen terme ou non et d'une infertilité ou non ne constitueraient pas de critères d'exclusion. Une contre-indication au sirolimus selon le Résumé des Caractéristiques du Produit, une grossesse ou le refus d'une contraception efficace et une infection non contrôlée seraient des critères de non éligibilité. Les patientes sans couverture sociale ou risquant de ne pas adhérer aux exigences de l'étude pour des raisons, sociales, psychologiques ou géographiques ne seraient pas incluses.

Le traitement associerait du **sirolimus (Rapamune®; Wyeth Pharmaceuticals France)** à la posologie de 20 mg/semaine pendant 4 semaines puis de 30 mg/semaine pendant 8 semaines en cas de bonne tolérance de la **triptoréline (DECAPEPTYL® Lp 11,25 mg ; Ipsen Pharma)** 1 injection par voie intra-musculaire une semaine avant le début du traitement par sirolimus puis à 3 et à 6 mois. Le **traitement chirurgical** serait réalisé 6 semaines après l'arrêt du sirolimus.

Un bilan biologique complet (NFS-plaquettes, transaminases, phosphatases alcalines,  $\gamma$ -glutamyl transférase et bilirubine totale, cholestérol, triglycérides) serait réalisé dans la semaine précédant la première administration du traitement de l'étude. Un test de grossesse serait réalisé en cas de doute. Les patientes prendraient leur traitement à domicile. Elles auraient un bilan biologique comportant NFS-plaquettes avant chaque nouvelle administration du traitement. Des polynucléaires neutrophiles  $\leq 1.0 \times 10^9/L$  et des plaquettes  $\leq 75 \times 10^9/L$  conduiraient à repousser le traitement d'une voire deux semaines jusqu'à récupération de ces valeurs. Si la récupération ne survenait pas au bout de deux semaines, la patiente serait sortie de l'étude. Un bilan comportant un dosage du cholestérol

et des triglycérides serait effectué une fois par mois. Les patientes seraient vues en consultation une fois par mois. Les examens complémentaires seraient réalisés à Cochin.

Le nombre de patientes à inclure serait déterminé selon un schéma de Gehan simplifié. Si aucune réponse objective n'était observée parmi les 9 premières patientes incluses, la probabilité que le taux de réponse soit  $\geq 30\%$  serait  $< 0.05$  et les inclusions seraient interrompues. Si au moins une réponse objective était observée chez les 9 premières patientes évaluable, 16 patientes supplémentaires seraient incluses afin de préciser l'intervalle de confiance. Entre 9 à 25 patientes évaluable pour la réponse sur les douleurs pelviennes endométriosiques seraient donc incluses.

Cette étude cherchant à valider une hypothèse, l'analyse sur les patientes évaluable est plus appropriée que l'analyse en intention de traiter. En conséquence, si une ou plusieurs patientes ne pouvaient pas être évaluée, quelle qu'en soit la raison, elles seraient remplacées pour avoir le nombre requis de patientes.

Les douleurs pelviennes endométriosiques seraient évaluées par un questionnaire validé en français, l'**EHP-5 (annexe 3)**, effectué avant et après le traitement par le sirolimus. Le volume, le nombre, les sites et l'aspect de l'atteinte endométriosique profonde ainsi que l'atteinte annexielle seraient évalués au moment de l'inclusion et au terme des 3 mois de traitement par une **IRM pelvienne**. La prolifération cellulaire et l'activité de la voie mTOR-AKT seraient évaluées ex vivo sur une biopsie d'endomètre eutopique réalisée au moment de l'inclusion en consultation et au terme des 3 mois de traitement au cours du traitement chirurgical sur une biopsie d'endomètre eutopique et sur une biopsie du nodule endométriosique profond.

## Annexe 1

D'après la monographie de © WYETH  
Révisée le 28 Octobre 2008

## RAPAMUNE®

sirolimus

### Indication

Le sirolimus est indiqué en prévention du rejet d'organe chez les patients adultes présentant un risque immunologique faible à modéré recevant une transplantation rénale.

### Pharmacocinétique

#### Absorption

Après administration de la solution orale Rapamune, le sirolimus est rapidement absorbé. Le délai d'atteinte de la concentration maximale est de une heure chez les sujets sains.

#### Distribution

Le sirolimus se lie principalement à l'albumine sérique (97 %), à l' $\alpha$ 1-glycoprotéine acide ainsi qu'aux lipoprotéines.

#### Métabolisme

Le sirolimus sert de substrat au cytochrome P450 IIIA4 (CYP3A4) et à la P-glycoprotéine. Il est principalement métabolisé par O-déméthylation, par hydroxylation ou par les deux mécanismes. Sept métabolites principaux se retrouvent dans le sang entier. Certains de ces métabolites peuvent être détectés dans des échantillons de plasma, de selles et d'urine. Les inhibiteurs de mTOR sont métabolisés par les cytochromes P450 3A4 et 5 et leur élimination est mixte biliaire et urinaire.

#### Élimination

Le sirolimus est essentiellement éliminé dans les selles.

### Posologie et mode d'administration

Le sirolimus est réservé à la **voie orale**.

**Posologie usuelle** (dans la prévention du rejet d'organe): 6 mg/j en dose de charge puis 2mg/j. La posologie doit ensuite être adaptée individuellement afin d'obtenir des concentrations résiduelles dans le sang total comprises entre 4 et 12 ng/ml (dosage chromatographique).

### Coût du traitement

- 4,15 €/mg (cp à 2mg)
- **20 mg /semaine pendant 4 semaines puis 30 mg/semaine pendant 8 semaines** par malade :  
124,5 x 12 : 1 358 € par malade
- Etude 9 à 25 malades : 11 952 à 33 950 €

### Contre-indications

Hypersensibilité à la substance active ou à l'un des excipients.

### Mises en garde et précautions d'emploi

- Il existe un risque de surdosage chez les patients présentant une **insuffisance hépatique**. Les concentrations résiduelles de sirolimus dans le sang total doivent être étroitement surveillées.
- Il n'y a pas d'influence de la **fonction rénale** sur la pharmacocinétique du sirolimus.
- Le sirolimus est métabolisé par l'isoenzyme **CYP3A4** au niveau de la paroi intestinale et dans le foie. Les puissants inhibiteurs du CYP3A4 (kétoconazole, voriconazole, itraconazole, télithromycine ou clarithromycine) réduisent le métabolisme du sirolimus et augmentent sa



concentration sanguine tandis que les puissants inducteurs du CYP3A4 (rifampicine, rifabutine) augmentent le métabolisme du sirolimus et réduisent sa concentration sanguine. La co-administration du sirolimus et d'inhibiteurs ou inducteurs puissants du CYP3A4 n'est pas recommandée. Le jus de pamplemousse modifie le métabolisme impliquant le CYP3A4 et doit donc être évité.

- **Une augmentation de la sensibilité aux infections** (herpès des muqueuses) liée aux propriétés immunosuppressives de la maladie est observée.
- **Un défaut ou retard de cicatrisation de plaies** ont été rapportés avec un risque de désunion des plaies, de fistule anastomotique, d'éviscération et de lymphocèle. Il est lié à une inhibition de la production de certains facteurs de croissance susceptibles d'influencer l'angiogénèse, la prolifération des fibroblastes et la perméabilité vasculaire.
- Le développement de **lymphomes** ou autres cancers, en particulier cutanés, a été rapporté.
- **Des réactions d'hypersensibilité graves** telles que des réactions anaphylactiques ou anaphylactoïdes, un angio-oedème, une dermatite exfoliative ou une vascularite d'hypersensibilité sont rarement observées.
- L'apparition d'une **leucopénie** au cours du traitement peut être directement liée au sirolimus ou à une infection virale. En cas de leucopénie, la dose de sirolimus devra être diminuée.
- Le sirolimus peut engendrer une **hypercholestérolémie** et une **hypertriglycémie**.

### Grossesse

Il n'existe pas de données suffisamment pertinentes concernant l'utilisation de sirolimus chez la femme enceinte. Des études effectuées chez l'animal ont mis en évidence une toxicité embryonnaire et fœtale. Le risque potentiel en clinique n'est pas connu. Le sirolimus ne doit donc pas être utilisé lors de la grossesse à moins d'une nécessité absolue. **Une contraception efficace doit être utilisée au cours du traitement et pendant 12 semaines après l'arrêt de ce traitement.**

Les effets indésirables très fréquents (observés chez 10 % des patients ou plus) incluent :

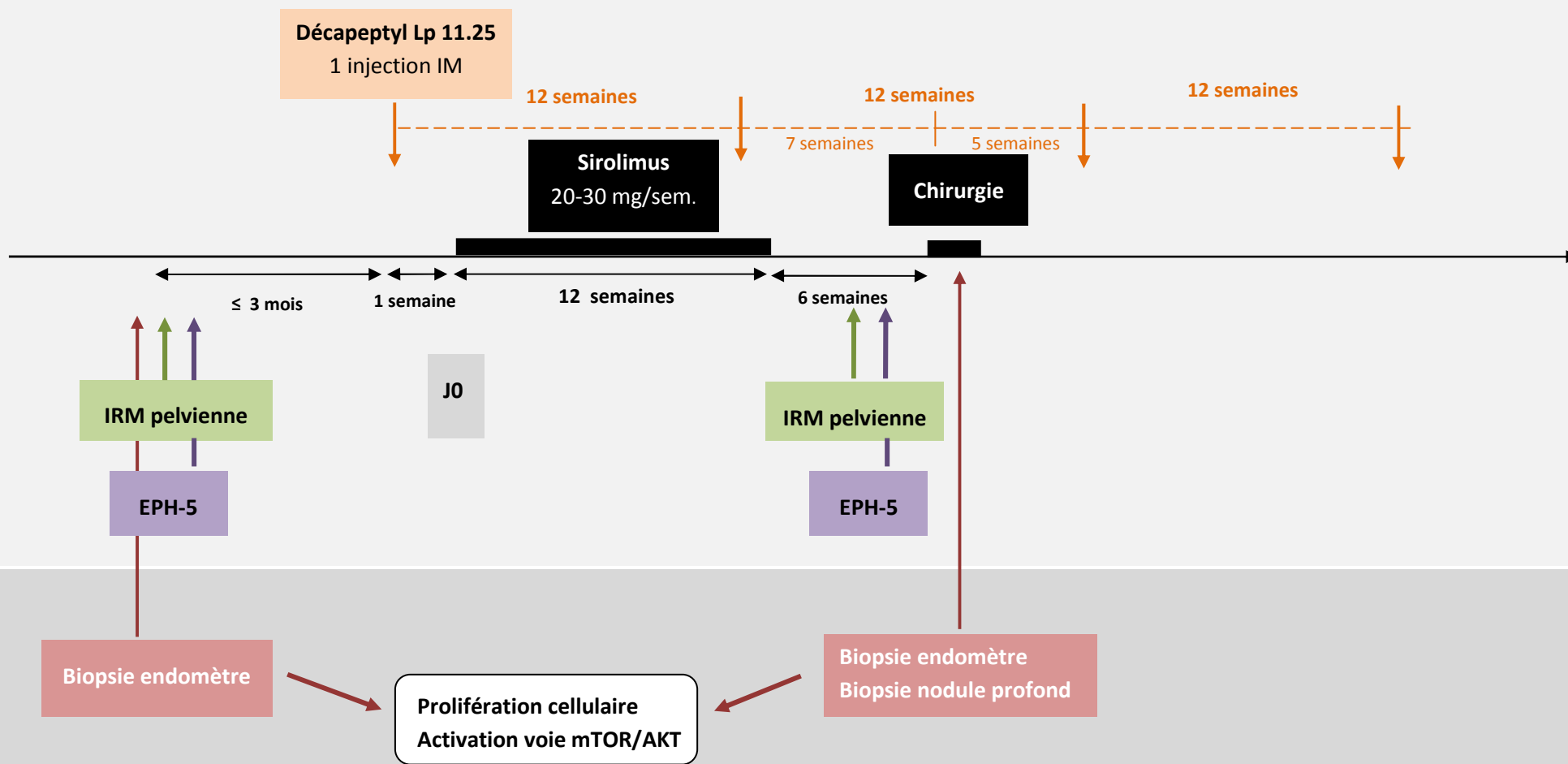
- Anomalie de la cicatrisation
- Troubles de la vision
- Acné
- Constipation
- Diarrhée
- Maux de tête
- Insomnie
- Douleurs aux articulations, aux os ou au dos
- Nausées ou dérangements d'estomac
- Maux de ventre
- Enflure des mains, des pieds, des chevilles ou de la partie inférieure des jambes
- Tremblements
- Infection des voies urinaires
- Faiblesse

