



**HAL**  
open science

# IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION D'UN NOUVEAU MÉCANISME DE RÉSISTANCE AU GEFITINIB DANS LE CANCER DU POUMON NON-À PETITES CELLULES : ROLE DE L'AMPHIRÉGULINE

Benoit Busser

► **To cite this version:**

Benoit Busser. IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION D'UN NOUVEAU MÉCANISME DE RÉSISTANCE AU GEFITINIB DANS LE CANCER DU POUMON NON-À PETITES CELLULES : ROLE DE L'AMPHIRÉGULINE. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00446892v1

**HAL Id: tel-00446892**

**<https://theses.hal.science/tel-00446892v1>**

Submitted on 13 Jan 2010 (v1), last revised 7 Dec 2010 (v2)

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE

Pour l'obtention du grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER**

Spécialité : Biologie Cellulaire

Présentée par  
**Benoît BUSSER**

**Le 25 Novembre 2009**

---

---

**Identification et caractérisation d'un nouveau mécanisme  
de résistance au gefitinib dans le cancer du poumon  
non-à petites cellules : Rôle de l'amphiréguline**

---

---

**Membres du Jury :**

Professeur Marie Wislez, Lyon	Rapporteur
Docteur Patrick Auberger, Nice	Rapporteur
Professeur Denis Moro-Sibilot, Grenoble	Examineur
Docteur Laurence Dubrez-Daloz, Dijon	Examineur
Docteur Amandine Hurbin, Grenoble	Directrice Scientifique
Professeur Marie Christine Favrot, Grenoble	Directrice de Thèse



## Remerciements

*Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude envers les membres de mon jury de thèse :*

**Au directeur de Thèse, Madame le Professeur Marie Favrot,**

Je vous remercie pour m'avoir accueilli dès mon Master 2 dans votre équipe "Identification de cibles thérapeutiques et vectorisation de drogues dans le cancer du poumon" de l'unité Inserm U823. J'ai apprécié la pertinence de vos conseils qui reflètent la grande expérience que vous avez acquise de la recherche. Je vous remercie pour votre esprit d'ouverture et votre disponibilité à mon égard. Vous m'avez conseillé tout au long de mon cursus d'interne où j'ai effectué de nombreux semestres dans votre service au sein du Département de Biologie Intégrée du CHU de Grenoble. Veuillez trouver ici l'assurance de mon profond respect.

**Au directeur scientifique, Madame le Docteur Amandine Hurbin,**

Je te remercie d'avoir accepté de m'encadrer au sein de l'équipe dès mon arrivée à l'Institut Albert Bonniot. Tu as su m'enseigner la méthodologie et la rigueur requises en recherche fondamentale. Merci pour tout le temps que tu as consacré à ma formation, et pour ton aide précieuse dans la fastidieuse correction de ce mémoire, faisant de moi un "thésard privilégié".

**À Madame le Professeur Marie Wislez,**

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

**À Monsieur le Docteur Patrick Auberger**

Je vous remercie sincèrement de me faire l'honneur d'être rapporteur afin de juger mon travail. Merci aussi pour votre accord si spontané contrastant avec notre sollicitation tardive.

**À Monsieur le Professeur Denis Moro-Sibilot,**

Je vous remercie d'avoir immédiatement accepté de participer à mon jury de thèse et de consacrer du temps pour examiner ce mémoire. Vous nous avez prodigué de précieux conseils pour la délicate gestion des statistiques dans nos travaux. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance.

**À Madame le Docteur Laurence Dubrez-Daloz,**

Je vous remercie d'avoir eu la gentillesse d'accepter spontanément de faire partie de mon jury. Quelle chance pour moi d'avoir comme examinateur l'initiatrice et la spécialiste de la voie de signalisation sur laquelle je travaille depuis quatre ans.

*Ensuite, je voudrais témoigner ma plus sincère reconnaissance à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de ce travail :*

**Au Docteur Jean-Luc Coll,**

Je te remercie pour ta relecture attentive de ce manuscrit, et tes nombreux conseils avisés, qui m'ont permis de trouver des solutions à nombre de mes récurrents problèmes de manip. Dans cette équipe 5 ultraféminisée (88%,  $p < 0,001$ ) notre frêle solidarité masculine aura survécu.

**Au Docteur Lucie Sancey,**

Je te remercie pour ton aide précieuse et ton inconditionnelle disponibilité à mon égard. Quel plaisir d'avoir été ton coloc' de bureau pendant ces quelques années. Je garderai en mémoire tous nos fous rires, les qpuç et les top-*dixit*, ainsi que toutes les activités physiques et festives que nous avons partagées.

**À Mmes Carole Niang et Corine Tenaud,**

Vous possédez de grandes compétences techniques et avez eu la patience de m'encadrer pour me les enseigner, et toujours de façon joyeuse. Pour cela je vous remercie profondément.

**Aux membres des équipes 2 et 5,**

Chercheurs, techniciens, étudiants, merci pour tous vos conseils tant sur le plan technique que méthodologique. Merci pour vos nombreux coups de main, ainsi que pour tous les bons moments passés en votre compagnie. Un merci tout particulier à Céline Barrial dont la bonne humeur permanente et communicative participe grandement à l'optimisation du moral des troupes.

**Aux Professeurs Alain Favier, Michel Sève et Patrice Faure,**

J'ai effectué certains de mes stages hospitaliers dans vos services respectifs, et je vous remercie pour m'avoir prodigué vos nombreux conseils. J'ai bénéficié de votre confiance pour pouvoir enseigner à l'université en tant qu'interne, puis de votre soutien logistique et moral pour devenir assistant. Je vous adresse à ce titre ma profonde gratitude.

**Au Docteur Jean-Charles Renversez,**

J'ai effectué mon dernier semestre d'interne dans le secteur des électrophorèses que vous dirigez. Je vous remercie pour votre enseignement ainsi que pour la grande compréhension et le soutien dont vous avez fait part à mon égard au moment de la rédaction de cette thèse. Je suis persuadé que notre future collaboration au sein de l'UM BEP sera des plus efficaces.

**Au Docteur Dorra Guergour et à ma co-interne Noémie Delouche**

Merci pour m'avoir remplacé à la validation des "électros" pour que je puisse dégager du temps hospitalier afin de me consacrer pleinement à la rédaction de ce mémoire.

**Au Dr Ausecci** avec qui j'ai entretenu d'excellents rapports. Nos relations professionnelles ont été particulièrement efficaces et agréables. J'espère que notre collaboration se poursuivra sur la même lancée.

**Aux Docteurs Julia Tonini et Xavier Fonrose, grands manitous PS**

Merci pour vos nombreux conseils, qui m'auront permis d'effectuer un cursus PS efficace. Merci aussi pour l'aide logistique, utile à la rédaction de ce mémoire et pour les nombreux articles scientifiques récupérés sur GAEL en urgence !

**À l'Association pour la Recherche sur le Cancer,**

Merci pour l'allocation pré-doctorale de 2ème année de master recherche, qui m'a permis d'initier ce travail sereinement.

Je remercie vivement tous **mes amis** -qui se reconnaîtront- ainsi que toute personne qui cherche désespérément son nom dans ces lignes.

Je remercie tout particulièrement **ma famille** pour son inconditionnel soutien et ce malgré la distance qui peut nous séparer. Merci à mes parents, à Pierre Gras et Claudine Busser pour leurs encouragements constants. Une pensée pour Marie-Jeanne, Madeleine et Charles qui veillent sur moi.

Je tiens à remercier ma sœur **Amandine**, pour tout ce que nous avons vécu ensemble et pour tout ce qu'il nous reste à partager.

Enfin, je remercie tendrement **Isabelle** qui a la patience de me supporter au quotidien. Ton soutien permanent a énormément contribué à la réalisation de cette thèse.



*Je dédie ce travail à mes parents.*

« **Les 10 commandements du scientifique** », tiré des mémoires de Bob Wandapa.

Mon vrai point d'honneur n'est pas d'être toujours dans le vrai. Il est d'oser, de proposer des idées neuves, et ensuite de les vérifier.

**Pierre Gilles De Gennes**

Etre un bon scientifique consiste à passer d'un étonnement à un autre.

**Aristote**

Rien ne nous trompe autant que notre jugement.

**Léonard De Vinci**

C'est l'imagination qui est plus importante que le savoir.

**Albert Einstein**

Il faut admettre que le savant n'est pas l'homme qui fournit les vraies réponses mais celui qui pose les vraies questions.

**Claude Lévi-Strauss.**

La chance ne sourit qu'aux esprits bien préparés.

**Louis Pasteur**

Une manière d'examiner la vérité serait, une fois dans sa vie, de mettre toutes choses en doute autant qu'il se peut.

**René Descartes**

Chercher à s'étonner à propos est le premier pas fait sur la route de la découverte.

**Louis Pasteur**

Imagination - C'est cette partie décevante dans l'homme, cette maîtresse d'erreur et de fausseté, et d'autant plus fourbe qu'elle ne l'est pas toujours; car elle serait règle infaillible de vérité...

**Blaise Pascal**

En sciences, la rigueur vient toujours à bout de l'obstacle.

**Léonard De Vinci**



## **Avant-propos**

Ce travail de thèse a été effectué lors de mon internat de pharmacie au CHU de Grenoble, dans le centre de recherche INSERM/UJF **U823**, au sein de l'équipe 5 "Identification de cibles thérapeutiques et vectorisation de drogues dans le cancer du poumon", à l'institut Albert Bonniot.

Il a donné lieu aux publications/communications suivantes :

### **Articles dans des revues internationales à comité de lecture**

- 1) Busser B., Sancey L., Josserand V., Niang C., Favrot M., Coll JL., et Hurbin A. Amphiregulin promotes BAX inhibition and resistance to gefitinib in Non-Small Cell Lung Cancers. **Molecular Therapy**, 2009. Epub ahead of print. (voir **Article 1**)
  
- 2) Busser B., Sancey L., Josserand V., Niang C., Khochbin S., Favrot M., Coll JL., et Hurbin A. Amphiregulin promotes resistance to gefitinib in Non-Small Cell Lung Cancer cells by regulating Ku70 acetylation. **Molecular Therapy**, 2009. Epub ahead of print. (voir **Article 2**)
  
- 3) Busser B., Coll J-L., and Hurbin A. The increasing role of amphiregulin in non-small cell lung cancer. **Pathologie Biologie**, Décembre 2008. Vol 57 (7-8): 511-12. (voir **annexe VI**).

### **Communications orales**

Busser B., L'Amphiréguline induit la résistance au gefitinib des Cancers Bronchiques Non-à Petites Cellules en contrôlant l'inactivation de BAX par Ku70. Session plénière. Journées de la recherche respiratoire, J2R, octobre **2008**, Grenoble.

Busser B., Amphiregulin induces resistance to gefitinib *via* BAX sequestration by Ku70. Session plénière. XXVII<sup>e</sup> Forum of Cancer Research (French Cancer Society), Eurocancer, juin **2007**, Paris.

### **Communications affichées**

Busser B., Sancey L., Josserand V., Coll JL., et Hurbin A. L'amphiréguline : un nouveau biomarqueur de la résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase dans le cancer du poumon. Journées Internationales de Biologie (JIB), novembre **2009**, Paris.

Busser B., Federspiel I., Rey C., et Hurbin A. Nouvelles stratégies thérapeutiques dans la prise en charge du cancer du poumon. VII<sup>èmes</sup> journées de la Société Française de Pharmacie Oncologique (SFPO), octobre **2009**, Mandelieu.

Busser B., Sancey L., Josserand V., Khochbin S., Coll JL., et Hurbin A. Identification d'un nouveau mécanisme de résistance au gefitinib impliquant l'amphiréguline dans le cancer bronchique non-à petites cellules. Journées de la Recherche Respiratoire (J2R), octobre **2009**, Strasbourg.

Busser B., Sancey L., Niang C., Favrot M., Coll JL., et Hurbin A. Amphiregulin induces resistance to gefitinib in non-small cell lung cancer cell lines. 4<sup>èmes</sup> Journées scientifiques du Cancéropole Lyon Auvergne Rhône Alpes (CLARA), mars **2009**, Archamps.

Busser B., Brambilla E., Moro-Sibilot D., Coll JL., Poulot V., Wislez M., Favrot M., Cadranet J. et Hurbin A. Analyse immunohistochimique des voies de survie mises en jeu dans des adénocarcinomes bronchiques. Journées de la Recherche Respiratoire (J2R), octobre **2008**, Grenoble.

Busser B., Niang C., Favrot M., Coll JL., et Hurbin A. L'Amphiréguline induit la résistance au gefitinib des Cancers Bronchiques Non-à Petites Cellules en contrôlant l'inactivation de BAX par Ku70. Journées de la Recherche Respiratoire (J2R), octobre **2008**, Grenoble.

Busser B., Niang C., Favrot M., Coll JL., et Hurbin A. Amphiregulin-dependant deacetylation of Ku70 promotes BAX inhibition and resistance to gefitinib in Non-Small Cell Lung Cancer cells. 3<sup>èmes</sup> Journées scientifiques du Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes (CLARA), mars **2008**, Lyon.