Les effets indésirables fréquents (observés chez 1 % à 9 % des patients) incluent :

- Saignement ou apparition de bleus anormaux
- Symptômes ressemblant à ceux du rhume ou de la grippe (infection pulmonaire)
- Étourdissements au passage à la station debout
- Sentiment d'anxiété
- Fièvre ou frissons
- Accélération du rythme cardiaque ou palpitations cardiaques
- Infection rénale
- Douleurs aux jambes ou aux muscles
- Ulcère de la bouche ou herpès labial (feu sauvage)
- Saignement de nez
- Éruption
- Essoufflement
- Cancer de la peau
- Cicatrisation lente de plaies opératoires

Les effets indésirables peu fréquents ou rares (observés chez moins de 1 % des patients) incluent :

- Mélanome (forme de cancer de la peau)
- Pancréatite (inflammation du pancréas)
- Réaction allergique grave, cutanée ou autre



Annexe 3

## Adaptation linguistique de l'endometriosis health profile 5 : EHP 5

*Linguistic adaptation of the endometriosis health profile 5: EHP 5*

F. Renouvel<sup>a,\*</sup>, A. Fauconnier<sup>b</sup>, H. Pilkington<sup>c</sup>, P. Panel<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Service de gynécologie-obstétrique, hôpital André-Mignot, 177, rue de Versailles, 78157 Le-Chesnay, France

<sup>b</sup> Service de gynécologie-obstétrique, hôpital de Poissy-Saint-Germain-en-Laye, 10, rue du Champ-Gaillard, 78300 Poissy, France

<sup>c</sup> Unité Inserm 953, université Paris-VIII, France

Reçu le 3 février 2009 ; avis du comité de lecture le 14 mai 2009 ; définitivement accepté le 25 mai 2009

Disponible sur Internet le 8 juillet 2009

Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction (2009) 38, 404–410

### PARTIE 1

	Jamais	Rarement	Parfois	Souvent	Toujours
Avez-vous éprouvé des difficultés à marcher à cause des douleurs ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Avez-vous eu l'impression que vos symptômes réglaient votre vie ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Avez-vous eu des changements d'humeur ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Avez-vous eu l'impression que les autres ne comprenaient pas ce que vous enduriez ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Avez-vous eu l'impression que votre apparence avait changée ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

### PARTIE 2

	Jamais	Rarement	Parfois	Souvent	Toujours
Avez-vous été incapable d'assurer des obligations professionnelles à cause des douleurs ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Avez-vous trouvé difficile de vous occuper de votre (vos) enfant(s) ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vous êtes vous sentie inquiète à l'idée d'avoir des rapports à cause de la douleur ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Avez-vous eu le sentiment que les médecins pensaient que c'était dans votre tête ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Avez-vous été déçue parce que le traitement ne marchait pas ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vous êtes vous sentie déprimée face à l'éventualité de ne pas avoir d'enfants ou d'autres enfants ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004;364:1789-99.
2. Simoens S, Hummelshoj L, D'Hooghe T. Endometriosis: cost estimates and methodological perspective. *Hum Reprod Update* 2007;13:395-404.
3. Fedele L, Somigliana E, Frontino G, Benaglia L, Vigano P. New drugs in development for the treatment of endometriosis. *Expert Opin Investig Drugs* 2008;17:1187-202.
4. Ngo C, Chereau C, Nicco C, Weill B, Chapron C, Batteux F. Reactive oxygen species controls endometriosis progression. *Am J Pathol* 2009;175:225-34.
5. Bulun SE. Endometriosis. *N Engl J Med* 2009;360:268-79.
6. Chapron C, Bourret A, Chopin N, et al. Surgery for bladder endometriosis: long-term results and concomitant management of associated posterior deep lesions. *Hum Reprod* 2010;25:884-9.
7. Chapron C, Liaras E, Fayet P, et al. Magnetic resonance imaging and endometriosis: deeply infiltrating endometriosis does not originate from the rectovaginal septum. *Gynecol Obstet Invest* 2002;53:204-8.
8. Chapron C, Fauconnier A, Vieira M, et al. Anatomical distribution of deeply infiltrating endometriosis: surgical implications and proposition for a classification. *Hum Reprod* 2003;18:157-61.
9. Chapron C, Pietin-Vialle C, Borghese B, Davy C, Foulot H, Chopin N. Associated ovarian endometriomas is a marker for greater severity of deeply infiltrating endometriosis. *Fertil Steril* 2008.
10. Somigliana E, Infantino M, Candiani M, Vignali M, Chiodini A, Busacca M. Association rate between deep peritoneal endometriosis and other forms of the disease: pathogenetic implications. *Hum Reprod* 2004;19:168-71.
11. Somigliana E, Vercellini P, Gattei U, Chopin N, Chiodo I, Chapron C. Bladder endometriosis: getting closer and closer to the unifying metastatic hypothesis. *Fertil Steril* 2007;87:1287-90.
12. Chapron C, Boucher E, Fauconnier A, Vieira M, Dubuisson JB, Vacher-Lavenu MC. Anatomopathological lesions of bladder endometriosis are heterogeneous. *Fertil Steril* 2002;78:740-2.
13. Clement PB. The pathology of endometriosis: a survey of the many faces of a common disease emphasizing diagnostic pitfalls and unusual and newly appreciated aspects. *Adv Anat Pathol* 2007;14:241-60.
14. Bonte H, Chapron C, Vieira M, et al. Histologic appearance of endometriosis infiltrating uterosacral ligaments in women with painful symptoms. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 2002;9:519-24.
15. Anaf V, El Nakadi I, De Moor V, Chapron C, Pistofidis G, Noel JC. Increased nerve density in deep infiltrating endometriotic nodules. *Gynecol Obstet Invest* 2011;71:112-7.
16. Ozkan S, Murk W, Arici A. Endometriosis and infertility: epidemiology and evidence-based treatments. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1127:92-100.
17. Missmer SA, Cramer DW. The epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2003;30:1-19, vii.

18. Sangi-Haghpeykar H, Poindexter AN, 3rd. Epidemiology of endometriosis among parous women. *Obstet Gynecol* 1995;85:983-92.
19. Cramer DW, Wilson E, Stillman RJ, et al. The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking, and exercise. *JAMA* 1986;255:1904-8.
20. Signorello LB, Harlow BL, Cramer DW, Spiegelman D, Hill JA. Epidemiologic determinants of endometriosis: a hospital-based case-control study. *Ann Epidemiol* 1997;7:267-741.
21. Chapron C, Jacob S, Dubuisson JB, Vieira M, Liaras E, Fauconnier A. Laparoscopically assisted vaginal management of deep endometriosis infiltrating the rectovaginal septum. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001;80:349-54.
22. Prevalence and anatomical distribution of endometriosis in women with selected gynaecological conditions: results from a multicentric Italian study. Gruppo italiano per lo studio dell'endometriosi. *Hum Reprod* 1994;9:1158-62.
23. Risk factors for pelvic endometriosis in women with pelvic pain or infertility. Gruppo Italiano per lo Studio dell' endometriosi. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;83:195-9.
24. Candiani GB, Danesino V, Gastaldi A, Parazzini F, Ferraroni M. Reproductive and menstrual factors and risk of peritoneal and ovarian endometriosis. *Fertil Steril* 1991;56:230-4.
25. Darrow SL, Vena JE, Batt RE, Zielesny MA, Michalek AM, Selman S. Menstrual cycle characteristics and the risk of endometriosis. *Epidemiology* 1993;4:135-42.
26. Chapron C, Souza C, de Ziegler D, et al. Smoking habits of 411 women with histologically proven endometriosis and 567 unaffected women. *Fertil Steril* 2010;94:2353-5.
27. Collin GR, Russell JC. Endometriosis of the colon. Its diagnosis and management. *Am Surg* 1990;56:275-9.
28. Coronado C, Franklin RR, Lotze EC, Bailey HR, Valdes CT. Surgical treatment of symptomatic colorectal endometriosis. *Fertil Steril* 1990;53:411-6.
29. Chapron C, Fauconnier A, Dubuisson JB, Barakat H, Vieira M, Breart G. Deep infiltrating endometriosis: relation between severity of dysmenorrhoea and extent of disease. *Hum Reprod* 2003;18:760-6.
30. Bergqvist A. Extragenital endometriosis. A review. *Eur J Surg* 1992;158:7-12.
31. Berkley KJ, Rapkin AJ, Papka RE. The pains of endometriosis. *Science* 2005;308:1587-9.
32. de Ziegler D, Borghese B, Chapron C. Endometriosis and infertility: pathophysiology and management. *Lancet* 2010;376:730-8.
33. Fauconnier A, Chapron C, Dubuisson JB, Vieira M, Dousset B, Breart G. Relation between pain symptoms and the anatomic location of deep infiltrating endometriosis. *Fertil Steril* 2002;78:719-26.
34. Koninckx PR, Meuleman C, Demeyere S, Lesaffre E, Cornillie FJ. Suggestive evidence that pelvic endometriosis is a progressive disease, whereas deeply infiltrating endometriosis is associated with pelvic pain. *Fertil Steril* 1991;55:759-65.
35. Weed JC, Ray JE. Endometriosis of the bowel. *Obstet Gynecol* 1987;69:727-30.
36. Arruda MS, Petta CA, Abrao MS, Benetti-Pinto CL. Time elapsed from onset of symptoms to diagnosis of endometriosis in a cohort study of Brazilian women. *Hum Reprod* 2003;18:756-9.
37. Hadfield R, Mardon H, Barlow D, Kennedy S. Delay in the diagnosis of endometriosis: a survey of women from the USA and the UK. *Hum Reprod* 1996;11:878-80.