Busser B., Niang C., Favrot M., Coll JL., et Hurbin A. Amphiregulin-dependant deacetylation of Ku70 promotes BAX inhibition and resistance to gefitinib in Non-Small Cell Lung Cancer cells. Workshop "Apoptosis **2008** - From Mechanisms to applications", Janvier 2008, Luxembourg.

Busser B., Josserand V., Niang C., Favrot M., Coll JL., et Hurbin A. L'Amphiréguline induit la résistance au gefitinib *via* la séquestration de BAX par Ku70. Journées de la Recherche Respiratoire (J2R), octobre **2007**, Paris.

Busser B., Brambilla E., Moro-Sibilot D., Escales L., Poulot V., Wislez M., Cadranel J., Favrot M., Hurbin A. Analyse immunohistochimique de la voie anti-apoptotique mise en jeu par l'Amphiréguline et l'Insulin-like Growth Factor-1 dans les tumeurs bronchiques humaines. Journées de la Recherche Respiratoire (J2R), octobre **2007**, Paris.

Busser B., Niang C., Favrot M.C., et Hurbin A. L'Amphiréguline : un facteur de résistance au gefitinib dans la lignée H358 de cancer bronchique non à petites cellules. 2<sup>èmes</sup> Journées scientifiques du Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes (CLARA), mars **2007**, Grenoble.

Busser B., Niang C., Favrot M.C., et Hurbin A. L'Amphiréguline : un facteur de résistance au gefitinib dans la lignée H358 de Cancer Bronchique Non à Petites Cellules. Journées ARC Jeunes Chercheurs, octobre **2006**, Paris.

## **Prix et distinctions honorifiques**

**Lauréat du Prix "Innovation diagnostiques" de la Société Française de Biologie Clinique (SFBC)**, "l'amphiréguline, un nouveau biomarqueur de la résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase dans le cancer du poumon." Journées Internationales de Biologie (JIB), novembre **2009**, Paris.

**Lauréat du Prix Jacques Rocipon**. "Imagerie non invasive du petit animal par bioluminescence". Décembre **2007**, Grenoble.

**Lauréat du Prix de la Société Française du Cancer (SFC)**, catégorie "recherche fondamentale". XXVII<sup>e</sup> Forum de Cancérologie de la SFC, Congrès Eurocancer. Juin **2007**, Paris.

**Lauréat de la Bourse "Vivier de la recherche médicale"** de la faculté de médecine de l'Université Joseph Fourier. Décembre **2006**, Grenoble.

**Lauréat du prix Alexandre Joël**, Meilleure communication scientifique, catégorie Master 2. Journées ARC Jeunes Chercheurs, Hôpital Pitié-Salpêtrière. Octobre **2006**, Paris

**Allocation Jeune Chercheur**, Association pour la Recherche sur le Cancer, Octobre **2005**.

# **Sommaire**



Remerciements	
Avant-Propos	
Sommaire .....	I
Index des Illustrations.....	VI
Liste des Abréviations.....	VIII
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>PARTIE I. LES CANCERS BRONCHO-PULMONAIRES.....</b>	<b>2</b>
1. ÉPIDEMIOLOGIE DES CANCERS PULMONAIRES .....	2
1.1 <i>Données chiffrées</i> .....	2
1.2 <i>Facteurs étiologiques</i> .....	3
2. CLASSIFICATION HISTOLOGIQUE ET PATHOLOGIQUE DES CANCERS PULMONAIRES .....	5
2.1 <i>Classification histologique selon l'OMS</i> .....	5
a) Les Carcinomes Broncho-pulmonaires à Petites Cellules .....	6
b) Les Carcinomes Broncho-pulmonaires Non-à Petites Cellules.....	6
i) Les carcinomes malpighiens.....	6
ii) Les adénocarcinomes .....	7
iii) Les carcinomes à grandes cellules .....	7
2.2 <i>Classification pathologique TNM (pTNM) selon l'UICC</i> .....	8
3. LE CANCER BRONCHIQUE NON-A PETITES CELLULES (CBNPC) .....	9
3.1 <i>Caractéristiques moléculaires de la carcinogenèse du CBNPC</i> .....	9
3.2 <i>Oncogènes et signaux prolifératifs</i> .....	10
3.3 <i>Gènes suppresseurs de tumeurs et signaux inhibiteurs de croissance</i> .....	11
3.4 <i>Prise en charge thérapeutique du CBNPC</i> .....	13
a) La chirurgie .....	13
b) La radiothérapie.....	14
c) La chimiothérapie anti-cancéreuse .....	15

**PARTIE II. APOPTOSE ET CANCER DU POUMON.....17**

1. GENERALITES SUR L'APOPTOSE.....	18
1.1 Définition et rôles .....	18
1.2 Modifications morphologiques au cours de l'apoptose.....	20
1.3 Principaux effecteurs.....	21
a) Les caspases et leurs cofacteurs.....	21
b) Les facteurs antiapoptotiques et proapoptotiques .....	22
2. DEUX GRANDES VOIES DE SIGNALISATION .....	23
2.1 La voie mitochondriale.....	23
2.2 La voie des récepteurs de mort.....	25
3. DEREGLATION DES VOIES APOPTOTIQUES DANS LES CARCINOMES PULMONAIRES .....	26
3.1 Inactivation de facteurs proapoptotiques.....	26
3.2 Activation de facteurs antiapoptotiques.....	28

**PARTIE III. LE RECEPTEUR DE L'EGF EN CANCEROLOGIE PULMONAIRE.....30**

1. LA FAMILLE DE L'EGFR ET LEURS LIGANDS.....	30
1.1 La famille ERBB .....	30
1.2 Les ligands des récepteurs de la famille EGFR.....	31
2. ACTIVATION DE L'EGFR ET VOIES DE SIGNALISATION .....	32
3. LES FONCTIONS DE L'EGFR.....	34
3.1 Rôle physiologique de l'EGFR.....	34
3.2 Rôle de l'EGFR dans la tumorigenèse .....	34
3.3 Rôle de l'EGFR dans la tumorigenèse pulmonaire.....	35
4. EGFR : UNE CIBLE PRIVILEGIEE DANS LE CBNPC .....	36
4.1 Les anticorps monoclonaux.....	37
a) Le cetuximab.....	37
b) Le panitumumab .....	39
c) Tolérance aux anticorps monoclonaux anti-EGFR .....	39

4.2 Les inhibiteurs de tyrosine kinase de l'EGFR : EGFR-TKI .....	40
a) Le gefitinib .....	41
b) L'erlotinib .....	43
c) Autres inhibiteurs de tyrosine kinase .....	44
d) Tolérance aux TKI .....	44
e) Facteurs de sensibilité ou de résistance aux EGFR-TKI .....	45
i) Marqueurs prédictifs de réponse aux EGFR-TKI .....	45
ii) Marqueurs de résistance .....	46
<b>PARTIE IV. L'AMPHIREGULINE DANS LE CANCER BRONCHIQUE NON-A PETITES CELLULES.....</b>	<b>48</b>
1. L'AMPHIREGULINE: DECOUVERTE, STRUCTURE ET FONCTION.....	48
2. ROLE DE L'AMPHIREGULINE DANS LA CARCINOGENESE GENERALE ET DANS LES CBNPC.	50
2.1 Autosuffisance en facteurs de croissance.....	51
2.2 Potentiel répliatif illimité.....	51
2.3 Angiogenèse tumorale.....	51
2.4 Envahissement tissulaire et métastase .....	52
2.5 Résistance à l'apoptose .....	52
2.6 Résistance au traitement .....	53
<b>OBJECTIFS DE THÈSE.....</b>	<b>54</b>
<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>56</b>
<b>I L'AMPHIREGULINE INDUIT L'INHIBITION DE BAX ET LA RESISTANCE AU GEFITINIB DANS LES CBNPC. ....</b>	<b>56</b>
1.1 PRESENTATION DE L'ETUDE ET PRINCIPAUX RESULTATS .....	56
1.2 ARTICLE 1 .....	57
1.3 RESULTATS COMPLEMENTAIRES .....	59
a) Le gefitinib possède une toxicité variable sur différentes lignées de CBNPC.....	59
b) L'AREG protège les cellules H3255 du gefitinib. ....	59
c) Les SiRNAs anti-AREG ont une activité anti-tumorale <i>in vivo</i> .....	60
1.4 CONCLUSION .....	60

## **II L'AMPHIREGULINE INDUIT LA RESISTANCE DU CBNPC AU GEFITINIB EN REGULANT L'ACETYLATION DE KU70.....61**

2.1 PRESENTATION DE L'ETUDE.....	61
2.2 ARTICLE 2 .....	62
2.3 RESULTATS COMPLEMENTAIRES .....	63
a) Implication des HAT dans la résistance au gefitinib.....	63
b) Implication des HDAC dans la résistance au gefitinib .....	64
c) Autres intermédiaires intervenant dans la voie de résistance .....	65
2.4 CONCLUSION .....	66

## **DISCUSSION.....67**

### **I. UN NOUVEAU MECANISME DE RESISTANCE AU GEFITINIB : LE ROLE PREPONDERANT DE L'AREG.....67**

1. L'AREG : UN ACTEUR DE LA RESISTANCE AU GEFITINIB .....	67
2. MECANISME D'ACTION DE L'AREG .....	69
2.1. <i>Expression de l'AREG et mode d'action autocrine/paracrine/endocrine.....</i>	69
2.2. <i>Mécanisme d'inhibition de l'apoptose : inactivation de BAX par Ku70 .....</i>	70
2.3. <i>Le rôle de l'acétylation.....</i>	71
3. D'AUTRES ACTEURS A IDENTIFIER : LA VOIE RELIANT L'AREG A L'INHIBITION DE L' APOPTOSE.....	72
3.1. <i>L'IGF1-R.....</i>	73
3.2. <i>La voie de signalisation : rôle des PKC et de STAT3.....</i>	74
4. INFLUENCE DES MUTATIONS DE L'EGFR, DE P53 ET DE K-RAS .....	75
4.1 <i>Les mutations de l'EGFR .....</i>	75
4.2 <i>Les mutations de P53 et K-RAS.....</i>	76

### **II. APPLICATIONS CLINIQUES DE NOS RESULTATS .....77**

1. L'AREG : UN BIOMARQUEUR PREDICTIF POUR LE DIAGNOSTIC DE RESISTANCE AU GEFITINIB DANS LE CBNPC ?.....	78
2. L'AREG : UNE CIBLE THERAPEUTIQUE DANS LE CBNPC.....	80
3. AUTRES APPLICATIONS THERAPEUTIQUES .....	83
3.1. <i>Les inhibiteurs de l'IGF1-R.....</i>	83
3.2. <i>Les HDACi.....</i>	84

**CONCLUSION.....86**

**RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....88**

**ANNEXES.....103**

ANNEXE I Classification histologique des cancers pulmonaires.....103

ANNEXE II Principaux effets secondaires des chimiothérapies anticancéreuses .....104

ANNEXE III Référentiel Régional de prise en en charge thérapeutique des CBNPC.....105

ANNEXE IV Essais cliniques français d'oncologie thoracique comprenant l'usage de gefitinib..117

ANNEXE V (1) Profil d'expression de l'AREG dans les tissus sains .....118

ANNEXE V (2) Profil d'expression de l'AREG dans les tissus pathologiques.....119

ANNEXE VI Editorial, Busser, B. et al., **Pathologie biologie**, 2008.....120



# **Index des Illustrations**



## Figures

<b>Figure 1.</b> Evolution des taux de décès par grande catégorie de causes de décès, 1980-2004, France métropolitaine, deux sexes .....	2'
<b>Figure 2.</b> Estimation de l'incidence et de la mortalité des cancers en Europe en 2006.....	2'
<b>Figure 3.</b> Corrélation entre consommation de cigarettes et cancer du poumon.....	3'
<b>Figure 4.</b> Histogenèse du cancer bronchique.....	9'
<b>Figure 5.</b> Les six propriétés élémentaires de la cellule cancéreuse de CBNPC.....	9'
<b>Figure 6.</b> Stratégie thérapeutique du CBNPC.....	12
<b>Figure 7.</b> Modifications ultrastructurales séquentielles de l'apoptose et de la nécrose .....	20'
<b>Figure 8.</b> Structure et mode d'activation des caspases.....	21'
<b>Figure 9.</b> Les deux grandes voies apoptotiques .....	23'
<b>Figure 10.</b> La famille des récepteurs de mort .....	24'
<b>Figure 11.</b> Représentation schématique des quatre récepteurs de la famille ERBB .....	30'
<b>Figure 12.</b> Structure schématique des récepteurs de la famille ERBB.....	30'
<b>Figure 13.</b> Représentation schématique de la libération d'un ligand de l'EGFR.....	31'
<b>Figure 14.</b> Représentation des différents hétérodimères de récepteurs ERBB.....	32'
<b>Figure 15.</b> Représentation schématique de la distribution de l'information issue de l'activation de l'EGFR. ....	33'
<b>Figure 16.</b> Mécanisme d'action des anticorps monoclonaux anti-EGFR .....	37'
<b>Figure 17.</b> Mécanisme d'action des inhibiteurs de l'EGFR.....	40'
<b>Figure 18.</b> Schéma des Relations Structure-Activité des 4-anilinoquinazolines .....	40'
<b>Figure 19.</b> Structure chimique des inhibiteurs réversibles de l'EGFR .....	41'
<b>Figure 20.</b> Mutations de sensibilisation et de résistance aux EGFR-TKI dans les CBNPC...45'	45'
<b>Figure 21.</b> AREG, EGF et TGF- $\alpha$ : Séquences protéiques et homologie structurale.....	48'
<b>Figure 22.</b> Effet du gefitinib sur 7 lignées de CBNPC.....	59'
<b>Figure 23.</b> Effet du gefitinib sur la lignée H3255 .....	59'
<b>Figure 24.</b> Effet des SiRNAs anti-AREG <i>in vivo</i> .....	60'
<b>Figure 25.</b> Implication de Tip60 dans la résistance au gefitinib .....	63'
<b>Figure 26.</b> Implication des HDAC dans la résistance au gefitinib.....	64'
<b>Figure 27.</b> Identification de partenaires impliqués dans la voie de résistance au gefitinib ....	65'
<b>Figure 28.</b> Mécanisme de résistance au gefitinib des cellules de CBNPC.....	86

## **Tableaux**

<b>Tableau 1.</b> Classification pTNM des cancers broncho-pulmonaires selon l'UICC (2002).....	8'
<b>Tableau 2.</b> Principaux oncogènes impliqués dans la carcinogenèse des CBNPC.....	10'
<b>Tableau 3.</b> Principaux gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans la carcinogenèse des CBNPC.....	11'
<b>Tableau 4.</b> Les récepteurs de la famille ERBB et leurs ligands .....	32'
<b>Tableau 5.</b> Niveau d'expression de l'EGFR dans les tumeurs humaines .....	35'
<b>Tableau 6.</b> Caractéristiques pharmacologiques des inhibiteurs de l'EGFR .....	36'
<b>Tableau 7.</b> Principaux anticorps monoclonaux et stades de développement clinique.....	37'
<b>Tableau 8.</b> Stimuli capables d'induire la sécrétion d'AREG .....	49'
<b>Tableau 9.</b> Cancers pour lesquels l'AREG est impliquée .....	50'
<b>Tableau 10.</b> Caractéristiques de sous-groupes de patients sensibles/résistants au gefitinib ..	53'

# Liste des Abréviations



<b>5FU</b>	5-fluoro-uracile
<b>ADAM</b>	A disintegrin and metalloproteinase domain
<b>ADC</b>	<b>Adénocarcinome</b>
<b>ADC-BAC</b>	Adénocarcinome avec composante bronchiolo-alvéolaire
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AIF</b>	Apoptosis Inducing Factor
<b>AKT</b>	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase (ou Protein kinase B)
<b>AMM</b>	Autorisation de mise sur le marché
<b>APE-1</b>	Apyrimidinic endonuclease
<b>APAF-1</b>	Apoptotic protease activating factor 1
<b>AREG</b>	<b>Amphiréguline</b>
<b>ARF</b>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BAD</b>	Bcl2-antagonist of cell death
<b>BAX</b>	Bcl2-associated X protein
<b>BCL-2</b>	B-Cell lymphoma protein 2
<b>BCR-ABL</b>	Breakpoint cluster region-Abelson
<b>BID</b>	BH3 interacting domain death agonist
<b>BH1/2/3</b>	Bcl-2 homology domain 1/2/3
<b>Carc.</b>	Carcinome
<b>CARD</b>	Caspase activation recruitment domain
<b>Caspase</b>	CysteinyI aspartic acid-protease
<b>CBL</b>	Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene (ou E3 ubiquitin-protein ligase)
<b>CBNPC</b>	<b>Cancer bronchique non-à petites cellules</b>
<b>CBP</b>	Creb-binding protein
<b>CBPC</b>	Cancer bronchique à petites cellules
<b>CDK</b>	Cyclin-dependent kinase
<b>c-FLIP</b>	FADD-ICE like inhibitory protein
<b>CHU</b>	Centre hospitalo-universitaire
<b>c-MYC</b>	voir MYC
<b>CRK</b>	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog
<b>DcR</b>	Decoy receptor
<b>DD</b>	Death domain

<b>DED</b>	Death effector domain
<b>DISC</b>	Death inducing signaling complex
<b>DR4/5</b>	Death receptor 4/5
<b>DMLA</b>	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor receptor (facteur de croissance épidermique)
<b>EGFR</b>	<b>Epidermal growth factor receptor (Récepteur de l'EGF)</b>
<b>EGFR-TKI</b>	<b>Inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR</b>
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>EMeA</b>	European Medicines Agency : Agence du médicament européenne
<b>EPG</b>	Épigène
<b>EPR</b>	Épiréguline
<b>ERBB</b>	v-erb-b erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (= EGFR)
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated kinase
<b>ERK1/2</b>	Extracellular signal-regulated kinase ½
<b>ERMETIC</b>	Projet multidisciplinaire et multicentrique national “Évaluation de la Recherche des Mutations de l'EGFR pour le Traitement par les Inhibiteurs de tyrosine kinase des Cancers bronchiques non-à petites cellules”.
<b>ETS</b>	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2
<b>FADD</b>	Fas associated death domain
<b>FAS</b>	Apoptosis Stimulating Fragment (récepteur de mort)
<b>FASL</b>	Fas ligand
<b>FHIT</b>	Fragile histidine triad gene
<b>FISH</b>	Fluorescent <i>in situ</i> hybridization
<b>FOS</b>	FBJ murine osteosarcoma viral (v-fos) oncogene homolog
<b>Gene ID</b>	Numéro d'identification international des gènes
<b>GRB2</b>	Growth factor receptor bound protein 2
<b>HAT</b>	Histone acetyl transferase
<b>hcG</b>	Chorionic gonadotropin
<b>HDAC</b>	Histone déacétylase
<b>HDACi</b>	<b>Inhibiteurs d'histone-déacétylase</b>
<b>HB-EGF</b>	Héparin binding EGF
<b>HER</b>	Human epidermal growth factor receptor (= EGFR)
<b>HSP</b>	Heat shock protein
<b>hTERT</b>	Human telomerase catalytic subunit

<b>IAP</b>	Inhibitor of apoptosis
<b>IDEAL</b>	Essai clinique: Iressa Dose Evaluation in Advanced Lung Cancer
<b>IFCT</b>	Intergroupe français de cancérologie thoracique
<b>IGF1-(R)</b>	Insulin-like growth factor type 1 (receptor)
<b>INTACT</b>	Essai clinique: IRESSA NSCLC Trial Assessing Combination Treatment
<b>INTEREST</b>	Essai clinique: IRESSA Non-small-cell lung cancer Trial Evaluating REsponse and Survival against Taxotere
<b>iPASS</b>	Essai clinique: IRESSA Pan-ASia Study
<b>ISEL</b>	Essai clinique: Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer
<b>JUN</b>	v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog
<b>KO</b>	Knock-out
<b>K-RAS</b>	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
<b>Ku70</b>	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6
<b>LOH</b>	Loss of heterozygosity
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MDM2</b>	Murin double minute 2
<b>MMP</b>	Matrix Metalloprotease
<b>MET</b>	Met proto-oncogene tyrosine kinase (hepatocyte growth factor receptor)
<b>NaBu</b>	Butyrate de sodium
<b>NAM</b>	Nicotinamide
<b>MMP</b>	Matrix metalloproteinase
<b>mTOR</b>	Mammalian target of rapamycin
<b>MTT</b>	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
<b>MYC</b>	Myelocytomatosis oncogene
<b>N-CAM</b>	Neural cell adhesion molecule
<b>Nck</b>	Non-catalytic region of tyrosine kinase
<b>NF-κB</b>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
<b>NRG</b>	Neuréguline
<b>NSCLC</b>	Non-small cell lung cancer
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>OSI-774</b>	Nom chimique de l'erlotinib (TARCEVA <sup>®</sup> )
<b>p53</b>	Protein 53
<b>p90RSK</b>	Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2
<b>PCAF</b>	p300/CBP-associated factor

<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>P-ERK</b>	Phosphorylated ERK
<b>PEI</b>	Polyethylene imine
<b>PI3K</b>	Phosphatidyl inositol 3 kinase
<b>PTEN</b>	Phosphatase and tensin homolog
<b>PKC</b>	Protéine kinase de type C
<b>RAF</b>	RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
<b>RAR<math>\beta</math></b>	Retinoic acid receptor
<b>RAS</b>	Rat sarcoma viral oncogene homolog
<b>RASSF1</b>	Ras association domain family member 1
<b>RB</b>	Retinoblastoma
<b>RT-PCR</b>	Reverse transcription polymerase chain reaction
<b>SAHA</b>	Suberoylanilide hydroxamic acid, ou vorinostat (ZOLINZA <sup>®</sup> )
<b>SCC</b>	Carcinome à cellules squameuses
<b>SHC</b>	Src homology 2 domain containing
<b>SHP1/2</b>	Small heterodimer partner
<b>SiRNAs</b>	Small interfering ARNs (petits ARNs interférants)
<b>SMAC</b>	Second mitochondria-derived activator of caspases
<b>SOS</b>	Son of sevenless
<b>SRC</b>	Sarcoma, Rous sarcoma oncogene
<b>STAT</b>	Signal transducer and activator of transcription
<b>TACE</b>	TNF- $\alpha$ converting enzyme
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	Transforming growth factor-alpha
<b>TKI</b>	<b>Inhibiteur de tyrosine kinase</b>
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor
<b>TNM</b>	Classification histologique "Tumor Node Metastasis"
<b>TRADD</b>	TNF receptor associated death domain
<b>TRAIL</b>	TNF related apoptosis-inducing ligand
<b>TSA</b>	Trichostatin A
<b>UICC</b>	Union internationale contre le cancer
<b>VADS</b>	Voies aéro-digestives supérieures
<b>VEGF(R)</b>	Vascular endothelial growth factor (receptor)
<b>VEMS</b>	Volume expiratoire maximal par seconde
<b>ZD 1839</b>	Nom chimique du gefitinib (IRESSA <sup>®</sup> )

# **Introduction**



Ce travail de thèse a porté sur le rôle de l'Amphiréguline, un ligand du récepteur de l'EGF, dans la résistance à l'apoptose induite par un traitement (le gefitinib) dans les cancers broncho-pulmonaires.

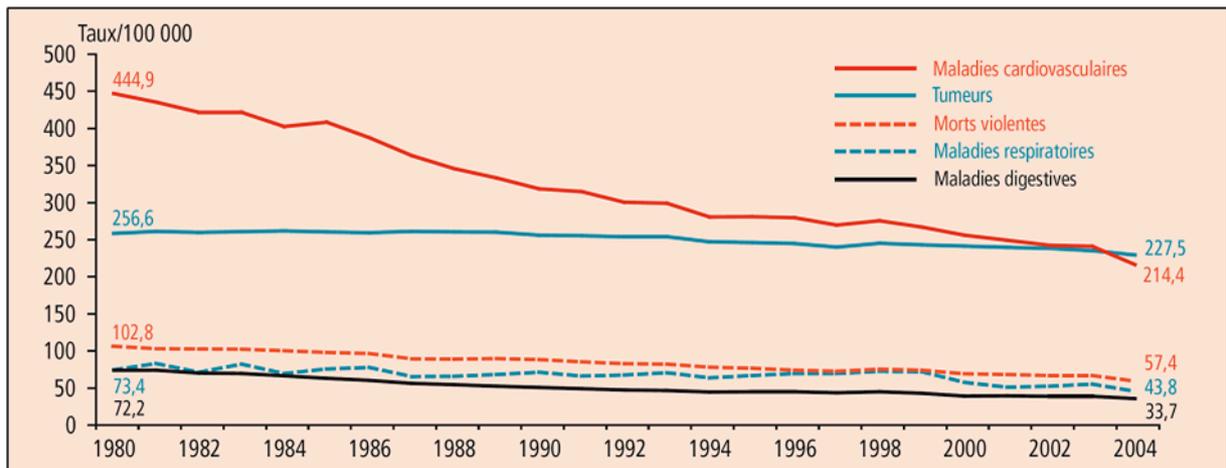
L'introduction de ce manuscrit sera donc composée des quatre parties suivantes :