38. Chapron C, Pietin-Vialle C, Borghese B, Davy C, Foulot H, Chopin N. Associated ovarian endometrioma is a marker for greater severity of deeply infiltrating endometriosis. *Fertil Steril* 2009;92:453-7.
39. Kistner R. Management of endometriosis in the infertile patient. *Fertil Steril* 1975;26:1151-66.
40. Koninckx PR, Meuleman C, Oosterlynck D, Cornillie FJ. Diagnosis of deep endometriosis by clinical examination during menstruation and plasma CA-125 concentration. *Fertil Steril* 1996;65:280-7.
41. Counsellor V. Endometriosis: a clinical and surgical review. *Am J Obstet Gynecol* 1938;36:877-88.
42. Sampson J. Peritoneal endometriosis due to premenstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927;14:422-69.
43. Bricou A, Batt RE, Chapron C. Peritoneal fluid flow influences anatomical distribution of endometriotic lesions: why Sampson seems to be right. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008;138:127-34.
44. Meyers MA. Distribution of intra-abdominal malignant seeding: dependency on dynamics of flow of ascitic fluid. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1973;119:198-206.
45. Meyers NA. Peritoneography. Normal and pathologic anatomy. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1973;117:353-65.
46. Batt RE, Smith RA, Buck Louis GM, et al. Mullerianosis. *Histol Histopathol* 2007;22:1161-6.
47. Signorile PG, Baldi F, Bussani R, D'Armiento M, De Falco M, Baldi A. Ectopic endometrium in human foetuses is a common event and sustains the theory of mullerianosis in the pathogenesis of endometriosis, a disease that predisposes to cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2009;28:49.
48. Levander G, Normann P. The pathogenesis of endometriosis; an experimental study. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1955;34:366-98.
49. Merrill JA. Endometrial induction of endometriosis across Millipore filters. *Am J Obstet Gynecol* 1966;94:780-90.
50. Ramey JW, Archer DF. Peritoneal fluid: its relevance to the development of endometriosis. *Fertil Steril* 1993;60:1-14.
51. Noel JC, Chapron C, Fayt I, Anaf V. Lymph node involvement and lymphovascular invasion in deep infiltrating rectosigmoid endometriosis. *Fertil Steril* 2008;89:1069-72.
52. Sasson IE, Taylor HS. Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1127:106-15.
53. Du H, Taylor HS. Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis. *Stem Cells* 2007;25:2082-6.
54. Nair AS, Nair HB, Lucidi RS, et al. Modeling the early endometriotic lesion: mesothelium-endometrial cell co-culture increases endometrial invasion and alters mesothelial and endometrial gene transcription. *Fertil Steril* 2008;90:1487-95.
55. Osteen KG, Keller NR, Feltus FA, Melner MH. Paracrine regulation of matrix metalloproteinase expression in the normal human endometrium. *Gynecol Obstet Invest* 1999;48 Suppl 1:2-13.

56. Kokorine I, Nisolle M, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ, Marbaix E. Expression of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) is related to the activity of human endometriotic lesions. *Fertil Steril* 1997;68:246-51.
57. Koks CA, Demir Weusten AY, Groothuis PG, Dunselman GA, de Goeij AF, Evers JL. Menstruum induces changes in mesothelial cell morphology. *Gynecol Obstet Invest* 2000;50:13-8.
58. Selam B, Arici A. Implantation defect in endometriosis: endometrium or peritoneal fluid. *J Reprod Fertil Suppl* 2000;55:121-8.
59. Sillem M, Pifti S, Neher M, Runnebaum B. Extracellular matrix remodelling in the endometrium and its possible relevance to the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod Update* 1998;4:730-5.
60. Beliard A, Donnez J, Nisolle M, Foidart JM. Localization of laminin, fibronectin, E-cadherin, and integrins in endometrium and endometriosis. *Fertil Steril* 1997;67:266-72.
61. Somigliana E, Vigano P, Gaffuri B, Guarneri D, Busacca M, Vignali M. Human endometrial stromal cells as a source of soluble intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 molecules. *Hum Reprod* 1996;11:1190-4.
62. Laschke MW, Menger MD. In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update* 2007;13:331-42.
63. Taylor RN, Lebovic DI, Mueller MD. Angiogenic factors in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;955:89-100; discussion 18, 396-406.
64. Garcia-Velasco JA, Arici A. Apoptosis and the pathogenesis of endometriosis. *Semin Reprod Med* 2003;21:165-72.
65. Eyster KM, Klinkova O, Kennedy V, Hansen KA. Whole genome deoxyribonucleic acid microarray analysis of gene expression in ectopic versus eutopic endometrium. *Fertil Steril* 2007;88:1505-33.
66. Hornung D, Ryan IP, Chao VA, Vigne JL, Schriock ED, Taylor RN. Immunolocalization and regulation of the chemokine RANTES in human endometrial and endometriosis tissues and cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1621-8.
67. Osteen KG, Bruner KL, Sharpe-Timms KL. Steroid and growth factor regulation of matrix metalloproteinase expression and endometriosis. *Semin Reprod Endocrinol* 1996;14:247-55.
68. Tseng JF, Ryan IP, Milam TD, et al. Interleukin-6 secretion in vitro is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1118-22.
69. Wu Y, Kajdacsy-Balla A, Strawn E, et al. Transcriptional characterizations of differences between eutopic and ectopic endometrium. *Endocrinology* 2006;147:232-46.
70. Akoum A, Jolicoeur C, Boucher A. Estradiol amplifies interleukin-1-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression by ectopic endometrial cells of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:896-904.
71. Ulukus M, Ulukus EC, Seval Y, Zheng W, Arici A. Expression of interleukin-8 receptors in endometriosis. *Hum Reprod* 2005;20:794-801.
72. Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2001;75:1-10.



73. Jabbour HN, Sales KJ, Smith OP, Battersby S, Boddy SC. Prostaglandin receptors are mediators of vascular function in endometrial pathologies. *Mol Cell Endocrinol* 2006;252:191-200.
74. Santanam N, Murphy AA, Parthasarathy S. Macrophages, oxidation, and endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;955:183-98; discussion 19-200, 396-406.
75. Zeitoun K, Takayama K, Sasano H, et al. Deficient 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17beta-estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:4474-80.
76. Dmowski WP, Gebel HM, Rawlins RG. Immunologic aspects of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1989;16:93-103.
77. Osteen KG, Sierra-Rivera E. Does disruption of immune and endocrine systems by environmental toxins contribute to development of endometriosis? *Semin Reprod Endocrinol* 1997;15:301-8.
78. Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 1991;56:45-51.
79. Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Koninckx PR, Vandeputte M. Immunosuppressive activity of peritoneal fluid in women with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1993;82:206-12.
80. Sharpe-Timms KL, Zimmer RL, Ricke EA, Piva M, Horowitz GM. Endometriotic haptoglobin binds to peritoneal macrophages and alters their function in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2002;78:810-9.
81. Polak G, Koziol-Montewka M, Niedzwiadek J, Tarkowski R, Sidor-Wojtowicz A, Kotarski J. [Lipid peroxides, tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interferon gamma (IFN-gamma) in peritoneal fluid from infertile women with minimal and mild endometriosis]. *Ginekol Pol* 2001;72:422-6.
82. Lin YJ, Lai MD, Lei HY, Wing LY. Neutrophils and macrophages promote angiogenesis in the early stage of endometriosis in a mouse model. *Endocrinology* 2006;147:1278-86.
83. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Smith SK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod* 1996;11:220-3.
84. Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 1994;55:410-22.
85. Tran LV, Tokushige N, Berbic M, Markham R, Fraser IS. Macrophages and nerve fibres in peritoneal endometriosis. *Hum Reprod* 2009;24:835-41.
86. Punnonen J, Teisala K, Ranta H, Bennett B, Punnonen R. Increased levels of interleukin-6 and interleukin-10 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1522-6.
87. Harada T, Enatsu A, Mitsunari M, et al. Role of cytokines in progression of endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 1999;47 Suppl 1:34-9; discussion 9-40.
88. Iwabe T, Harada T, Tsudo T, et al. Tumor necrosis factor-alpha promotes proliferation of endometriotic stromal cells by inducing interleukin-8 gene and protein expression. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:824-9.
89. Velasco I, Rueda J, Acien P. Aromatase expression in endometriotic tissues and cell cultures of patients with endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2006;12:377-81.

90. Khan KN, Masuzaki H, Fujishita A, et al. Association of interleukin-6 and estradiol with hepatocyte growth factor in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002;81:764-71.
91. Khan KN, Masuzaki H, Fujishita A, Kitajima M, Sekine I, Ishimaru T. Higher activity by opaque endometriotic lesions than nonopaque lesions. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004;83:375-82.
92. Khan KN, Masuzaki H, Fujishita A, Kitajima M, Sekine I, Ishimaru T. Differential macrophage infiltration in early and advanced endometriosis and adjacent peritoneum. *Fertil Steril* 2004;81:652-61.
93. Hever A, Roth RB, Hevezi P, et al. Human endometriosis is associated with plasma cells and overexpression of B lymphocyte stimulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:12451-6.
94. Simpson JL, Elias S, Malinak LR, Buttram VC, Jr. Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. *Am J Obstet Gynecol* 1980;137:327-31.
95. Treloar SA, O'Connor DT, O'Connor VM, Martin NG. Genetic influences on endometriosis in an Australian twin sample. *sueT@qimr.edu.au. Fertil Steril* 1999;71:701-10.
96. Di W, Guo SW. The search for genetic variants predisposing women to endometriosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2007;19:395-401.
97. Thornton-Wells TA, Moore JH, Haines JL. Genetics, statistics and human disease: analytical retooling for complexity. *Trends Genet* 2004;20:640-7.
98. Montgomery GW, Nyholt DR, Zhao ZZ, et al. The search for genes contributing to endometriosis risk. *Hum Reprod Update* 2008;14:447-57.
99. Borghese B, Mondon F, Noel JC, et al. Gene expression profile for ectopic versus eutopic endometrium provides new insights into endometriosis oncogenic potential. *Mol Endocrinol* 2008;22:2557-62.
100. Borghese B, Santulli P, Hequet D, et al. Genetic polymorphisms of DNMT3L involved in hypermethylation of chromosomal ends are associated with greater risk of developing ovarian endometriosis. *Am J Pathol* 2012;180:1781-6.
101. Falconer H, Sundqvist J, Xu H, et al. Analysis of common variations in tumor-suppressor genes on chr1p36 among Caucasian women with endometriosis. *Gynecol Oncol* 2012.
102. Painter JN, Anderson CA, Nyholt DR, et al. Genome-wide association study identifies a locus at 7p15.2 associated with endometriosis. *Nat Genet* 2011;43:51-4.
103. Uno S, Zembutsu H, Hirasawa A, et al. A genome-wide association study identifies genetic variants in the CDKN2BAS locus associated with endometriosis in Japanese. *Nat Genet* 2010;42:707-10.
104. Rier S, Foster WG. Environmental dioxins and endometriosis. *Toxicol Sci* 2002;70:161-70.
105. Parazzini F, Chiaffarino F, Surace M, et al. Selected food intake and risk of endometriosis. *Hum Reprod* 2004;19:1755-9.
106. Gorbach SL, Goldin BR. Diet and the excretion and enterohepatic cycling of estrogens. *Prev Med* 1987;16:525-31.
107. Edwards TM, Myers JP. Environmental exposures and gene regulation in disease etiology. *Environ Health Perspect* 2007;115:1264-70.
108. Varma R, Rollason T, Gupta JK, Maher ER. Endometriosis and the neoplastic process. *Reproduction* 2004;127:293-304.