## **Partie I. LES CANCERS BRONCHO-PULMONAIRES**

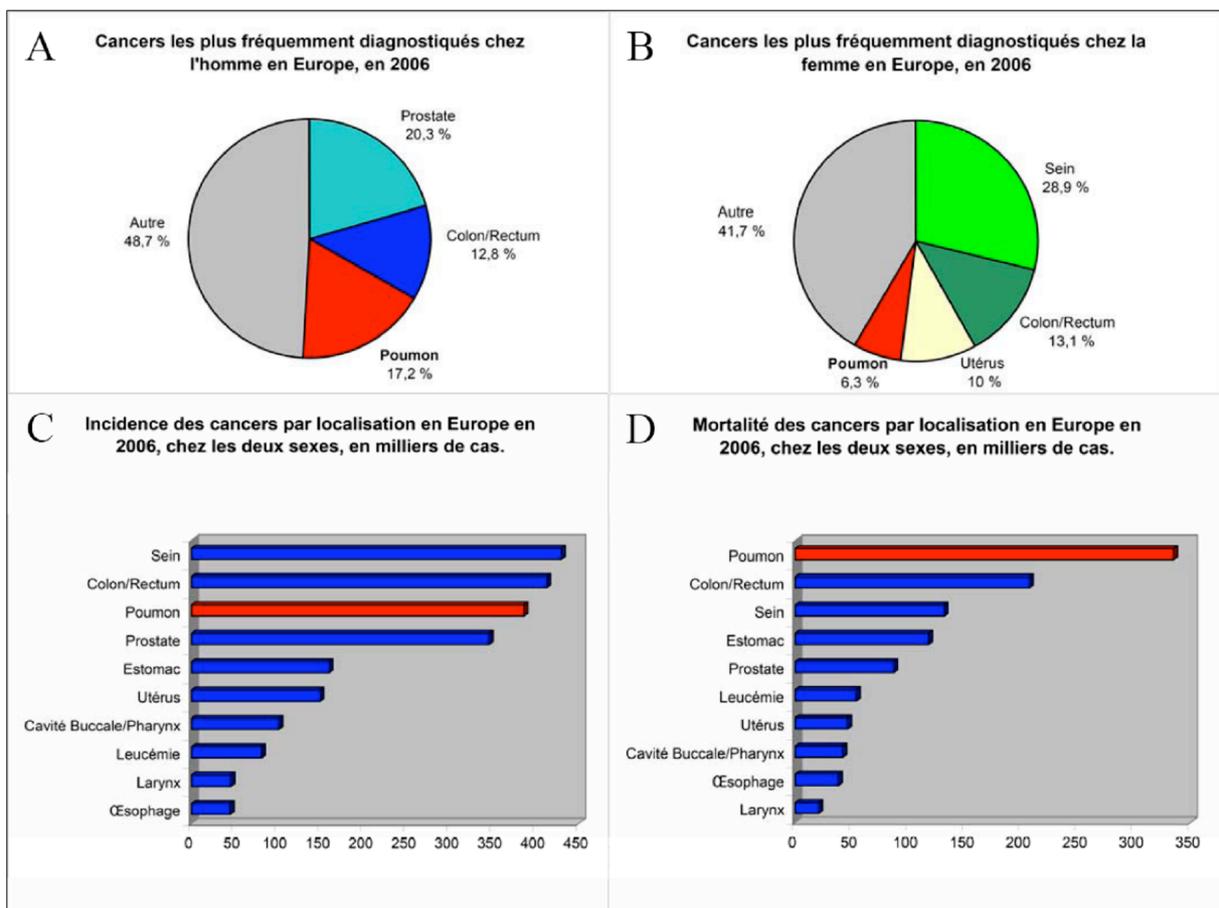
## **Partie II. APOPTOSE ET CANCER DU POU MON**

## **Partie III. LE RÉCEPTEUR DE L'EGF EN CANCÉROLOGIE PULMONAIRE**

## **Partie IV. L'AMPHIRÉGULINE DANS LE CANCER BRONCHIQUE NON-À PETITES CELLULES**



**Figure 1. Evolution des taux\* de décès par grande catégorie de causes de décès, 1980-2004, France métropolitaine, deux sexes (\* Taux de décès standardisé pour 100000)**



**Figure 2. Estimation de l'incidence et de la mortalité des cancers en Europe en 2006**

Incidence des cancers les plus fréquents chez l'homme (A) et chez la femme (B)

Incidence (C) et mortalité (D) des cancers, chez les deux sexes confondus.

*Adapté d'après (Ferlay, et al., 2007)*

## **Partie I. LES CANCERS BRONCHO-PULMONAIRES**

Dans ce chapitre, nous allons décrire l'épidémiologie et l'histopathologie des cancers broncho-pulmonaires, puis nous développerons plus particulièrement les cancers bronchiques non-à petites cellules et leurs approches thérapeutiques.

### **1. Épidémiologie des cancers pulmonaires**

#### **1.1 Données chiffrées**

Longtemps deuxième cause de mortalité en France derrière les maladies cardiovasculaires, le cancer est aujourd'hui la principale cause de mortalité (**Figure 1**) puisque 30% des décès toutes causes confondues sont liés au cancer (Aouba, *et al.*, 2007). De nos jours le cancer du poumon représente 1/5 des décès par cancer. En conséquence, 1 décès sur 15 est attribuable au cancer broncho-pulmonaire, ce qui fait de cette pathologie un problème majeur de santé publique, provoquant plus de 3000 morts par jour dans le monde (Hecht, *et al.*, 2009). En Europe (**Figure 2**), le cancer du poumon est le troisième cancer le plus fréquemment diagnostiqué (386000 cas, soit 12,1% de tous les cas de cancer), après le cancer du sein (13,5%) et le cancer colorectal (12,9%) et il y est la première cause de mortalité par cancer (Ferlay, *et al.*, 2007). Il est important de relever que le cancer du poumon est le seul cancer pour lequel l'incidence est à peine supérieure à la mortalité (**Figure 2**). En France, chaque année, 25000 à 30000 patients décèdent d'un cancer du poumon, soit plus que les cancers du sein, du pancréas et de la prostate réunis (Hill, *et al.*, Mai 2009). Depuis quelques années, le nombre de nouveaux cas de cancers broncho-pulmonaires tend à se stabiliser dans la population masculine, alors qu'une augmentation est constatée dans la population féminine (Eilstein, *et al.*, 2008).

Une étude récente indique que le taux de survie à 5 ans du cancer du poumon reste inférieur à 15% (Brambilla and Gazdar, 2009), ce qui le place au troisième rang des cancers les plus agressifs, derrière les cancers du pancréas et du foie, qui possèdent une survie à 5 ans de 5% et 11%, respectivement (Jemal, *et al.*, 2009). La survie à 5 ans est étroitement liée au stade auquel le cancer broncho-pulmonaire est diagnostiqué. En effet, 50% des patients possédant une tumeur pulmonaire localisée et opérable sont encore en vie 5 ans après le diagnostic.

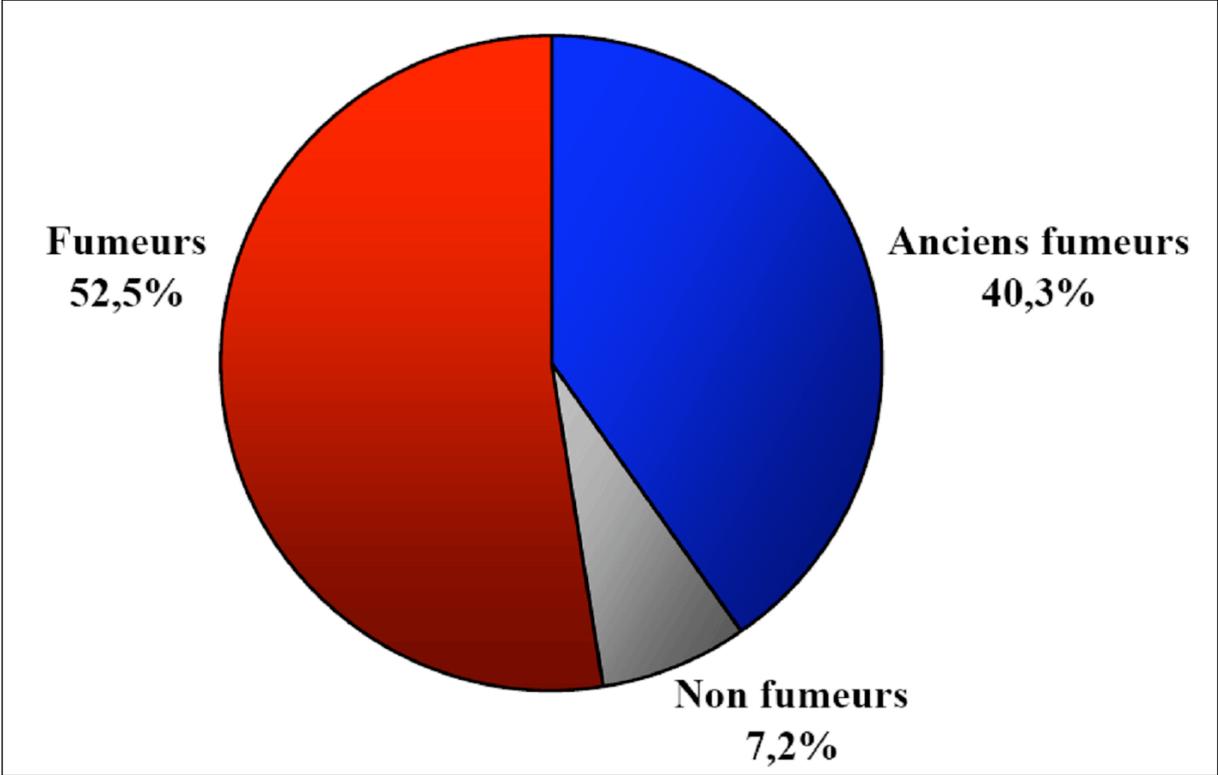


Figure 3. Corrélation entre consommation de cigarettes et cancer du poumon

Inversement, pour une tumeur métastatique (stade IV), moins de 3% des patients seront encore en vie 5 années après le diagnostic.

Au moment du diagnostic, 71% des patients présentent déjà une tumeur de stade avancé (régionale ou métastatique) inopérable. Ces nombreux diagnostics tardifs sont en partie responsables du mauvais pronostic des cancers du poumon.

## **1.2 Facteurs étiologiques**

Le cancer broncho-pulmonaire est l'une des premières maladies pour lesquelles un lien causal avec la consommation de tabac a été montré. Le tabac est responsable de plus de 90% des cancers du poumon (**Figure 3**) c'est pourquoi le meilleur moyen de prévenir le cancer du poumon reste la cessation du tabagisme (Hecht, *et al.*, 2009). En augmentation jusqu'au milieu des années 1980, l'incidence de ces cancers tend aujourd'hui à diminuer chez l'homme, en lien avec une diminution du tabagisme, mais elle continue d'augmenter de façon préoccupante chez la femme (Eilstein, *et al.*, 2008). Cette progression de l'incidence observée chez la femme est liée à la consommation accrue de tabac.

Le risque de survenue d'un cancer broncho-pulmonaire est associé à trois facteurs importants liés au tabagisme : la durée du tabagisme, le nombre de cigarettes fumées quotidiennement et l'âge de début du tabagisme (Le Faou and Scemama, 2005). En France, le nombre de fumeurs diminue, mais le nombre de grands fumeurs et d'adolescents qui fument augmente, de même que s'abaisse l'âge de la première cigarette. Le risque relatif de développer un cancer du poumon dépend de la quantité de tabac consommée. Si ce risque est de 1 pour un non-fumeur, il est à 15 pour une consommation d' ½ paquet de cigarettes par jour, et 40 pour 2 paquets fumés par jour. En moyenne, les fumeurs ont un risque de développer un cancer du poumon 20 fois plus élevé que les non-fumeurs. De plus, selon le modèle développé par Doll et Peto, un triplement du nombre de cigarettes fumées par jour multiplie par trois le risque de cancer, alors qu'un triplement de la durée du tabagisme multiplie par 100 le risque de développer un cancer du poumon (Peto, *et al.*, 2000). Après l'arrêt du tabac, le risque relatif diminue exponentiellement pendant la première année pour revenir pratiquement à 1,5 ou 2, vingt ans après le sevrage tabagique, sans jamais s'annuler (Williams and Sandler, 2001). Il existe également une corrélation entre le développement d'un cancer broncho-pulmonaire et une exposition de longue durée au tabagisme passif, avec un risque relatif évalué à 1,4 (Williams and Sandler, 2001).

Parmi les nombreuses substances chimiques retrouvées dans la fumée de cigarette, plus de 60 sont qualifiées de carcinogènes, et peuvent provoquer l'apparition de cancers du poumon (Hecht, 2003). Parmi ces substances, nous pouvons citer par exemple la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques, dont le benzo- $\alpha$ -pyrène est le chef de file, celle des nitrosamines, des phénols, ou d'autres composés comme le polonium-210 et l'arsenic.

D'autres facteurs peuvent également accroître le risque de cancer broncho-pulmonaire, notamment l'exposition, dans le cadre professionnel (Thiberville and Paris, 2004) à des agents toxiques minéraux tels que l'amiante, à des métaux tels que l'arsenic, le nickel et le chrome ou à des produits à base de pétrole, surtout chez les fumeurs (Alberg and Samet, 2003). L'exposition au radon (gaz souterrain) est également responsable d'une petite partie des carcinomes bronchiques, chez les mineurs notamment. Enfin, différentes études mentionnent d'autres facteurs de risques tels la pollution atmosphérique ou une exposition à des radiations ionisantes (Boffetta, 2004).

Il est également vraisemblable qu'un facteur génétique joue un rôle dans l'étiologie du cancer broncho-pulmonaire, expliquant que moins de 10 à 20% des fumeurs développent un cancer (Brambilla and Gazdar, 2009). Cela pourrait également expliquer l'augmentation du nombre de cas de cancers du poumon chez des personnes qui n'ont jamais fumé (des femmes essentiellement) et qui ne côtoient pas de fumeurs (Hung, *et al.*, 2008).

## **2. Classification histologique et pathologique des cancers pulmonaires**

Différentes classifications coexistent pour caractériser les cancers pulmonaires. On distinguera la classification histologique de la classification pathologique. Dans tous les cas, de telles classifications servent à préciser le pronostic, à adapter la thérapeutique à la clinique, ainsi qu'à comparer les résultats thérapeutiques entre groupes de malades relativement homogènes.

### **2.1 Classification histologique selon l'OMS**

Cette classification anatomopathologique sert à caractériser les différents cancers pulmonaires selon des critères histologiques simples, de manière à être reproductible et donc utilisable par tous les pathologistes. C'est le seul examen indispensable au diagnostic de cancer, il conditionne le traitement du patient et sert également de base aux études biologiques et épidémiologiques (Beasley, *et al.*, 2005). La classification des tumeurs fait souvent intervenir l'histologie sous forme de grades :

grade I : tumeur très différenciée

grade II : tumeur moyennement différenciée

grade III : tumeur totalement indifférenciée

La récente classification de l'Organisation Mondiale de la Santé de 2004 (Travis, *et al.*, 2004) définit toutes les entités histologiques des tumeurs pulmonaires, ainsi que les critères diagnostiques (**Annexe I**). A ce jour, deux principales catégories de tumeurs malignes sont reconnues, notamment en terme de prise en charge thérapeutique : les Carcinomes Broncho-Pulmonaires à Petites Cellules (CBPC) et les Carcinomes Broncho-Pulmonaires Non-à Petites Cellules (CBNPC).

### ***a) Les Carcinomes Broncho-pulmonaires à Petites Cellules***

Les CBPC représentent 15 à 25% des carcinomes broncho-pulmonaires et constituent une entité anatomo-clinique bien individualisée, notamment du fait de leur très grande évolutivité locale et métastatique. Liées dans 95% des cas au tabagisme, ces tumeurs se développent à partir de cellules neuroendocrines, dispersées à l'état normal dans tout l'épithélium bronchique. Elles sont constituées de cellules de petites tailles, rondes ou en "grain d'avoine", avec un rapport nucléo/cytoplasmique élevé. Les CBPC expriment tous au moins un des trois marqueurs suivants de différenciation neuroendocrine : synaptophysine, chromogranine, ou N-CAM. Ces tumeurs ont un haut grade de malignité et sont très invasives, elles ont un index mitotique très élevé et une nécrose tumorale souvent intense. Il existe une forme bénigne appelée **tumeur carcinoïde**, et une forme intermédiaire, la **tumeur carcinoïde atypique**, mais ces cancers sont diagnostiqués dans 70% des cas à un stade avancé. La chirurgie et la radiothérapie sont inefficaces car l'extension médiastinale est quasi-constante et des métastases sont déjà détectables au moment du diagnostic dans plus de 2/3 des cas. Ces cancers sont donc traités par chimiothérapie et leur pronostic est très mauvais, puisque la survie de ces patients n'excède pas 2,5 années.

### ***b) Les Carcinomes Broncho-pulmonaires Non-à Petites Cellules***

Cette catégorie de cancers représente 75 à 85% des cancers bronchiques (Herbst, *et al.*, 2008) et est composée de sous-types histologiques très différents : les carcinomes malpighiens, les adénocarcinomes et les carcinomes à grandes cellules, ou plus généralement, toute entité ne présentant pas de caractéristiques "à petites cellules" (Beasley, *et al.*, 2005). Seule une homologie dans la prise en charge thérapeutique justifie leur association au sein d'une même famille.

#### ***i) Les carcinomes malpighiens***

Également appelés carcinomes épidermoïdes ou carcinomes squameux, ces tumeurs épithéliales malignes représentent 25 à 35% des CBNPC. Leur diagnostic repose sur la présence de cellules présentant des ponts d'union inter-cellulaires et/ou des signes de

kératinisation. Ces tumeurs de différenciation variable, sont également très corrélées à la consommation de tabac (Spiro and Porter, 2002).

*ii) Les adénocarcinomes*

Les adénocarcinomes bronchiques représentent le type histologique le plus fréquemment diagnostiqué, soit 40% des cancers bronchiques. Il s'agit de la forme histologique la plus fréquente de l'homme jeune (moins de 50 ans), de la femme de tout âge et du non-fumeur. Son incidence croissante en Europe correspond à l'augmentation du tabagisme. Le terme adénocarcinome vient du grec *adeno-* (qui se rapporte à une glande) et de *carcinome*, qui désigne un cancer qui s'est développé dans les cellules épithéliales. Ce groupe de tumeurs épithéliales malignes présente des signes de différenciation glandulaire ou de production de mucine. L'étude de l'expression de TTF1 (thyroid transcription factor 1) par les cellules tumorales, présente dans 85% des adénocarcinomes pulmonaires primitifs, peut apporter une aide précieuse pour un diagnostic différentiel avec un adénocarcinome pulmonaire métastatique.

La forme ***bronchiolo-alvéolaire*** correspond à un adénocarcinome présentant une forme non invasive pure, dont les cellules colonisent les parois alvéolaires sans envahir l'interstitium alvéolaire, ni les vaisseaux, ni la plèvre.

*iii) Les carcinomes à grandes cellules*

Il s'agit de tumeurs malignes ne présentant pas de critères de différenciation des carcinomes épidermoïdes, glandulaires ou à petites cellules. Il s'agit donc d'un diagnostic d'exclusion, représentant 20% des patients porteurs de CBNPC. Au sein de cette famille comprenant cinq variantes, deux ont un impact direct sur le pronostic : Le ***carcinome neuro-endocrine à grandes cellules*** d'une part, qui possède au moins 1 des 3 marqueurs endocrines (chromogranine A, synaptophysine ou N-CAM) et qui est de meilleur pronostic. D'autre part, le ***carcinome basaloïde***, qui possède le pronostic le plus péjoratif des carcinomes à grandes cellules. Les ***carcinomes adénosquameux*** et ***sarcomatoïdes*** sont deux entités rarement diagnostiquées.

Susclaviculaire		Médiastinal		Hilaire		GANGLIONS LYMPHATIQUES (N)	STADE IV M 1 (quelque soit T, N)
Scalène (homo-contro-latéral)	(contro-latéral)	(homo-latéral)	Sous-carénaire	(controlatéral)	(homolatéral)		
+	/	/	+	/	+	<b>N3</b>	<b>STADE III B</b> <b>STADE III A</b> <b>STADE II A</b> <b>STADE II B</b> <b>STADE I A</b> <b>STADE I B</b> <b>STADE II B</b>
-	-	-	+&/+	-	-	<b>N2</b>	
-	-	-	-	-	+&/+	<b>N1</b>	
-	-	-	-	-	-	<b>N0</b>	

<b>STADE 0</b> (Tis, N0, M0)	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>TUMEUR PRIMITIVE (T)</b>
	a&b&c ≤ 3 cm	a/b/c/d > 3 cm	(a&c)/b/d quelconque	(a&c)/d quelconque	<b>Critères</b>
	Pas d'invasion à proximité de la bronche lobaire	Bronche souche (≥ 2 cm de la carène)	Bronche souche (< 2 cm de la carène)	-	<b>a. Taille</b>
	Entourée par du poumon ou de la plèvre viscérale	Plèvre viscérale	Paroi thoracique/ diaphragme/ plèvre médiastinale/ péricarde pariétal	Médiastin/ trachée/ cœur/ gros vaisseaux/ œsophage/ corps vertébral/ carène	<b>b. Localisation endo-bronchique</b>
	-	Atelectasie/ Pneumonie obstructive s'étendant jusqu'à la région hilare mais ne concerne pas le poumon entier	Atelectasie/ Pneumonie obstructive du poumon entier	Épanchement pleural malin/ péricardique ou nodules tumoraux satellites dans un autre lobe du poumon	<b>c. Invasion locale</b>
					<b>d. Autre</b>

**MÉTASTASES (M)**

**M0 = Absentes**

**M1 = Présentes**

Tis : Carcinome *in situ*

(&= et) (/= ou) (&/= et/ou)

**Tableau 1. Classification pTNM des cancers broncho-pulmonaires selon l'UICC (2002)**

*Adapté d'après (Lababede, et al., 1999)*

## **2.2 Classification pathologique TNM (pTNM) selon l'UICC**

C'est la classification d'extension tumorale, elle intervient après le diagnostique histologique, sert de référence au clinicien pour adapter la thérapeutique et constitue la base pour toute étude épidémiologique. Elle permet d'apprécier le stade histopathologique d'extension d'une tumeur (pTNM) après examen macroscopique et microscopique de la pièce de résection par le pathologiste.

La classification TNM est recommandée par l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC), qui a établi la 6<sup>ème</sup> classification pTNM des cancers bronchiques en 2002 (**Tableau 1**)

Le stade histopathologique reflète le degré d'invasion tumorale. La classification pTNM est basée sur la prise en compte de trois éléments :

**T** = taille et/ou extension de la **T**umeur primitive

**N** = présence ou absence de métastase ganglionnaire (ganglions locorégionaux ou “ **N**odes ”)

**M** = présence ou absence de **M**étastase(s) à distance

La classification pTNM permet alors d'évaluer l'avancement de la tumeur par stades, et d'après le **Tableau 1**, on distingue :

- Stade 0 : Cancer *in situ* (non invasif)
- Stade I : Invasion très localisée, sans métastase à distance
- Stade II : Extension limitée localement et/ou atteinte ganglionnaire satellite minime
- Stade III : Atteinte locale importante et/ou atteinte ganglionnaire satellite majeure
- Stade IV : Tumeur avec métastase(s)

Le CBNPC est la forme de cancer bronchique diagnostiquée dans la plus grande majorité des cas (85%), à des stades souvent avancés. C'est cette famille histologique qui sera principalement étudiée dans cette thèse et que nous allons décrire dans le paragraphe suivant.

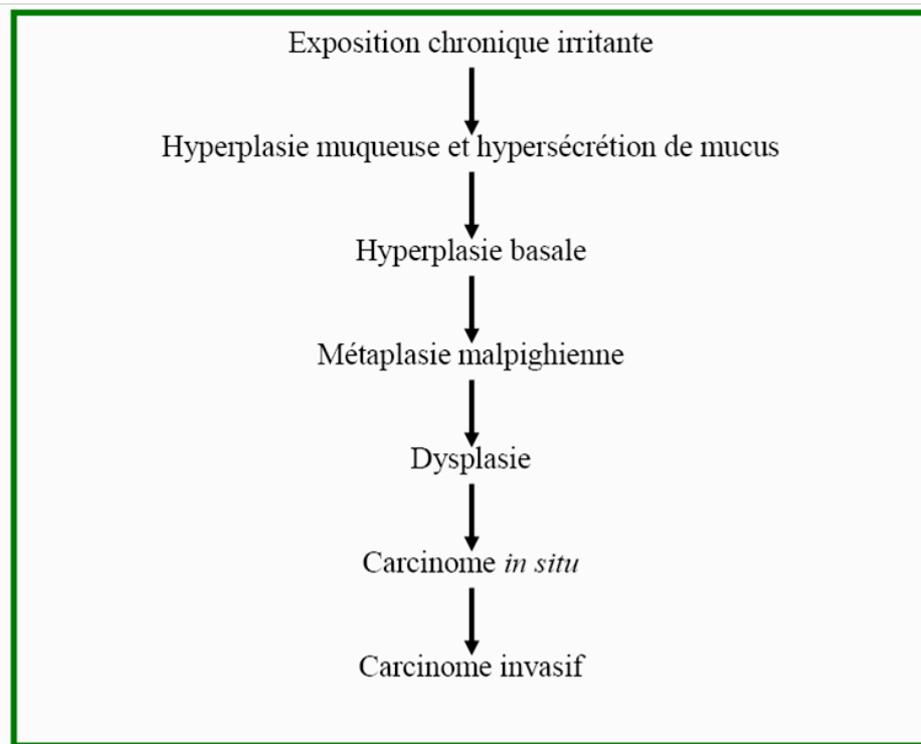


Figure 4. Histogenèse du cancer bronchique, d'après (Madelaine and Zalczman, 2005)