109. Somigliana E, Vigano P, Parazzini F, Stoppelli S, Giambattista E, Vercellini P. Association between endometriosis and cancer: a comprehensive review and a critical analysis of clinical and epidemiological evidence. *Gynecol Oncol* 2006;101:331-41.
110. Swiersz LM. Role of endometriosis in cancer and tumor development. *Ann N Y Acad Sci* 2002;955:281-92; discussion 93-5, 396-406.
111. Erzen M, Kovacic J. Relationship between endometriosis and ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 1998;19:553-5.
112. Modesitt SC, Tortolero-Luna G, Robinson JB, Gershenson DM, Wolf JK. Ovarian and extraovarian endometriosis-associated cancer. *Obstet Gynecol* 2002;100:788-95.
113. Bedaiwy MA, Hussein MR, Biscotti C, Falcone T. Pelvic endometriosis is rarely associated with ovarian borderline tumours, cytologic and architectural atypia: a clinicopathologic study. *Pathol Oncol Res* 2009;15:81-8.
114. Hunter DJ, Kraft P, Jacobs KB, et al. A genome-wide association study identifies alleles in *FGFR2* associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nat Genet* 2007;39:870-4.
115. Vigano P, Somigliana E, Chiodo I, Abbiati A, Vercellini P. Molecular mechanisms and biological plausibility underlying the malignant transformation of endometriosis: a critical analysis. *Hum Reprod Update* 2006;12:77-89.
116. Dinulescu DM, Ince TA, Quade BJ, Shafer SA, Crowley D, Jacks T. Role of K-ras and Pten in the development of mouse models of endometriosis and endometrioid ovarian cancer. *Nat Med* 2005;11:63-70.
117. Daikoku T, Hirota Y, Tranguch S, et al. Conditional loss of uterine Pten unfaithfully and rapidly induces endometrial cancer in mice. *Cancer Res* 2008;68:5619-27.
118. Zafrakas M, Tarlatzis BC, Streichert T, et al. Genome-wide microarray gene expression, array-CGH analysis, and telomerase activity in advanced ovarian endometriosis: a high degree of differentiation rather than malignant potential. *Int J Mol Med* 2008;21:335-44.
119. D'Hooghe T, Hummelshoj L. Multi-disciplinary centres/networks of excellence for endometriosis management and research: a proposal. *Hum Reprod* 2006;21:2743-8.
120. Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod* 2005;20:2698-704.
121. Vercellini P, Somigliana E, Vigano P, Abbiati A, Daguati R, Crosignani PG. Endometriosis: current and future medical therapies. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2008;22:275-306.
122. Kastner P, Krust A, Turcotte B, et al. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 1990;9:1603-14.
123. Attia GR, Zeitoun K, Edwards D, Johns A, Carr BR, Bulun SE. Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2897-902.
124. Wu Y, Strawn E, Basir Z, Halverson G, Guo SW. Promoter hypermethylation of progesterone receptor isoform B (PR-B) in endometriosis. *Epigenetics* 2006;1:106-11.
125. Wu Y, Shi X, Guo SW. The knockdown of progesterone receptor isoform B (PR-B) promotes proliferation in immortalized endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 2008;90:1320-3.
126. Arnett-Mansfield RL, deFazio A, Wain GV, et al. Relative expression of progesterone receptors A and B in endometrioid cancers of the endometrium. *Cancer Res* 2001;61:4576-82.

127. Kumar B, Koul S, Khandrika L, Meacham RB, Koul HK. Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer Res* 2008;68:1777-85.
128. McGowan EM, Clarke CL. Effect of overexpression of progesterone receptor A on endogenous progesterin-sensitive endpoints in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 1999;13:1657-71.
129. Mote PA, Leary JA, Avery KA, et al. Germ-line mutations in BRCA1 or BRCA2 in the normal breast are associated with altered expression of estrogen-responsive proteins and the predominance of progesterone receptor A. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;39:236-48.
130. Murakami K, Nomura K, Shinohara K, Kasai T, Shozu M, Inoue M. Danazol inhibits aromatase activity of endometriosis-derived stromal cells by a competitive mechanism. *Fertil Steril* 2006;86:291-7.
131. Bulun SE, Zeitoun KM, Takayama K, Sasano H. Estrogen biosynthesis in endometriosis: molecular basis and clinical relevance. *J Mol Endocrinol* 2000;25:35-42.
132. Bulun SE, Zeitoun KM, Takayama K, Simpson E, Sasano H. Aromatase as a therapeutic target in endometriosis. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:22-7.
133. Noble LS, Simpson ER, Johns A, Bulun SE. Aromatase expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:174-9.
134. Ailawadi RK, Jobanputra S, Kataria M, Gurates B, Bulun SE. Treatment of endometriosis and chronic pelvic pain with letrozole and norethindrone acetate: a pilot study. *Fertil Steril* 2004;81:290-6.
135. Abott J, Hawe J, Clayton R, Garry R. The effects and effectiveness of laparoscopic excision of endometriosis: a prospective study with 2-5 year follow up. *Hum Reprod* 2003;9:1922-27.
136. Chopin N, Vieira M, Borghese B, et al. Operative management of deeply infiltrating endometriosis: results on pelvic pain symptoms according to a surgical classification. *J Minim Invasive Gynecol* 2005;12:106-12.
137. Garry R, Clayton R, Hawe J. The effect of endometriosis and its radical laparoscopic excision on quality of life indicators. *Bjog* 2000;107:44-54.
138. Chapron C, Chiodo I, Leconte M, et al. Severe ureteral endometriosis: the intrinsic type is not so rare after complete surgical exeresis of deep endometriotic lesions. *Fertil Steril* 2010;93:2115-20.
139. Lousquy R, Borghese B, Chapron C. [Deep bladder endometriosis: how do I...to perform a laparoscopic partial cystectomy?]. *Gynecol Obstet Fertil* 2010;38:697-9.
140. Alves A, Panis Y, Lelong B, Dousset B, Benoist S, Vicaut E. Randomized clinical trial of early versus delayed temporary stoma closure after proctectomy. *Br J Surg* 2008;95:693-8.
141. Gouya H, Vignaux O, Sogni P, et al. Chronic liver disease: systemic and splanchnic venous flow mapping with optimized cine phase-contrast MR imaging validated in a phantom model and prospectively evaluated in patients. *Radiology* 2011;261:144-55.
142. Dousset B, Leconte M, Borghese B, et al. Complete surgery for low rectal endometriosis: long-term results of a 100-case prospective study. *Ann Surg* 2010;251:887-95.
143. Vercellini P, Somigliana E, Vigano P, Abbiati A, Barbara G, Crosignani PG. Surgery for endometriosis-associated infertility: a pragmatic approach. *Hum Reprod* 2009;24:254-69.
144. Halliwell B GJ. *Free radicals in Biology and Medecine*. New York: oxford university press 1999.
145. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 1999;31:261-72.

146. Marla SS, Lee J, Groves JT. Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:14243-8.
147. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.
148. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 2005;120:483-95.
149. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 2002;277:44784-90.
150. Werner E. GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *J Cell Sci* 2004;117:143-53.
151. Geiszt M, Leto TL. The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond. *J Biol Chem* 2004;279:51715-8.
152. Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 1969;244:3855-63.
153. Henzler T, Steudle E. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> across water channels. *J Exp Bot* 2000;51:2053-66.
154. Crichton RR, Wilmet S, Legssyer R, Ward RJ. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J Inorg Biochem* 2002;91:9-18.
155. Kadiiska MB, Mason RP. In vivo copper-mediated free radical production: an ESR spin-trapping study. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2002;58:1227-39.
156. Marusawa H, Ichikawa K, Narita N, Murakami H, Ito K, Tezuka T. Hydroxyl radical as a strong electrophilic species. *Bioorg Med Chem* 2002;10:2283-90.
157. Pryor WA. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol* 1986;48:657-67.
158. Folz RJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase (SOD3): tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human EC SOD gene. *Genomics* 1994;22:162-71.
159. Ookawara T, Kizaki T, Takayama E, et al. Nuclear translocation of extracellular superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:54-61.
160. Turrens JF, Crapo JD, Freeman BA. Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. *J Clin Invest* 1984;73:87-95.
161. Lomaestro BM, Malone M. Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues. *Ann Pharmacother* 1995;29:1263-73.
162. Rhee SG, Chae HZ, Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 2005;38:1543-52.
163. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160:1-40.
164. Sies H. Oxidative stress: oxydants et antioxydants New York: Academic Press 1991.
165. Beckman KB, Ames BN. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 1997;272:19633-6.
166. Mandavilli BS, Santos JH, Van Houten B. Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat Res* 2002;509:127-51.

167. Lee SR, Yang KS, Kwon J, Lee C, Jeong W, Rhee SG. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Biol Chem* 2002;277:20336-42.
168. Robinson VK, Sato E, Nelson DK, Camhi SL, Robbins RA, Hoyt JC. Peroxynitrite inhibits inducible (type 2) nitric oxide synthase in murine lung epithelial cells in vitro. *Free Radic Biol Med* 2001;30:986-91.
169. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000;103:239-52.
170. Laurent A, Nicco C, Chereau C, et al. Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer Res* 2005;65:948-56.
171. Arumugam K, Dip YC. Endometriosis and infertility: the role of exogenous lipid peroxides in the peritoneal fluid. *Fertil Steril* 1995;63:198-9.
172. Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod* 1998;13:1686-90.
173. Sugawara J, Fukaya T, Murakami T, Yoshida H, Yajima A. Increased secretion of hepatocyte growth factor by eutopic endometrial stromal cells in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1997;68:468-72.
174. Alexandre J, Nicco C, Chereau C, et al. Improvement of the therapeutic index of anticancer drugs by the superoxide dismutase mimic mangafodipir. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:236-44.
175. Pittaluga E, Costa G, Krasnowska E, et al. More than antioxidant: N-acetyl-L-cysteine in a murine model of endometriosis. *Fertil Steril* 2010;94:2905-8.
176. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995;9:726-35.
177. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000;103:211-25.
178. Kiyatkin A, Aksamitiene E, Markevich NI, Borisov NM, Hoek JB, Kholodenko BN. Scaffolding protein Grb2-associated binder 1 sustains epidermal growth factor-induced mitogenic and survival signaling by multiple positive feedback loops. *J Biol Chem* 2006;281:19925-38.
179. Yart A, Laffargue M, Mayeux P, et al. A critical role for phosphoinositide 3-kinase upstream of Gab1 and SHP2 in the activation of ras and mitogen-activated protein kinases by epidermal growth factor. *J Biol Chem* 2001;276:8856-64.
180. Adari H, Lowy DR, Willumsen BM, Der CJ, McCormick F. Guanosine triphosphatase activating protein (GAP) interacts with the p21 ras effector binding domain. *Science* 1988;240:518-21.
181. Rajalingam K, Schreck R, Rapp UR, Albert S. Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:1177-95.
182. Feng L, Yunoue S, Tokuo H, et al. PKA phosphorylation and 14-3-3 interaction regulate the function of neurofibromatosis type I tumor suppressor, neurofibromin. *FEBS Lett* 2004;557:275-82.
183. Chong H, Vikis HG, Guan KL. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal* 2003;15:463-9.
184. Yan J, Roy S, Apolloni A, Lane A, Hancock JF. Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 1998;273:24052-6.
185. Lambert JM, Lambert QT, Reuther GW, et al. Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism. *Nat Cell Biol* 2002;4:621-5.
186. Diaz-Meco MT, Lozano J, Municio MM, et al. Evidence for the in vitro and in vivo interaction of Ras with protein kinase C zeta. *J Biol Chem* 1994;269:31706-10.

187. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 2004;18:189-218.
188. Abraham D, Podar K, Pacher M, et al. Raf-1-associated protein phosphatase 2A as a positive regulator of kinase activation. *J Biol Chem* 2000;275:22300-4.
189. Jaumot M, Hancock JF. Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene* 2001;20:3949-58.
190. Rodriguez-Viciana P, Oses-Prieto J, Burlingame A, Fried M, McCormick F. A phosphatase holoenzyme comprised of Shoc2/Sur8 and the catalytic subunit of PP1 functions as an M-Ras effector to modulate Raf activity. *Mol Cell* 2006;22:217-30.
191. Hamilton M, Wolfman A. Ha-ras and N-ras regulate MAPK activity by distinct mechanisms in vivo. *Oncogene* 1998;16:1417-28.
192. Voice JK, Klemke RL, Le A, Jackson JH. Four human ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. *J Biol Chem* 1999;274:17164-70.
193. Yeung K, Seitz T, Li S, et al. Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* 1999;401:173-7.
194. Dumaz N, Light Y, Marais R. Cyclic AMP blocks cell growth through Raf-1-dependent and Raf-1-independent mechanisms. *Mol Cell Biol* 2002;22:3717-28.
195. Kyriakis JM, Force TL, Rapp UR, Bonventre JV, Avruch J. Mitogen regulation of c-Raf-1 protein kinase activity toward mitogen-activated protein kinase-kinase. *J Biol Chem* 1993;268:16009-19.
196. Li S, Sedivy JM. Raf-1 protein kinase activates the NF-kappa B transcription factor by dissociating the cytoplasmic NF-kappa B-I kappa B complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:9247-51.
197. Crews CM, Alessandrini A, Erikson RL. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* 1992;258:478-80.
198. Seger R, Ahn NG, Posada J, et al. Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *J Biol Chem* 1992;267:14373-81.
199. Chen Z, Gibson TB, Robinson F, et al. MAP kinases. *Chem Rev* 2001;101:2449-76.
200. Zheng CF, Guan KL. Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *EMBO J* 1994;13:1123-31.
201. Wu R, Durick K, Songyang Z, Cantley LC, Taylor SS, Gill GN. Specificity of LIM domain interactions with receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1996;271:15934-41.
202. Marais R, Light Y, Paterson HF, Mason CS, Marshall CJ. Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1997;272:4378-83.
203. Papin C, Denouel-Galy A, Laugier D, Calothy G, Eychene A. Modulation of kinase activity and oncogenic properties by alternative splicing reveals a novel regulatory mechanism for B-Raf. *J Biol Chem* 1998;273:24939-47.
204. Pritchard CA, Bolin L, Slattery R, Murray R, McMahan M. Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene. *Curr Biol* 1996;6:614-7.

205. Anderson NG, Maller JL, Tonks NK, Sturgill TW. Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* 1990;343:651-3.
206. Chen RH, Sarnecki C, Blenis J. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* 1992;12:915-27.
207. Lenormand P, Sardet C, Pages G, L'Allemain G, Brunet A, Pouyssegur J. Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J Cell Biol* 1993;122:1079-88.
208. Gonzalez FA, Raden DL, Davis RJ. Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *J Biol Chem* 1991;266:22159-63.
209. Minshull J, Sun H, Tonks NK, Murray AW. A MAP kinase-dependent spindle assembly checkpoint in *Xenopus* egg extracts. *Cell* 1994;79:475-86.
210. Conde de la Rosa L, Schoemaker MH, Vrenken TE, et al. Superoxide anions and hydrogen peroxide induce hepatocyte death by different mechanisms: involvement of JNK and ERK MAP kinases. *J Hepatol* 2006;44:918-29.
211. Griffith CE, Zhang W, Wange RL. ZAP-70-dependent and -independent activation of Erk in Jurkat T cells. Differences in signaling induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Cd3 cross-linking. *J Biol Chem* 1998;273:10771-6.
212. Jimenez LA, Zanella C, Fung H, et al. Role of extracellular signal-regulated protein kinases in apoptosis by asbestos and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Am J Physiol* 1997;273:L1029-35.
213. Xiao L, Pimentel DR, Wang J, Singh K, Colucci WS, Sawyer DB. Role of reactive oxygen species and NAD(P)H oxidase in alpha(1)-adrenoceptor signaling in adult rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:C926-34.
214. Knebel A, Rahmsdorf HJ, Ullrich A, Herrlich P. Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J* 1996;15:5314-25.
215. Lander HM, Milbank AJ, Tauras JM, et al. Redox regulation of cell signalling. *Nature* 1996;381:380-1.
216. Zou Y, Komuro I, Yamazaki T, et al. Protein kinase C, but not tyrosine kinases or Ras, plays a critical role in angiotensin II-induced activation of Raf-1 kinase and extracellular signal-regulated protein kinases in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1996;271:33592-7.
217. Wang XT, McCullough KD, Wang XJ, Carpenter G, Holbrook NJ. Oxidative stress-induced phospholipase C-gamma 1 activation enhances cell survival. *J Biol Chem* 2001;276:28364-71.
218. Buhl AM, Osawa S, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase activation requires two signal inputs from the human anaphylatoxin C5a receptor. *J Biol Chem* 1995;270:19828-32.
219. Lee K, Esselman WJ. Inhibition of PTPs by H(2)O(2) regulates the activation of distinct MAPK pathways. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1121-32.
220. Lee WC, Choi CH, Cha SH, Oh HL, Kim YK. Role of ERK in hydrogen peroxide-induced cell death of human glioma cells. *Neurochem Res* 2005;30:263-70.
221. McCubrey JA, Lahair MM, Franklin RA. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:1775-89.
222. Shaul YD, Seger R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:1213-26.



223. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:505-16.
224. Nguyen TT, Scimeca JC, Filloux C, Peraldi P, Carpentier JL, Van Obberghen E. Co-regulation of the mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1, and the 90-kDa ribosomal S6 kinase in PC12 cells. Distinct effects of the neurotrophic factor, nerve growth factor, and the mitogenic factor, epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1993;268:9803-10.
225. Murphy LO, Blenis J. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci* 2006;31:268-75.
226. Matheny SA, Chen C, Kortum RL, Razidlo GL, Lewis RE, White MA. Ras regulates assembly of mitogenic signalling complexes through the effector protein IMP. *Nature* 2004;427:256-60.
227. Morrison DK, Davis RJ. Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003;19:91-118.
228. Ory S, Zhou M, Conrads TP, Veenstra TD, Morrison DK. Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites. *Curr Biol* 2003;13:1356-64.
229. Xing H, Kornfeld K, Muslin AJ. The protein kinase KSR interacts with 14-3-3 protein and Raf. *Curr Biol* 1997;7:294-300.
230. Yu W, Fantl WJ, Harrowe G, Williams LT. Regulation of the MAP kinase pathway by mammalian Ksr through direct interaction with MEK and ERK. *Curr Biol* 1998;8:56-64.
231. Hochholdinger F, Baier G, Nogalo A, Bauer B, Grunicke HH, Uberall F. Novel membrane-targeted ERK1 and ERK2 chimeras which act as dominant negative, isotype-specific mitogen-activated protein kinase inhibitors of Ras-Raf-mediated transcriptional activation of c-fos in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 1999;19:8052-65.
232. Robinson MJ, Stippec SA, Goldsmith E, White MA, Cobb MH. A constitutively active and nuclear form of the MAP kinase ERK2 is sufficient for neurite outgrowth and cell transformation. *Curr Biol* 1998;8:1141-50.
233. Raman M, Cobb MH. MAP kinase modules: many roads home. *Curr Biol* 2003;13:R886-8.
234. Belanger LF, Roy S, Tremblay M, et al. Mek2 is dispensable for mouse growth and development. *Mol Cell Biol* 2003;23:4778-87.
235. Hatano N, Mori Y, Oh-hora M, et al. Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes Cells* 2003;8:847-56.
236. Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, et al. Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* 2002;34:807-20.
237. Pages G, Guerin S, Grall D, et al. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* 1999;286:1374-7.
238. Saba-El-Leil MK, Vella FD, Vernay B, et al. An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO Rep* 2003;4:964-8.
239. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:1263-84.
240. Lloyd AC, Obermuller F, Staddon S, Barth CF, McMahon M, Land H. Cooperating oncogenes converge to regulate cyclin/cdk complexes. *Genes Dev* 1997;11:663-77.

241. Ravi RK, Weber E, McMahon M, et al. Activated Raf-1 causes growth arrest in human small cell lung cancer cells. *J Clin Invest* 1998;101:153-9.
242. Yen A, Williams M, Platko JD, Der C, Hisaka M. Expression of activated RAF accelerates cell differentiation and RB protein down-regulation but not hypophosphorylation. *Eur J Cell Biol* 1994;65:103-13.
243. McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, et al. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzyme Regul* 2006;46:249-79.
244. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004;18:1926-45.
245. Ley R, Balmanno K, Hadfield K, Weston C, Cook SJ. Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. *J Biol Chem* 2003;278:18811-6.
246. Luciano F, Jacquelin A, Colosetti P, et al. Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene* 2003;22:6785-93.
247. Weston CR, Balmanno K, Chalmers C, et al. Activation of ERK1/2 by deltaRaf-1:ER\* represses Bim expression independently of the JNK or PI3K pathways. *Oncogene* 2003;22:1281-93.
248. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 1996;87:619-28.
249. Flotho C, Valcamonica S, Mach-Pascual S, et al. RAS mutations and clonality analysis in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). *Leukemia* 1999;13:32-7.
250. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, et al. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001;97:3589-95.
251. Chang F, McCubrey JA. P21(Cip1) induced by Raf is associated with increased Cdk4 activity in hematopoietic cells. *Oncogene* 2001;20:4354-64.
252. Chang F, Steelman LS, McCubrey JA. Raf-induced cell cycle progression in human TF-1 hematopoietic cells. *Cell Cycle* 2002;1:220-6.
253. Ford PW, Hamden KE, Whitman AG, McCubrey JA, Akula SM. Vascular endothelial growth factor augments human herpesvirus-8 (HHV-8/KSHV) infection. *Cancer Biol Ther* 2004;3:876-81.
254. Hamden KE, Ford PW, Whitman AG, et al. Raf-induced vascular endothelial growth factor augments Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection. *J Virol* 2004;78:13381-90.
255. Hamden KE, Whitman AG, Ford PW, Shelton JG, McCubrey JA, Akula SM. Raf and VEGF: emerging therapeutic targets in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection and angiogenesis in hematopoietic and nonhematopoietic tumors. *Leukemia* 2005;19:18-26.
256. McCarthy SA, Samuels ML, Pritchard CA, Abraham JA, McMahon M. Rapid induction of heparin-binding epidermal growth factor/diphtheria toxin receptor expression by Raf and Ras oncogenes. *Genes Dev* 1995;9:1953-64.
257. McCubrey JA, Steelman LS, Hoyle PE, et al. Differential abilities of activated Raf oncoproteins to abrogate cytokine dependency, prevent apoptosis and induce autocrine growth factor synthesis in human hematopoietic cells. *Leukemia* 1998;12:1903-29.
258. Shelton JG, Moyer PW, Steelman LS, et al. Differential effects of kinase cascade inhibitors on neoplastic and cytokine-mediated cell proliferation. *Leukemia* 2003;17:1765-82.