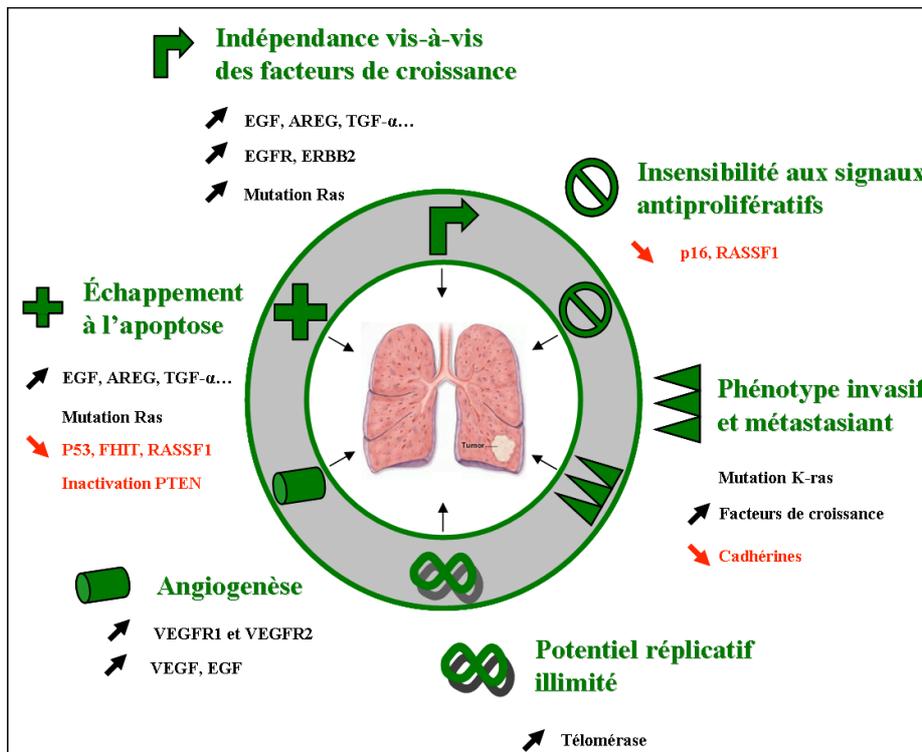


Figure 5. Les six propriétés élémentaires de la cellule cancéreuse de CBNPC

Adapté d'après (Hanahan and Weinberg, 2000). En noir apparaissent les oncogènes, et en rouge les gènes suppresseurs de tumeurs. Il est possible d'obtenir un phénotype tumoral complet à partir de l'activation d'un nombre réduit à trois ou quatre de ces gènes.

### 3. Le Cancer Bronchique Non-à Petites Cellules (CBNPC)

#### 3.1 Caractéristiques moléculaires de la carcinogenèse du CBNPC

La transformation d'une cellule épithéliale bronchique normale en cellule cancéreuse résulte de la rupture de l'équilibre entre l'expression de gènes "prolifératifs", favorisant le déroulement de la division ou de la différenciation cellulaire (proto-oncogènes), et de gènes "antiprolifératifs" (gènes suppresseurs de tumeurs), freinant le cycle cellulaire ou induisant la mort cellulaire programmée (apoptose). Cette accumulation séquentielle, sur une période relativement longue, d'anomalies génétiques et épigénétiques dérégule l'homéostasie de la cellule épithéliale de l'arbre respiratoire. Ces anomalies se traduisent par des mutations ponctuelles à l'échelle nucléotidique, ou par des anomalies qualitatives (réarrangements, délétions, amplification génique) ou quantitatives (aneuploïdie) à l'échelle chromosomique. Le concept de carcinogenèse par étapes successives (carcinogenèse bronchique multi-étapes) s'illustre ainsi parfaitement dans le cancer du poumon. En effet, les études histologiques ont révélé un véritable continuum lésionnel au niveau de l'épithélium bronchique, allant de l'hyperplasie basale au carcinome invasif, en passant par des stades de métaplasie malpighienne, de dysplasies légères à sévères, puis de carcinome *in situ* (**Figure 4**).

Le modèle de carcinogenèse bronchique (**Figure 5**) correspond au modèle de carcinogenèse générale décrit par Hanahan et coll. selon lequel les anomalies génétiques accumulées sont responsables de l'acquisition par la cellule bronchique normale, des six propriétés élémentaires qui vont en faire une cellule tumorale (Hanahan and Weinberg, 2000) :

- l'indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance (ou autosuffisance) qui permet aux cellules de rester dans un état de prolifération active et soutenue,
- l'insensibilité vis-à-vis des signaux inhibiteurs de croissance,
- la capacité d'échapper à la mort cellulaire programmée ou apoptose,
- l'acquisition d'un potentiel répliatif illimité par division illimitée des chromosomes (échappement à la sénescence répliatif),
- la capacité à induire un réseau de néovascularisation (pour les apports de nutriments ou d'oxygène),
- l'acquisition d'un phénotype "mobile" et invasif, donnant à la cellule tumorale la capacité de s'implanter à distance de son tissu d'origine (pouvoir métastasant).

Nom	Fonction	Mécanisme d'activation	Fréquence de surexpression
<b>EGFR</b>	Récepteur membranaire à tyrosine kinase	. Mutations somatiques pour 31% des adénocarcinomes . Autres : dérégulation transcriptionnelle et traductionnelle	60-80% de CBNPC
<b>ERBB2</b>	Récepteur membranaire à tyrosine kinase	. Amplification génique . Mutation dans 4% des ADC	20% adénocarcinomes
<b>K-Ras</b>	Protéine G sous-membranaire Transduction du signal de croissance	. Mutations somatiques des codons 12, 13 et 16	15-30% des CBNPC
<b>c-Myc</b>	Facteur de transcription	. Amplification génique . Dérégulation transcriptionnelle	50% des cancers bronchiques
<b>PI3 kinase</b>	Protéine kinase sous-membranaire Transduction du signal de croissance	. Amplification génique . Mutation somatique	4% des CBNPC

**Tableau 2. Principaux oncogènes impliqués dans la carcinogenèse des CBNPC**

*D'après (Risch and Plass, 2008), (Sanchez-Cespedes, 2003) and (Breuer, et al., 2005)*

### **3.2 Oncogènes et signaux prolifératifs**

Les proto-oncogènes codent pour des gènes intervenant dans l'une des étapes de transmission d'un signal de croissance stimulant la division cellulaire. Ils comportent, entre autres, des facteurs de croissance et leurs récepteurs, des protéines transductrices associées aux membranes, et des protéines nucléaires impliquées dans le contrôle de la transcription et/ou de la réplication du cycle cellulaire. Dans les cellules tumorales, la modification de structure (altération qualitative) ou d'expression (altération quantitative) de ces gènes en réponse à des mutations, amplifications géniques, translocations chromosomiques mais aussi d'anomalies épigénétiques conduit à leur activation constitutive sous la forme d'oncogènes. Ces modifications confèrent aux oncogènes leur capacité d'induire (seuls ou en coopération) le phénomène de “transformation tumorale”, certains étant capables d'immortaliser les cellules (*C-myc*), ou d'induire l'acquisition d'un phénotype tumoral (*Ras*). Par ailleurs ces gènes sont dominants au niveau cellulaire car leur pouvoir transformant repose sur la modification d'un seul de leurs allèles (paternel ou maternel).

De nombreux oncogènes ont été identifiés à ce jour, la liste des oncogènes les mieux caractérisés au cours de la carcinogenèse bronchique apparaît dans le **Tableau 2**.

Certains oncogènes sont de faibles marqueurs pronostiques mais sont impliqués dans la réponse aux traitements. C'est le cas du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) dont les mutations prédisent la réponse au traitement par les inhibiteurs de tyrosine-kinase, gefitinib (IRESSA<sup>®</sup>) et erlotinib (TARCEVA<sup>®</sup>) utilisés dans la prise en charge thérapeutique de certains adénocarcinomes pulmonaires (Sharma, *et al.*, 2007). A l'inverse, la mutation de *K-RAS* prédit la résistance aux traitements par les inhibiteurs de tyrosine kinase (Pao, *et al.*, 2005) mais également une activation constitutive et non régulée des cascades en aval des récepteurs membranaires des facteurs de croissance conduisant à l'indépendance vis-à-vis de facteurs de croissance et favorisant la survie et la prolifération cellulaire.

Outre les oncogènes cités ci-dessus, les facteurs de croissance tels que l'amphiréguline (AREG), l'EGF (Epidermal Growth Factor), l'IGF1 (Insulin-like Growth Factor type 1) ou le TGF- $\alpha$  (Transforming Growth Factor alpha) sont également impliqués dans la tumorigenèse broncho-pulmonaire. Leur surexpression ainsi que celle de leurs récepteurs par les cellules tumorales sont à l'origine de boucles de croissance autocrines ou paracrines qui permettent d'acquérir une indépendance en facteurs de croissance par rapport au milieu extracellulaire.

Nom	Fonction	Mécanisme d'inactivation	Fréquence d'altération
<b>p53</b>	"Gardien du génome" Facteur de transcription Contrôle le cycle cellulaire Réparation ADN/Apoptose	. Transversion G→T (tabac) . Délétions . Petites insertions	75 à 100% des CBPC 42% des CBNPC 75% des Carc. Epiderm 50% des ADC
<b>p16</b>	Kinase dép. des cyclines ou CDK Régule transition G1/S	. Hyperméthylation promoteur . LOH ou mutations ponctuelles . Délétions homozygotes	50% des C.Pulm
<b>PTEN</b>	Tyrosine-phosphatase	. Hyperméthylation promoteur . Délétions homozygotes . Mutations ponctuelles	20% des C.Pulm
<b>FHIT</b>	Dinucleoside hydrolase Rôle proapoptotique	. LOH par perte du bras court 3p . Délétions homozygotes	40% des CBNPC
<b>RASSF1</b>	Régulateur négatif de G1/S et rôle proapoptotique	. LOH par perte du bras court 3p . Hyperméthylation promoteur	60% des CBPC 30-40% des CBNPC
<b>RAR-β</b>	Récepteur nucléaire	. Hyperméthylation promoteur	40-60% des CBNPC

**Tableau 3. Principaux gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans la carcinogénèse des CBNPC.** CBPC = cancer bronchique à petites cellules. CBNPC = cancer bronchique non-à petites cellules. Carc Epiderm = carcinome épidermoïde. ADC = Adénocarcinome. C.Pulm = Cancer du poumon. *D'après (Risch and Plass, 2008), (Sanchez-Cespedes, 2003) and (Breuer, et al., 2005).*

La surexpression de facteurs de croissance impliqués dans l'angiogenèse, incluant les cytokines VEGFs (Vascular Endothelial Growth Factor) (Merrick, *et al.*, 2005), et de leurs récepteurs VEGFR1, VEGFR2, neuropillines 1 et 2 (Lantuejoul, *et al.*, 2003) interviennent également de manière non négligeable dans le développement de ces cancers.

Enfin l'activation d'un mécanisme de maintien de la longueur des télomères est indispensable à l'immortalisation des cellules humaines et semble constituer une étape nécessaire de la transformation néoplasique pulmonaire. En ce sens, l'acquisition d'une activité télomérase élevée est observée dans la quasi-totalité des carcinomes à petites cellules et dans 85% des CBNPC (Lantuejoul, *et al.*, 2007).

### **3.3 Gènes suppresseurs de tumeurs et signaux inhibiteurs de croissance**

L'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur est l'une des étapes les plus précoces de la carcinogenèse bronchique. Ces gènes exercent à l'état normal une fonction régulatrice négative sur la prolifération cellulaire. Les produits de ces gènes sont capables de contrecarrer l'effet des oncogènes et d'inhiber le phénotype tumoral d'où leur nom de gènes suppresseurs de tumeur (ou anti-oncogènes). Leur inactivation lève donc une contrainte critique sur la prolifération cellulaire et contribue à la tumorigénicité. Ils sont dits récessifs au niveau cellulaire car leurs deux allèles, d'origine paternelle et maternelle, doivent être altérés pour inactiver leurs fonctions. En règle générale, deux événements moléculaires sont nécessaires à leur inactivation: 1) La délétion d'un large fragment d'ADN chromosomique sur un allèle ou perte d'hétérozygotie (LOH=loss of heterozygosity), 2) L'inactivation de l'allèle restant par mutation ou altération épigénétique.

Le **Tableau 3** représente les principaux gènes suppresseurs de tumeur dont l'expression est altérée ou perdue dans les CBNPC.

Au cours du processus de tumorigenèse broncho-pulmonaire, les gènes suppresseurs de tumeur précocement et préférentiellement inactivés codent pour des protéines qui appartiennent aux deux grandes voies de signalisation P16<sup>INK4a</sup>/RB-E2F et P53/P14ARF-MDM2.

Ces voies contribuent au bon déroulement du cycle cellulaire et au maintien de l'intégrité du génome en raison de leur implication au niveau des points de contrôle activés lors du passage

entre les phases G1-S et G2-M du cycle cellulaire. Ces points de contrôle (check-points) sont des centres décisionnels dictant à la cellule son devenir, selon les signaux qu'elle reçoit (altération de l'ADN par exemple) : progression à travers le cycle, arrêt du cycle pour réparer l'ADN endommagé et/ou mort par apoptose si la cellule est incapable de réparer les lésions génomiques.