259. Alexia C, Fallois G, Lasfer M, Schweizer-Groyer G, Groyer A. An evaluation of the role of insulin-like growth factors (IGF) and of type-I IGF receptor signalling in hepatocarcinogenesis and in the resistance of hepatocarcinoma cells against drug-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2004;68:1003-15.
260. Fremin C, Meloche S. From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. *J Hematol Oncol* 2010;3:8.
261. Broom OJ, Widjaya B, Troelsen J, Olsen J, Nielsen OH. Mitogen activated protein kinases: a role in inflammatory bowel disease? *Clin Exp Immunol* 2009;158:272-80.
262. Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta* 2005;1754:253-62.
263. Hall-Jackson CA, Evers PA, Cohen P, et al. Paradoxical activation of Raf by a novel Raf inhibitor. *Chem Biol* 1999;6:559-68.
264. Heimbrook DC, Oliff A. Therapeutic intervention and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:284-8.
265. Lyons JF, Wilhelm S, Hibner B, Bollag G. Discovery of a novel Raf kinase inhibitor. *Endocr Relat Cancer* 2001;8:219-25.
266. Smalley KS, Xiao M, Villanueva J, et al. CRAF inhibition induces apoptosis in melanoma cells with non-V600E BRAF mutations. *Oncogene* 2009;28:85-94.
267. Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther* 2008;7:3129-40.
268. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007;356:125-34.
269. Walid MS, Johnston KW. Successful treatment of a brain-metastasized renal cell carcinoma. *Ger Med Sci* 2009;7:Doc28.
270. Rimassa L, Santoro A. Sorafenib therapy in advanced hepatocellular carcinoma: the SHARP trial. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009;9:739-45.
271. Tsai J, Lee JT, Wang W, et al. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:3041-6.
272. Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7686-9.
273. Raftopoulos M, Etienne-Manneville S, Self A, Nicholls S, Hall A. Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN. *Science* 2004;303:1179-81.
274. Tamura M, Gu J, Takino T, Yamada KM. Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130Cas. *Cancer Res* 1999;59:442-9.
275. Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 1998;95:29-39.
276. Blero D, Payrastra B, Schurmans S, Erneux C. Phosphoinositide phosphatases in a network of signalling reactions. *Pflugers Arch* 2007;455:31-44.

277. Gimm O, Perren A, Weng LP, et al. Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *Am J Pathol* 2000;156:1693-700.
278. Frech M, Andjelkovic M, Ingley E, Reddy KK, Falck JR, Hemmings BA. High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity. *J Biol Chem* 1997;272:8474-81.
279. James SR, Downes CP, Gigg R, Grove SJ, Holmes AB, Alessi DR. Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation. *Biochem J* 1996;315 ( Pt 3):709-13.
280. Kumar CC, Diao R, Yin Z, et al. Expression, purification, characterization and homology modeling of active Akt/PKB, a key enzyme involved in cell survival signaling. *Biochim Biophys Acta* 2001;1526:257-68.
281. Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, et al. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 1997;272:31515-24.
282. Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, et al. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 2006;127:125-37.
283. Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, et al. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* 1997;277:567-70.
284. Toker A, Newton AC. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J Biol Chem* 2000;275:8271-4.
285. Hresko RC, Mueckler M. mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 2005;280:40406-16.
286. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005;307:1098-101.
287. Yano S, Tokumitsu H, Soderling TR. Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* 1998;396:584-7.
288. Alessi DR, Caudwell FB, Andjelkovic M, Hemmings BA, Cohen P. Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett* 1996;399:333-8.
289. Yamada T, Katagiri H, Asano T, et al. 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1, an Akt1 kinase, is involved in dephosphorylation of Thr-308 of Akt1 in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 2001;276:5339-45.
290. Gao T, Furnari F, Newton AC. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell* 2005;18:13-24.
291. Janssens V, Goris J, Van Hoof C. PP2A: the expected tumor suppressor. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15:34-41.
292. Brognard J, Newton AC. PHLiPPing the switch on Akt and protein kinase C signaling. *Trends Endocrinol Metab* 2008;19:223-30.
293. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998;282:1318-21.
294. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 2005;9:59-71.

295. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 1999;13:2905-27.
296. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 2002;14:381-95.
297. Pugazhenti S, Nesterova A, Sable C, et al. Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem* 2000;275:10761-6.
298. Wang JM, Chao JR, Chen W, Kuo ML, Yen JJ, Yang-Yen HF. The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol* 1999;19:6195-206.
299. Barkett M, Gilmore TD. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999;18:6910-24.
300. Shin I, Yakes FM, Rojo F, et al. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* 2002;8:1145-52.
301. Viglietto G, Motti ML, Bruni P, et al. Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med* 2002;8:1136-44.
302. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 2001;3:973-82.
303. Li Y, Corradetti MN, Inoki K, Guan KL. TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends Biochem Sci* 2004;29:32-8.
304. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995;378:785-9.
305. Deprez J, Vertommen D, Alessi DR, Hue L, Rider MH. Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *J Biol Chem* 1997;272:17269-75.
306. Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem* 1996;271:31372-8.
307. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007;129:1261-74.
308. Bhaskar PT, Hay N. The two TORCs and Akt. *Dev Cell* 2007;12:487-502.
309. Peterson RT, Beal PA, Comb MJ, Schreiber SL. FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. *J Biol Chem* 2000;275:7416-23.
310. Takahashi T, Hara K, Inoue H, et al. Carboxyl-terminal region conserved among phosphoinositide-kinase-related kinases is indispensable for mTOR function in vivo and in vitro. *Genes Cells* 2000;5:765-75.
311. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002;110:163-75.
312. Fonseca BD, Smith EM, Lee VH, MacKintosh C, Proud CG. PRAS40 is a target for mammalian target of rapamycin complex 1 and is required for signaling downstream of this complex. *J Biol Chem* 2007;282:24514-24.

313. Oshiro N, Takahashi R, Yoshino K, et al. The proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) is a physiological substrate of mammalian target of rapamycin complex 1. *J Biol Chem* 2007;282:20329-39.
314. Wang L, Harris TE, Roth RA, Lawrence JC, Jr. PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J Biol Chem* 2007;282:20036-44.
315. Biondi RM, Kieloch A, Currie RA, Deak M, Alessi DR. The PIF-binding pocket in PDK1 is essential for activation of S6K and SGK, but not PKB. *EMBO J* 2001;20:4380-90.
316. Frodin M, Antal TL, Dummler BA, et al. A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation. *EMBO J* 2002;21:5396-407.
317. Alessi DR, Kozlowski MT, Weng QP, Morrice N, Avruch J. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Curr Biol* 1998;8:69-81.
318. Dennis PB, Pullen N, Pearson RB, Kozma SC, Thomas G. Phosphorylation sites in the autoinhibitory domain participate in p70(s6k) activation loop phosphorylation. *J Biol Chem* 1998;273:14845-52.
319. Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, Thomas G. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J* 1997;16:3693-704.
320. Meyuhas O. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur J Biochem* 2000;267:6321-30.
321. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev* 2001;15:807-26.
322. Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol* 2007;9:316-23.
323. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* 2004;6:1122-8.
324. Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, et al. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* 2002;10:457-68.
325. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 2004;14:1296-302.
326. Frias MA, Thoreen CC, Jaffe JD, et al. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol* 2006;16:1865-70.
327. Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, et al. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell* 2006;11:859-71.
328. Chappell WH, Steelman LS, Long JM, et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget* 2011;2:135-64.
329. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 2000;351:95-105.

330. Duran I, Siu LL, Oza AM, et al. Characterisation of the lung toxicity of the cell cycle inhibitor temsirolimus. *Eur J Cancer* 2006;42:1875-80.
331. Yao JC, Phan AT, Chang DZ, et al. Efficacy of RAD001 (everolimus) and octreotide LAR in advanced low- to intermediate-grade neuroendocrine tumors: results of a phase II study. *J Clin Oncol* 2008;26:4311-8.
332. Mita MM, Mita AC, Chu QS, et al. Phase I trial of the novel mammalian target of rapamycin inhibitor deforolimus (AP23573; MK-8669) administered intravenously daily for 5 days every 2 weeks to patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol* 2008;26:361-7.
333. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 2004;4:540-50.
334. Lagerstrom MC, Schioth HB. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:339-57.
335. Viola A, Luster AD. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008;48:171-97.
336. Horuk R. Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001;12:313-35.
337. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12:121-7.
338. Ma Q, Jones D, Borghesani PR, et al. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:9448-53.
339. Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, Reza R, Wojakowski W, Ratajczak J. The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia* 2006;20:1915-24.
340. Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med* 1997;185:111-20.
341. Lapidot T, Kollet O. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia* 2002;16:1992-2003.
342. Peled A, Petit I, Kollet O, et al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 1999;283:845-8.
343. Kucia M, Reza R, Miekus K, et al. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells* 2005;23:879-94.
344. Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation* 2004;110:3300-5.
345. Wojakowski W, Tendera M, Michalowska A, et al. Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;110:3213-20.
346. Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, et al. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation* 2002;105:732-8.

347. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999;5:434-8.
348. Kollet O, Shvitiel S, Chen YQ, et al. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 2003;112:160-9.
349. Ponomaryov T, Peled A, Petit I, et al. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest* 2000;106:1331-9.
350. Ratajczak MZ, Kucia M, Reza R, Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia* 2004;18:29-40.
351. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004;10:858-64.
352. Helbig G, Christopherson KW, 2nd, Bhat-Nakshatri P, et al. NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J Biol Chem* 2003;278:21631-8.
353. Jin C, Fu WX, Xie LP, Qian XP, Chen WF. SDF-1alpha production is negatively regulated by mouse estrogen enhanced transcript in a mouse thymus epithelial cell line. *Cell Immunol* 2003;223:26-34.
354. Wright N, de Lera TL, Garcia-Moruja C, et al. Transforming growth factor-beta1 down-regulates expression of chemokine stromal cell-derived factor-1: functional consequences in cell migration and adhesion. *Blood* 2003;102:1978-84.
355. Libura J, Drukala J, Majka M, et al. CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion. *Blood* 2002;100:2597-606.
356. Reza R, Mastellos D, Majka M, et al. Functional receptor for C3a anaphylatoxin is expressed by normal hematopoietic stem/progenitor cells, and C3a enhances their homing-related responses to SDF-1. *Blood* 2003;101:3784-93.
357. Tomescu O, Xia SJ, Strezlecki D, et al. Inducible short-term and stable long-term cell culture systems reveal that the PAX3-FKHR fusion oncoprotein regulates CXCR4, PAX3, and PAX7 expression. *Lab Invest* 2004;84:1060-70.
358. Barr FG. Gene fusions involving PAX and FOX family members in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene* 2001;20:5736-46.
359. Schioppa T, Uranchimeg B, Sacconi A, et al. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med* 2003;198:1391-402.
360. Curnow SJ, Wloka K, Faint JM, et al. Topical glucocorticoid therapy directly induces up-regulation of functional CXCR4 on primed T lymphocytes in the aqueous humor of patients with uveitis. *J Immunol* 2004;172:7154-61.
361. Han KH, Hong KH, Ko J, et al. Lysophosphatidylcholine up-regulates CXCR4 chemokine receptor expression in human CD4 T cells. *J Leukoc Biol* 2004;76:195-202.
362. Franitza S, Kollet O, Brill A, et al. TGF-beta1 enhances SDF-1alpha-induced chemotaxis and homing of naive T cells by up-regulating CXCR4 expression and downstream cytoskeletal effector molecules. *Eur J Immunol* 2002;32:193-202.
363. Bachelder RE, Wendt MA, Mercurio AM. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res* 2002;62:7203-6.