Dans les cancers bronchiques, la voie de signalisation RB/P16<sup>INK4a</sup> est quasiment toujours altérée. Dans 90% des CBPC, *RB* n'est pas exprimé. Inversement, dans les CBNPC, *RB* est présent mais est inactivé par hyperphosphorylation suite à la perte de la protéine p16<sup>INK4a</sup> (50% des cas), délétion du locus *INK4a* (1/3 des cas) ou hyperméthylation du promoteur de *RB* (Gazzeri, *et al.*, 1998).

La voie antiproliférative de signalisation dépendant de la protéine p53 est inactivée dans 75-100% des CBPC et dans 50% des CBNPC (Zochbauer-Muller, *et al.*, 2002). L'inactivation de ce facteur de transcription a lieu dans 80% des cas par délétion d'un premier allèle suivie d'une mutation ponctuelle sur l'allèle du chromosome restant. P53 induit l'expression d'effecteurs variés qui conduisent à un arrêt du cycle cellulaire pour permettre, soit la réparation de l'ADN, soit la mort cellulaire programmée. Son inactivation constitue un facteur majeur d'échappement à l'apoptose.

Parallèlement aux anomalies touchant les voies RB/p53, la très haute fréquence de la perte allélique au niveau du bras court du chromosome 3 (90% des CBPC et 70% des CBNPC) a permis d'identifier plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs dans cette région du génome, parmi lesquels *FHIT* (Fragile Histidin Triad), *RARβ* (Retinoic Acid Receptor β), *RASSF1* (Ras Association domain Family protein 1A, dont l'expression est perdue dans 30 à 40% des CBNPC), *ROBBO1/DUTTI* (Roundabout 1/Deleted in U Twenty Twenty), *SEMA 3F* (Semaphorin 3F), et *SEMA 3B* (Semaphorin 3B). D'autres gènes suppresseurs de tumeurs sont potentiellement impliqués mais de manière moins fréquente tels que *PTEN/MMAC1* (Phosphatase and Tensin homolog/Mutated in Multiple Advanced Cancer 1), *hOGGI* (Human 8-oxoguanine DNA glycosylase), *CDH-1* (E-Cadhérine) dont la perte d'activité (20% des CBNPC) favorise le potentiel invasif (Herbst, *et al.*, 2000), et *CDH-13* (H-Cadhérine).

Les phénomènes épigénétiques, comme l'hyperméthylation des promoteurs, entraînent la perte d'expression du gène concerné. Dans le cas de PTEN, qui régule négativement la voie antiapoptotique de PI3K-AKT, l'hyperméthylation de son promoteur (6% des CBNPC) entraîne un signal de survie constitutif (Soria, *et al.*, 2002).

### **3.4 Prise en charge thérapeutique du CBNPC**

Plus de 75% des cancers broncho-pulmonaires sont des CBNPC. Leur traitement, dépendant du type histologique et de la classification pTNM d'extension de la maladie, fera appel à la chirurgie, à la radiothérapie et à la chimiothérapie. Cependant, d'autres critères secondaires comme l'âge du patient, son état général et/ou ses fonctions cardiaques et respiratoires peuvent contre-indiquer certains traitements, et contraindre le clinicien à opter pour des thérapeutiques alternatives, voire à instaurer un traitement de soins de support.

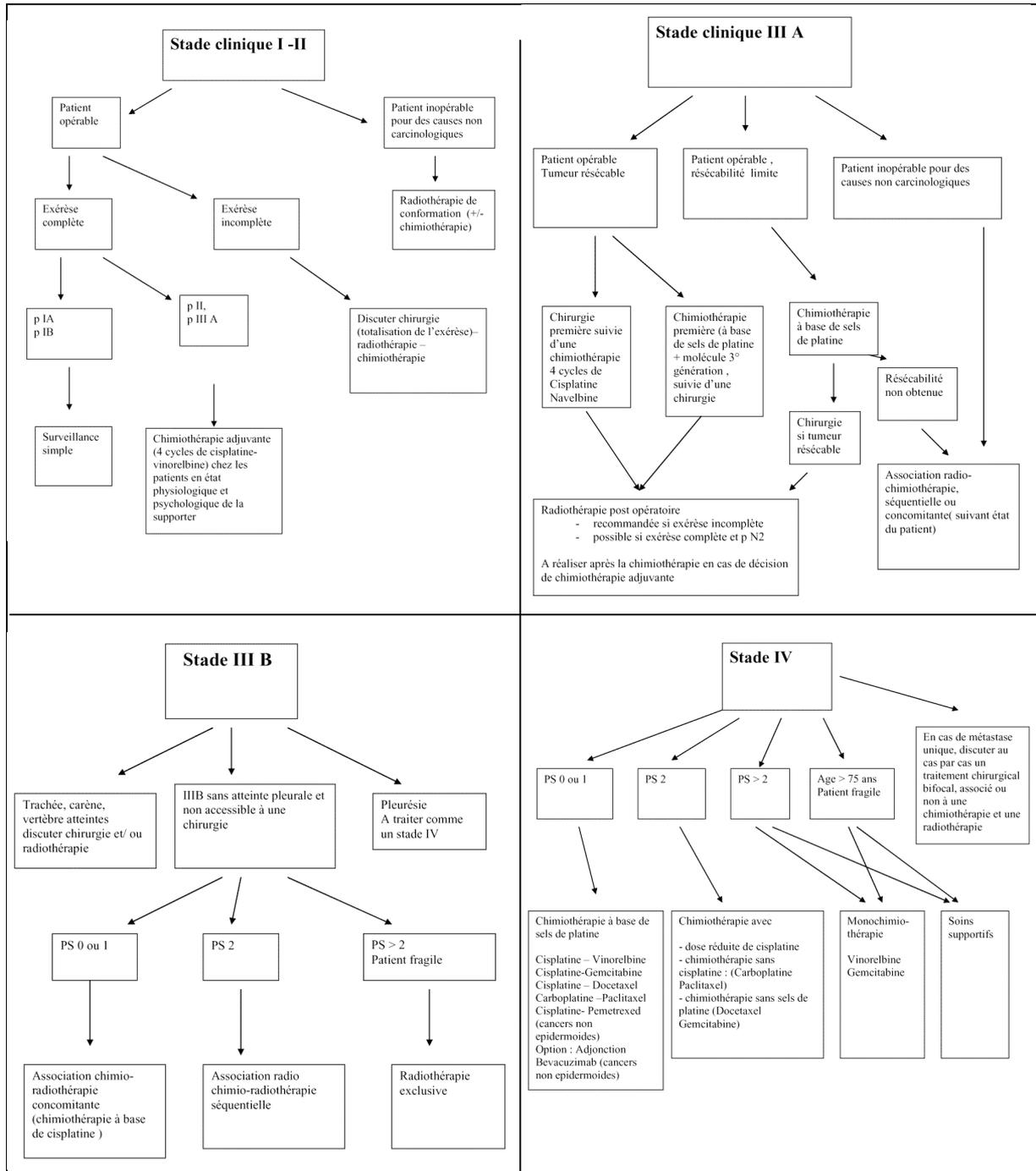
Trois possibilités de traitement sont envisageables selon l'extension de la tumeur (**Figure 6**) :

- Le patient est opérable (stade I, II : N0, N1) : le traitement consiste en une exérèse chirurgicale de la tumeur et une chimiothérapie adjuvante sera discutée.
- La tumeur est localement avancée (stade III A-B) : l'association radio-chimiothérapie est recommandée.
- La tumeur est métastatique (stade IV) : c'est le cas le plus fréquent (>60%)
  - Si l'état général est peu dégradé et l'amaigrissement faible, la chimiothérapie sera préférée
  - Si l'état général est altéré et l'amaigrissement important, seul un traitement de soins supportifs sera mis en place.

De nombreux traitements coexistent dans la prise en charge du CBNPC. Cette diversité traduit leur efficacité limitée, rappelant que le cancer du poumon est plus facile à prévenir (cessation du tabagisme) qu'à traiter. Seules les méthodes de traitement à visée curative seront décrites ci-après.

#### ***a) La chirurgie***

La chirurgie est à la fois le plus ancien traitement des cancers bronchiques et le plus efficace (Martini, 1990, Shields, 1993). Cependant, elle ne doit être envisagée que dans un but curatif, justifiant une grande rigueur dans ses indications. Actuellement, deux possibilités sont offertes au chirurgien en fonction de l'indication :



**Figure 6. Stratégie thérapeutique du CBNPC**

D'après le référentiel régional Rhône Alpes Cancer Bronchique Non à Petites Cellules 2008  
 (Voir Annexe III)

i) **La lobectomie** simple (exérèse d'un lobe pulmonaire), ou élargie, voire **la bilobectomie**, pour les cancers périphériques de stade N0 ou N1. Les résections limitées à moins d'un lobe sont considérées comme insuffisantes.

ii) **La pneumectomie** (exérèse d'un poumon) pour les cancers centraux avec atteinte hilare ou scissurale, ainsi que pour les cancers périphériques avec dépassement scissural et/ou métastases ganglionnaires hilaires ou scissurales.

Dans tous les cas un curage ganglionnaire peropératoire est systématiquement réalisé. Les complications de la chirurgie sont importantes (VEMS réduit de 20% pour les lobectomies et de 50% pour les pneumectomies), voire fatales (1 à 3% dans les lobectomies, 5 à 8% dans les pneumectomies chez les patients de plus de 70 ans). Au total, seul un patient sur quatre est opéré.

### **b) La radiothérapie**

La radiothérapie est la deuxième thérapeutique qui a fait la preuve de son efficacité dans le traitement des CBNPC (Dautzenberg and Choukroun, 1998). Plusieurs indications sont envisageables :

- **La radiothérapie exclusive**, pour les cancers de stade I et II cliniquement inopérables et de diamètre inférieur à 5 cm.

- **La radiothérapie adjuvante**, associée à la chirurgie si la résection est incomplète ou associée à la chimiothérapie dans le traitement des tumeurs inopérables et localement avancées.

Les doses administrées doivent être au moins égales à 60 Grays (Gy) en cas de lésions macroscopiques (sur la tumeur ou les adénopathies). La radiothérapie se décompose classiquement en séances de 2 Gy par jour, 5 jours par semaine, pendant six semaines (soit 30 séances). Les doses faibles (40 Gy) sont jugées inefficaces.

De nouvelles modalités de radiothérapie ont été développées, notamment la radiothérapie hyperfractionnée (plusieurs séances de moindre irradiation par jour), et la radiothérapie en association concomitante à la chimiothérapie. Le but est à chaque fois d'augmenter les doses et donc l'effet biologique reçu par la tumeur, tout en diminuant les effets secondaires sur le

tissu normal. L'effet secondaire le plus constant de la radiothérapie est l'œsophagite, suivi par la fibrose pulmonaire des zones irradiées. Leur degré de sévérité peut forcer les cliniciens à réduire les doses, à espacer voire à interrompre les séances de radiations.

### *c) La chimiothérapie anti-cancéreuse*

Il s'agit d'un traitement systémique, par opposition aux traitements locorégionaux, donc particulièrement indiqué pour les cancers non opérables, dans les maladies disséminées ou à haut risque de dissémination.

#### *i) Les chimiothérapies conventionnelles.*

La sensibilité à la chimiothérapie varie de façon très importante en fonction du type histologique de la tumeur. Le taux de réponse moyen à la chimiothérapie est de l'ordre de 30% (Vignot and Besse, 2007). L'usage de molécules cytotoxiques pour traiter le CBNPC est conditionné par le stade de la maladie, l'état général du patient, et la présence éventuelle de comorbidités. Les nombreux effets indésirables, dont la nature et la puissance sont dose- et molécule-dépendants (**Annexe II**), peuvent contraindre le clinicien à abandonner le traitement. Le maniement des agents anticancéreux est souvent difficile en raison de leurs toxicités parfois létales. Les indications thérapeutiques doivent toujours tenir compte du rapport entre la toxicité et le bénéfice attendu pour un patient.

La monochimiothérapie n'a que peu d'intérêt, mais elle peut être justifiée dans certaines indications (Sculier and Moro-Sibilot, 2009). On associe plus fréquemment deux ou trois molécules ayant des mécanismes d'action différents au sein de protocoles de **polychimiothérapie**.