364. Yonezawa A, Morita R, Takaori-Kondo A, et al. Natural alpha interferon-producing cells respond to human immunodeficiency virus type 1 with alpha interferon production and maturation into dendritic cells. *J Virol* 2003;77:3777-84.
365. Iikura M, Miyamasu M, Yamaguchi M, et al. Chemokine receptors in human basophils: inducible expression of functional CXCR4. *J Leukoc Biol* 2001;70:113-20.
366. Jourdan P, Vendrell JP, Huguet MF, et al. Cytokines and cell surface molecules independently induce CXCR4 expression on CD4+ CCR7+ human memory T cells. *J Immunol* 2000;165:716-24.
367. Zhang XF, Wang JF, Matczak E, Proper JA, Grooman JE. Janus kinase 2 is involved in stromal cell-derived factor-1alpha-induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and migration of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2001;97:3342-8.
368. Rubin JB. Chemokine signaling in cancer: one hump or two? *Semin Cancer Biol* 2009;19:116-22.
369. Cheng ZJ, Zhao J, Sun Y, et al. beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4. *J Biol Chem* 2000;275:2479-85.
370. Ganju RK, Brubaker SA, Meyer J, et al. The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem* 1998;273:23169-75.
371. Kijowski J, Baj-Krzyworzeka M, Majka M, et al. The SDF-1-CXCR4 axis stimulates VEGF secretion and activates integrins but does not affect proliferation and survival in lymphohematopoietic cells. *Stem Cells* 2001;19:453-66.
372. Balabanian K, Levoe A, Klemm L, et al. Leukocyte analysis from WHIM syndrome patients reveals a pivotal role for GRK3 in CXCR4 signaling. *J Clin Invest* 2008;118:1074-84.
373. Goldsmith ZG, Dhanasekaran DN. G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 2007;26:3122-42.
374. Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Manes S, Martinez AC. Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu Rev Immunol* 2001;19:397-421.
375. Petit I, Goichberg P, Spiegel A, et al. Atypical PKC-zeta regulates SDF-1-mediated migration and development of human CD34+ progenitor cells. *J Clin Invest* 2005;115:168-76.
376. Fernandis AZ, Cherla RP, Ganju RK. Differential regulation of CXCR4-mediated T-cell chemotaxis and mitogen-activated protein kinase activation by the membrane tyrosine phosphatase, CD45. *J Biol Chem* 2003;278:9536-43.
377. Kucia M, Jankowski K, Reza R, et al. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J Mol Histol* 2004;35:233-45.
378. Tilton B, Ho L, Oberlin E, et al. Signal transduction by CXC chemokine receptor 4. Stromal cell-derived factor 1 stimulates prolonged protein kinase B and extracellular signal-regulated kinase 2 activation in T lymphocytes. *J Exp Med* 2000;192:313-24.
379. Wang JF, Park IW, Grooman JE. Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C. *Blood* 2000;95:2505-13.
380. Kremer KN, Humphreys TD, Kumar A, Qian NX, Hedin KE. Distinct role of ZAP-70 and Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa in the prolonged activation of

extracellular signal-regulated protein kinase by the stromal cell-derived factor-1 alpha/CXCL12 chemokine. *J Immunol* 2003;171:360-7.

381. Bartolome RA, Galvez BG, Longo N, et al. Stromal cell-derived factor-1alpha promotes melanoma cell invasion across basement membranes involving stimulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and Rho GTPase activities. *Cancer Res* 2004;64:2534-43.

382. Walmsley MJ, Ooi SK, Reynolds LF, et al. Critical roles for Rac1 and Rac2 GTPases in B cell development and signaling. *Science* 2003;302:459-62.

383. Wysoczynski M, Reza R, Ratajczak J, et al. Incorporation of CXCR4 into membrane lipid rafts primes homing-related responses of hematopoietic stem/progenitor cells to an SDF-1 gradient. *Blood* 2005;105:40-8.

384. Yang FC, Atkinson SJ, Gu Y, et al. Rac and Cdc42 GTPases control hematopoietic stem cell shape, adhesion, migration, and mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:5614-8.

385. Avigdor A, Goichberg P, Shivtiel S, et al. CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow. *Blood* 2004;103:2981-9.

386. Hidalgo A, Sanz-Rodriguez F, Rodriguez-Fernandez JL, et al. Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-dependent adhesion to fibronectin and VCAM-1 on bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 2001;29:345-55.

387. Vila-Coro AJ, Rodriguez-Frade JM, Martin De Ana A, Moreno-Ortiz MC, Martinez AC, Mellado M. The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J* 1999;13:1699-710.

388. Majka M, Ratajczak J, Kowalska MA, Ratajczak MZ. Binding of stromal derived factor-1alpha (SDF-1alpha) to CXCR4 chemokine receptor in normal human megakaryoblasts but not in platelets induces phosphorylation of mitogen-activated protein kinase p42/44 (MAPK), ELK-1 transcription factor and serine/threonine kinase AKT. *Eur J Haematol* 2000;64:164-72.

389. Roland J, Murphy BJ, Ahr B, et al. Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling. *Blood* 2003;101:399-406.

390. Ward SG. T lymphocytes on the move: chemokines, PI 3-kinase and beyond. *Trends Immunol* 2006;27:80-7.

391. Bendall LJ, Baraz R, Juarez J, Shen W, Bradstock KF. Defective p38 mitogen-activated protein kinase signaling impairs chemotactic but not proliferative responses to stromal-derived factor-1alpha in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 2005;65:3290-8.

392. Chernock RD, Cherla RP, Ganju RK. SHP2 and cbl participate in alpha-chemokine receptor CXCR4-mediated signaling pathways. *Blood* 2001;97:608-15.

393. Hatch HM, Zheng D, Jorgensen ML, Petersen BE. SDF-1alpha/CXCR4: a mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats. *Cloning Stem Cells* 2002;4:339-51.

394. Kucia M, Dawn B, Hunt G, et al. Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood after myocardial infarction. *Circ Res* 2004;95:1191-9.

395. Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 2003;107:1322-8.

396. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003;9:702-12.
397. Kimura T, Boehmler AM, Seitz G, et al. The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 supports CXCR4-dependent migration and bone marrow homing of human CD34+ progenitor cells. *Blood* 2004;103:4478-86.
398. Janowska-Wieczorek A, Majka M, Kijowski J, et al. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood* 2001;98:3143-9.
399. Hecht I, Cahalon L, Hershkovitz R, Lahat A, Franitza S, Lider O. Heterologous desensitization of T cell functions by CCR5 and CXCR4 ligands: inhibition of cellular signaling, adhesion and chemotaxis. *Int Immunol* 2003;15:29-38.
400. Honczarenko M, Le Y, Glodek AM, et al. CCR5-binding chemokines modulate CXCL12 (SDF-1)-induced responses of progenitor B cells in human bone marrow through heterologous desensitization of the CXCR4 chemokine receptor. *Blood* 2002;100:2321-9.
401. Farzan M, Babcock GJ, Vasilieva N, et al. The role of post-translational modifications of the CXCR4 amino terminus in stromal-derived factor 1 alpha association and HIV-1 entry. *J Biol Chem* 2002;277:29484-9.
402. Valenzuela-Fernandez A, Planchenault T, Baleux F, et al. Leukocyte elastase negatively regulates Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 binding and functions by amino-terminal processing of SDF-1 and CXCR4. *J Biol Chem* 2002;277:15677-89.
403. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:895-902.
404. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414:105-11.
405. Tavor S, Petit I, Porozov S, et al. CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice. *Cancer Res* 2004;64:2817-24.
406. Lapidot T, Pflumio F, Doedens M, Murdoch B, Williams DE, Dick JE. Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science* 1992;255:1137-41.
407. Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, Wicha MS. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif* 2003;36 Suppl 1:59-72.
408. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432:396-401.
409. Hall JM, Korach KS. Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 2003;17:792-803.
410. Sun YX, Wang J, Shelburne CE, et al. Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J Cell Biochem* 2003;89:462-73.
411. Porcile C, Bajetto A, Barbero S, Pirani P, Schettini G. CXCR4 activation induces epidermal growth factor receptor transactivation in an ovarian cancer cell line. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1030:162-9.
412. Gargett CE. Uterine stem cells: what is the evidence? *Hum Reprod Update* 2007;13:87-101.

413. Gargett CE, Masuda H. Adult stem cells in the endometrium. *Mol Hum Reprod* 2010;16:818-34.
414. Kao AP, Wang KH, Chang CC, et al. Comparative study of human eutopic and ectopic endometrial mesenchymal stem cells and the development of an in vivo endometriotic invasion model. *Fertil Steril* 2011;95:1308-15 e1.
415. Hattori K, Heissig B, Tashiro K, et al. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 2001;97:3354-60.
416. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 2002;3:687-94.
417. Zhong R, Law P, Wong D, Merzouk A, Salari H, Ball ED. Small peptide analogs to stromal derived factor-1 enhance chemotactic migration of human and mouse hematopoietic cells. *Exp Hematol* 2004;32:470-5.
418. Jankowski K, Kucia M, Wysoczynski M, et al. Both hepatocyte growth factor (HGF) and stromal-derived factor-1 regulate the metastatic behavior of human rhabdomyosarcoma cells, but only HGF enhances their resistance to radiochemotherapy. *Cancer Res* 2003;63:7926-35.
419. Lazarini F, Tham TN, Casanova P, Arenzana-Seisdedos F, Dubois-Dalcq M. Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system. *Glia* 2003;42:139-48.
420. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 1998;393:591-4.
421. Sotsios Y, Whittaker GC, Westwick J, Ward SG. The CXC chemokine stromal cell-derived factor activates a Gi-coupled phosphoinositide 3-kinase in T lymphocytes. *J Immunol* 1999;163:5954-63.
422. Fox JA, Ung K, Tanlimco SG, Jirik FR. Disruption of a single Pten allele augments the chemotactic response of B lymphocytes to stromal cell-derived factor-1. *J Immunol* 2002;169:49-54.
423. Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, et al. Stromal-derived factor 1 and thrombopoietin regulate distinct aspects of human megakaryopoiesis. *Blood* 2000;96:4142-51.
424. Ding Z, Issekutz TB, Downey GP, Waddell TK. L-selectin stimulation enhances functional expression of surface CXCR4 in lymphocytes: implications for cellular activation during adhesion and migration. *Blood* 2003;101:4245-52.
425. Burger M, Glodek A, Hartmann T, et al. Functional expression of CXCR4 (CD184) on small-cell lung cancer cells mediates migration, integrin activation, and adhesion to stromal cells. *Oncogene* 2003;22:8093-101.
426. Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med* 2004;10:64-71.
427. Brusselmans K, Bono F, Collen D, Herbert JM, Carmeliet P, Dewerchin M. A novel role for vascular endothelial growth factor as an autocrine survival factor for embryonic stem cells during hypoxia. *J Biol Chem* 2005;280:3493-9.
428. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 2004;116:769-78.

429. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85:221-8.
430. Neuhaus T, Stier S, Totzke G, et al. Stromal cell-derived factor 1alpha (SDF-1alpha) induces gene-expression of early growth response-1 (Egr-1) and VEGF in human arterial endothelial cells and enhances VEGF induced cell proliferation. *Cell Prolif* 2003;36:75-86.
431. Kryczek I, Lange A, Mottram P, et al. CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer Res* 2005;65:465-72.
432. Samara GJ, Lawrence DM, Chiarelli CJ, et al. CXCR4-mediated adhesion and MMP-9 secretion in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 2004;214:231-41.
433. Spiegel A, Kollet O, Peled A, et al. Unique SDF-1-induced activation of human precursor-B ALL cells as a result of altered CXCR4 expression and signaling. *Blood* 2004;103:2900-7.
434. Lataillade JJ, Clay D, Bourin P, et al. Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G(0)/G(1) transition in CD34(+) cells: evidence for an autocrine/paracrine mechanism. *Blood* 2002;99:1117-29.
435. Bonavia R, Bajetto A, Barbero S, Pirani P, Florio T, Schettini G. Chemokines and their receptors in the CNS: expression of CXCL12/SDF-1 and CXCR4 and their role in astrocyte proliferation. *Toxicol Lett* 2003;139:181-9.
436. Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res* 2002;62:1832-7.
437. Barbero S, Bonavia R, Bajetto A, et al. Stromal cell-derived factor 1alpha stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt. *Cancer Res* 2003;63:1969-74.
438. Frisch SM, Screaton RA. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:555-62.
439. Burger JA, Peled A. CXCR4 antagonists: targeting the microenvironment in leukemia and other cancers. *Leukemia* 2009;23:43-52.
440. Treatment of pelvic pain associated with endometriosis. *Fertil Steril* 2008;90:S260-9.
441. Attar E, Bulun SE. Aromatase inhibitors: the next generation of therapeutics for endometriosis? *Fertil Steril* 2006;85:1307-18.
442. Yoshino O, Osuga Y, Hirota Y, et al. Possible pathophysiological roles of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2004;52:306-11.
443. Kuo KT, Mao TL, Jones S, et al. Frequent activating mutations of PIK3CA in ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol* 2009;174:1597-601.
444. Yagyu T, Tsuji Y, Haruta S, et al. Activation of mammalian target of rapamycin in postmenopausal ovarian endometriosis. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16:1545-51.
445. Zhang H, Zhao X, Liu S, Li J, Wen Z, Li M. 17betaE2 promotes cell proliferation in endometriosis by decreasing PTEN via NFkappaB-dependent pathway. *Mol Cell Endocrinol* 2010;317:31-43.
446. Cinar O, Seval Y, Uz YH, et al. Differential regulation of Akt phosphorylation in endometriosis. *Reprod Biomed Online* 2009;19:864-71.

447. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:2927-31.
448. Laird SM, Widdowson R, El-Sheikhi M, Hall AJ, Li TC. Expression of CXCL12 and CXCR4 in human endometrium; effects of CXCL12 on MMP production by human endometrial cells. *Hum Reprod* 2011;26:1144-52.
449. Ruiz A, Salvo VA, Ruiz LA, Baez P, Garcia M, Flores I. Basal and steroid hormone-regulated expression of CXCR4 in human endometrium and endometriosis. *Reprod Sci* 2010;17:894-903.
450. Kukreja P, Abdel-Mageed AB, Mondal D, Liu K, Agrawal KC. Up-regulation of CXCR4 expression in PC-3 cells by stromal-derived factor-1alpha (CXCL12) increases endothelial adhesion and transendothelial migration: role of MEK/ERK signaling pathway-dependent NF-kappaB activation. *Cancer Res* 2005;65:9891-8.
451. Song JS, Kang CM, Yoo MB, et al. Nitric oxide induces MUC5AC mucin in respiratory epithelial cells through PKC and ERK dependent pathways. *Respir Res* 2007;8:28.
452. Murk W, Atabekoglu CS, Cakmak H, et al. Extracellularly signal-regulated kinase activity in the human endometrium: possible roles in the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3532-40.
453. Matsuzaki S, Canis M, Vaurs-Barriere C, Boespflug-Tanguy O, Dastugue B, Mage G. DNA microarray analysis of gene expression in eutopic endometrium from patients with deep endometriosis using laser capture microdissection. *Fertil Steril* 2005;84 Suppl 2:1180-90.
454. Deane JA, Fruman DA. Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. *Annu Rev Immunol* 2004;22:563-98.
455. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006;124:471-84.
456. Aytan H, Caglar P, Uygur D, Zergeroglu S, Batioglu S. Effect of the immunomodulator leflunomide on the induction of endometriosis in an experimental rat model. *Fertil Steril* 2007;87:698-701.
457. Khazaei M, Montaseri A, Casper RF. Letrozole stimulates the growth of human endometrial explants cultured in three-dimensional fibrin matrix. *Fertil Steril* 2009;91:2172-6.
458. Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol* 2006;24:2917-31.
459. De Petrocellis L, Melck D, Palmisano A, et al. The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast cancer cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:8375-80.
460. Melck D, De Petrocellis L, Orlando P, et al. Suppression of nerve growth factor Trk receptors and prolactin receptors by endocannabinoids leads to inhibition of human breast and prostate cancer cell proliferation. *Endocrinology* 2000;141:118-26.
461. Ligresti A, Bisogno T, Matias I, et al. Possible endocannabinoid control of colorectal cancer growth. *Gastroenterology* 2003;125:677-87.
462. Blazquez C, Carracedo A, Barrado L, et al. Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma. *FASEB J* 2006;20:2633-5.
463. Han KH, Lim S, Ryu J, et al. CB1 and CB2 cannabinoid receptors differentially regulate the production of reactive oxygen species by macrophages. *Cardiovasc Res* 2009;84:378-86.

464. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Batkai S, et al. CB1 cannabinoid receptors promote oxidative stress and cell death in murine models of doxorubicin-induced cardiomyopathy and in human cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*;85:773-84.
465. Gomez del Pulgar T, Velasco G, Sanchez C, Haro A, Guzman M. De novo-synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis. *Biochem J* 2002;363:183-8.
466. Ellert-Miklaszewska A, Kaminska B, Konarska L. Cannabinoids down-regulate PI3K/Akt and Erk signalling pathways and activate proapoptotic function of Bad protein. *Cell Signal* 2005;17:25-37.
467. Jia W, Hegde VL, Singh NP, et al. Delta9-tetrahydrocannabinol-induced apoptosis in Jurkat leukemia T cells is regulated by translocation of Bad to mitochondria. *Mol Cancer Res* 2006;4:549-62.
468. McKallip RJ, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Delta-9-tetrahydrocannabinol enhances breast cancer growth and metastasis by suppression of the antitumor immune response. *J Immunol* 2005;174:3281-9.
469. Sarfaraz S, Afaq F, Adhami VM, Malik A, Mukhtar H. Cannabinoid receptor agonist-induced apoptosis of human prostate cancer cells LNCaP proceeds through sustained activation of ERK1/2 leading to G1 cell cycle arrest. *J Biol Chem* 2006;281:39480-91.
470. Akhmetshina A, Dees C, Busch N, et al. The cannabinoid receptor CB2 exerts antifibrotic effects in experimental dermal fibrosis. *Arthritis Rheum* 2009;60:1129-36.
471. Defer N, Wan J, Souktani R, et al. The cannabinoid receptor type 2 promotes cardiac myocyte and fibroblast survival and protects against ischemia/reperfusion-induced cardiomyopathy. *FASEB J* 2009;23:2120-30.
472. Michalski CW, Maier M, Erkan M, et al. Cannabinoids reduce markers of inflammation and fibrosis in pancreatic stellate cells. *PLoS One* 2008;3:e1701.
473. Julien B, Grenard P, Teixeira-Clerc F, et al. Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology* 2005;128:742-55.
474. Teixeira-Clerc F, Julien B, Grenard P, et al. CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat Med* 2006;12:671-6.
475. Munoz-Luque J, Ros J, Fernandez-Varo G, et al. Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid CB2 receptor in cirrhotic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;324:475-83.
476. Laursen BS, Bajaj P, Olesen AS, Delmar C, Arendt-Nielsen L. Health related quality of life and quantitative pain measurement in females with chronic non-malignant pain. *Eur J Pain* 2005;9:267-75.
477. Healy DL, Rogers PA, Hii L, Wingfield M. Angiogenesis: a new theory for endometriosis. *Hum Reprod Update* 1998;4:736-40.
478. Gazvani R, Templeton A. Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reproduction* 2002;123:217-26.
479. Vinatier D, Dufour P, Oosterlynck D. Immunological aspects of endometriosis. *Hum Reprod Update* 1996;2:371-84.
480. Leconte M, Nicco C, Ngo C, et al. Antiproliferative effects of cannabinoid agonists on deep infiltrating endometriosis. *Am J Pathol* 2010;177:2963-70.
481. Leconte M, Nicco C, Ngo C, et al. The mTOR/AKT inhibitor temsirolimus prevents deep infiltrating endometriosis in mice. *Am J Pathol* 2011;179:880-9.

482. Ngo C, Nicco C, Leconte M, et al. Protein kinase inhibitors can control the progression of endometriosis in vitro and in vivo. *J Pathol* 2010;222:148-57.
483. Foussat A, Balabanian K, Amara A, et al. Production of stromal cell-derived factor 1 by mesothelial cells and effects of this chemokine on peritoneal B lymphocytes. *Eur J Immunol* 2001;31:350-9.
484. Dousset B, Leconte M, Borghese B, et al. Complete surgery for low rectal endometriosis: long-term results of a 100-case prospective study. *Ann Surg*;251:887-95.
485. Bartosik D, Jacobs SL, Kelly LJ. Endometrial tissue in peritoneal fluid. *Fertil Steril* 1986;46:796-800.
486. Yu T, Wu Y, Helman JI, Wen Y, Wang C, Li L. CXCR4 promotes oral squamous cell carcinoma migration and invasion through inducing expression of MMP-9 and MMP-13 via the ERK signaling pathway. *Mol Cancer Res* 2011;9:161-72.
487. Sun X, Wei L, Chen Q, Terek RM. CXCR4/SDF1 mediate hypoxia induced chondrosarcoma cell invasion through ERK signaling and increased MMP1 expression. *Mol Cancer* 2010;9:17.
488. Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, Ino K, Nawa A, Kikkawa F. Involvement of SDF-1alpha/CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 2008;122:91-9.
489. Kim J, Takeuchi H, Lam ST, et al. Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival. *J Clin Oncol* 2005;23:2744-53.
490. Hansen IB, Ellingsen T, Hornung N, Poulsen JH, Lottenburger T, Stengaard-Pedersen K. Plasma level of CXC-chemokine CXCL12 is increased in rheumatoid arthritis and is independent of disease activity and methotrexate treatment. *J Rheumatol* 2006;33:1754-9.
491. Dotan I, Werner L, Vigodman S, et al. CXCL12 is a constitutive and inflammatory chemokine in the intestinal immune system. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:583-92.
492. Jiang HW, Ling JQ, Gong QM. The expression of stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) in inflamed human dental pulp. *J Endod* 2008;34:1351-4.
493. Boutten A, Dehoux M, Edelman P, et al. IL6 and acute phase plasma proteins in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Clin Chim Acta* 1992;210:187-95.
494. Muller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001;410:50-6.
495. Jiang L, Zhu YQ, Du R, et al. The expression and role of stromal cell-derived factor-1alpha-CXCR4 axis in human dental pulp. *J Endod* 2008;34:939-44.
496. Vignot S, Faivre S, Aguirre D, Raymond E. mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Ann Oncol* 2005;16:525-37.
497. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, et al. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2002;8:128-35.
498. Semela D, Piguet AC, Kolev M, et al. Vascular remodeling and antitumoral effects of mTOR inhibition in a rat model of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2007;46:840-8.
499. Villanueva A, Chiang DY, Newell P, et al. Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008;135:1972-83, 83 e1-11.



500. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007;356:2271-81.
501. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet* 2008;372:449-56.
502. Decaens T, Luciani A, Itti E, et al. Phase II study of sirolimus in treatment-naïve patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2012;44:610-6.
503. O'Donnell A, Faivre S, Burris HA, 3rd, et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2008;26:1588-95.