Actuellement le traitement standard est la bithérapie basée sur un doublet comprenant un sel de platine (cisplatine (CISPLATYL<sup>®</sup>) ou carboplatine (PARAPLATINE<sup>®</sup>). Ce sel est associé à une molécule de 3<sup>ème</sup> génération. Il s'agira de la vinorelbine (NAVELBINE<sup>®</sup>) si une cure de radiothérapie concomitante est prévue, de la gemcitabine (GEMZAR<sup>®</sup>) en absence de radiothérapie ou du paclitaxel (TAXOL<sup>®</sup>) (Schiller, *et al.*, 2002). Cependant de nombreux protocoles coexistent (**Annexe III**) et permettent aux cliniciens d'adapter au mieux le traitement en fonction du patient et de sa pathologie.

ii) ***Les thérapies ciblées.***

Face à l'échec des traitements conventionnels, de nouvelles approches thérapeutiques sont nécessaires. Notre compréhension de la biologie moléculaire des tumeurs a beaucoup augmenté et a permis de développer des agents sélectifs appelés "thérapies moléculaires ciblées", pour cibler spécifiquement les voies responsables de la croissance, de la prolifération ou encore de l'angiogenèse tumorale et épargner le tissu sain. L'utilisation de ces nouveaux médicaments permet d'améliorer les taux de réponses et la survie (Vignot and Besse, 2007).

Une récente revue de Mahalingam *et al.* présente les molécules de thérapies ciblées qui ont une autorisation de mise sur le marché pour le traitement des CBNPC, mais également les molécules en cours d'évaluation clinique (Mahalingam, *et al.*, 2009).

L'angiogenèse tumorale fût la première cible validée avec succès dans le cancer bronchique. La récente évaluation de l'étude clinique de Phase III AVAiL (Avastin for Lung Cancer) montre l'efficacité du bevacizumab (AVASTIN<sup>®</sup>), un anticorps monoclonal anti-VEGF, en première ligne du CBNPC en association avec une chimiothérapie par paclitaxel-carboplatine (Reck and Crino, 2009, Stinchcombe and Socinski, 2009). Ce traitement, déjà utilisé dans le cancer colorectal, améliore de 30% la survie sans progression et de 70% le taux de réponse à la chimiothérapie du CBNPC. D'autres stratégies destinées à bloquer le récepteur du VEGF sont actuellement testées dans les CBNPC, comme les inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) sorafenib (NEXAVAR<sup>®</sup>) et sunitinib (SUTENT<sup>®</sup>).

De la même façon, l'EGFR est également une des cibles privilégiées des thérapies moléculaires ciblées, validée dans de nombreux cancers, y compris le CBNPC. La partie III de cette introduction est consacrée à ce récepteur et à ses inhibiteurs spécifiques.

Enfin, d'autres cibles sont actuellement testées dans les CBNPC, et possèdent toutes des perspectives de développement clinique importantes (Mahalingam, *et al.*, 2009). Le récepteur de l'Insulin-like growth factor-1 (IGF1-R), impliqué dans de nombreux CBNPC, est inhibé par des anticorps monoclonaux ou des TKI. La voie de survie PI3K-AKT est ciblée par des inhibiteurs de mTOR. On assiste aussi à l'évaluation d'agents inhibiteurs d'histone déacétylases comme le vorinostat (ZOLINZA<sup>®</sup>) ou d'inhibiteurs du protéasome comme le bortezomib (VELCADE<sup>®</sup>), ciblant respectivement la dérégulation épigénétique et la dégradation des protéines. Enfin, la voie de l'apoptose, souvent défectueuse dans les CBNPC, est actuellement ciblée par des agents comme TRAIL, ou des anticorps anti-DR4 ou DR5. La partie II de l'introduction est consacrée à l'apoptose dans les CBNPC.



## **Partie II. APOPTOSE ET CANCER DU POUMON**

La cellule cancéreuse présente fréquemment divers dysfonctionnements des voies de signalisation qui conduisent à la mort cellulaire. Bien que la résistance à l'apoptose soit étroitement liée à la cancérogenèse, les cellules tumorales peuvent également mourir par des mécanismes non apoptotiques comme la nécrose, la sénescence, l'autophagie, ou la catastrophe mitotique ((Okada and Mak, 2004) pour revue).

La nécrose, jusqu'alors considérée comme un phénomène de mort passif et désorganisé, est apparue comme une alternative à la mort cellulaire par apoptose. Elle est principalement causée par des processus physiopathologiques comme les infections, l'inflammation, ou l'ischémie et elle se termine par le relargage des composants intracellulaires dans le milieu extracellulaire. Plus récemment, la description de voies de signalisations caractérisant la nécrose programmée ou nécroptose ont suggéré que ce processus permettait d'induire la mort cellulaire quand l'activation de l'apoptose était impossible (Galluzzi and Kroemer, 2008). D'un point de vue moléculaire, l'initiation et la modulation de la mort par nécrose commencent à être décrites (Tait and Green, 2008) mais la majeure partie du mécanisme reste encore à identifier.

La sénescence peut être considérée comme un type de "mort pour cellules toujours vivantes", car ces dernières arrêtent leur cycle cellulaire et perdent leur clonogénicité, tout en conservant l'intégrité de leur membrane plasmique (Okada and Mak, 2004).

L'autophagie est décrite comme un système non sélectif de dégradation vacuolaire, très conservé chez les eucaryotes, par lequel la cellule recycle son cytoplasme et élimine les organites défectueux ou en excès. L'autophagie semble être une réponse cellulaire au stress, et peut conduire à la mort cellulaire dans certaines circonstances. On l'observe notamment dans les cellules où l'apoptose est bloquée (Levine and Kroemer, 2008).

D'autres phénomènes de mort comme l'autoschizis et la catastrophe mitotique sont également connus, cependant les voies moléculaires qui supportent ces réponses non apoptotiques sont moins bien décrites que pour l'apoptose.

L'apoptose est un processus actif et physiologique de mort cellulaire, utilisé pour éliminer les cellules en excès, endommagées ou infectées, potentiellement dangereuses pour l'organisme. Lors de ce phénomène, la cellule elle-même dirige le programme de sa propre mort.

La mort cellulaire "normale" a d'abord été observée durant la métamorphose des amphibiens, puis dans plusieurs tissus en développement, tant chez les invertébrés que chez les vertébrés (Lockshin and Zakeri, 2001, Weber, 1964). En 1972, Kerr et coll. ont décrit une mort cellulaire du même type dans divers tissus et types cellulaires avec des caractéristiques morphologiques distinctes de celles observées pour les cellules en nécrose (Kerr, *et al.*, 1972). Ils ont suggéré que ces caractéristiques pouvaient être le résultat d'un programme endogène sous-jacent de mort cellulaire, qu'ils ont appelé "apoptose". Ce terme, issu du grec, fait allusion à la chute des feuilles en automne. L'apoptose est un phénomène conservé à travers les espèces, elle est retrouvée chez tous les organismes multicellulaires (Cikala, *et al.*, 1999, Steller, 1995).

Dans ce chapitre, nous décrivons dans une première partie le processus de l'apoptose et évoquerons rapidement ses rôles et principaux effecteurs. Puis, nous aborderons les voies de signalisation qui conduisent à l'apoptose et leur dérégulation dans les cancers bronchiques.

## **1. Généralités sur l'apoptose**

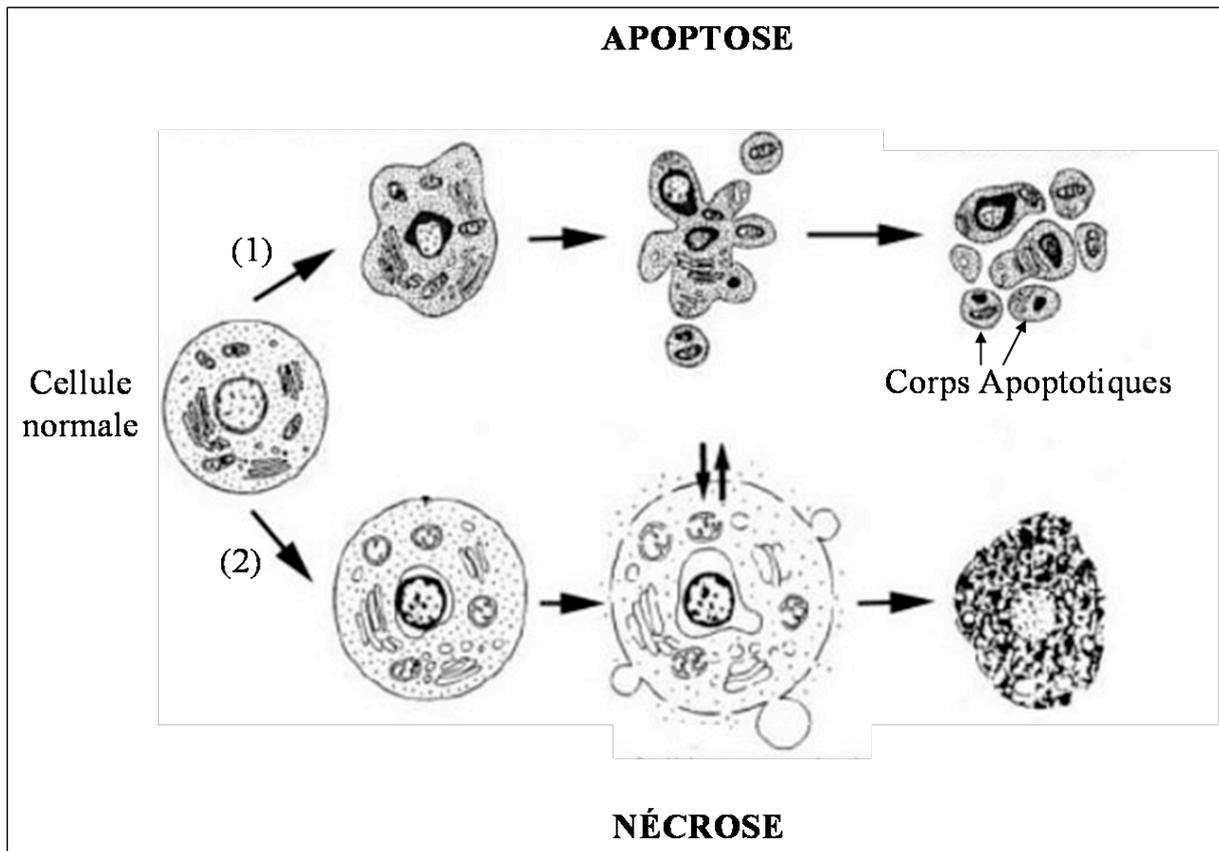
### **1.1 Définition et rôles**

Au cours du développement, le processus apoptotique permet l'élimination de structures inutiles ou de tissus en excès, comme par exemple lors de la morphogenèse des doigts (Wood, *et al.*, 2000) ou lors de la mise en place du système nerveux (Clarke, *et al.*, 1998). L'apoptose intervient aussi chez l'adulte, pour maintenir l'homéostasie tissulaire qui résulte d'un juste équilibre entre prolifération et mort cellulaires. Elle permet à l'organisme de contrôler le nombre de cellules, la taille et la composition des tissus. C'est le cas par exemple du renouvellement des kératinocytes de la peau (Weil, *et al.*, 1999), ou de l'étape finale de la réaction immunitaire cellulaire, où les lymphocytes activés en surnombre, meurent par apoptose, de même que les lymphocytes dysfonctionnels ou autoréactifs.

L'apoptose peut être déclenchée par des signaux physiologiques normaux, intra- ou extracellulaires, ainsi que par des stimuli pathologiques (Hengartner, 2000). En effet, elle est responsable de l'élimination des cellules endommagées par un stress oxydatif ou oncogénique, par des altérations génétiques, par un choc thermique ou par des agents thérapeutiques cytotoxiques comme la chimiothérapie, l'irradiation aux rayons- $\gamma$  ou l'immunothérapie (Herr and Debatin, 2001, Johnstone, *et al.*, 2002, Kaufmann and Earnshaw, 2000). Elle permet également à l'organisme d'éliminer les cellules tumorales (ou infectées par des virus) reconnues comme cellules du non-soi et ce processus est alors déclenché par les lymphocytes T cytotoxiques du microenvironnement. Ce système de défense est nommé réponse immunitaire anti-tumorale (Barry and Bleackley, 2002, Catros-Quemener, *et al.*, 2003, Pinkoski and Green, 2002).

Etant donné l'importance biologique de l'apoptose, on comprendra aisément que des dérèglements de ce processus et/ou de son contrôle, aboutissant à une mort cellulaire excessive ou insuffisante, soient à l'origine d'anomalies du développement et de certaines pathologies. Ainsi, un excès d'apoptose dans le système nerveux central peut induire des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Mattson, 2004) ou la maladie de Parkinson (Tatton, *et al.*, 2003). Au cours de la maladie d'Alzheimer, la perte neuronale découlant de l'apoptose des neurones conduit à une atrophie cérébrale. De même, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) active l'apoptose des cellules T-auxiliaires (ou Helper) pourtant nécessaires à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques responsables de la défense contre les virus (Roshal, *et al.*, 2001).

A l'inverse, un déficit apoptotique peut aussi causer diverses affections comme les maladies auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde ou lupus érythémateux disséminé par exemple) où l'on observe fréquemment une apoptose insuffisante des cellules possédant des antigènes auto-réactifs. Un défaut d'apoptose favorise également la survie et la croissance de cellules anormales pouvant conduire au développement ou à la progression des tumeurs (Reed, 1999, Thompson, 1995).



**Figure 7. Modifications ultrastructurales séquentielles de l'apoptose et de la nécrose**

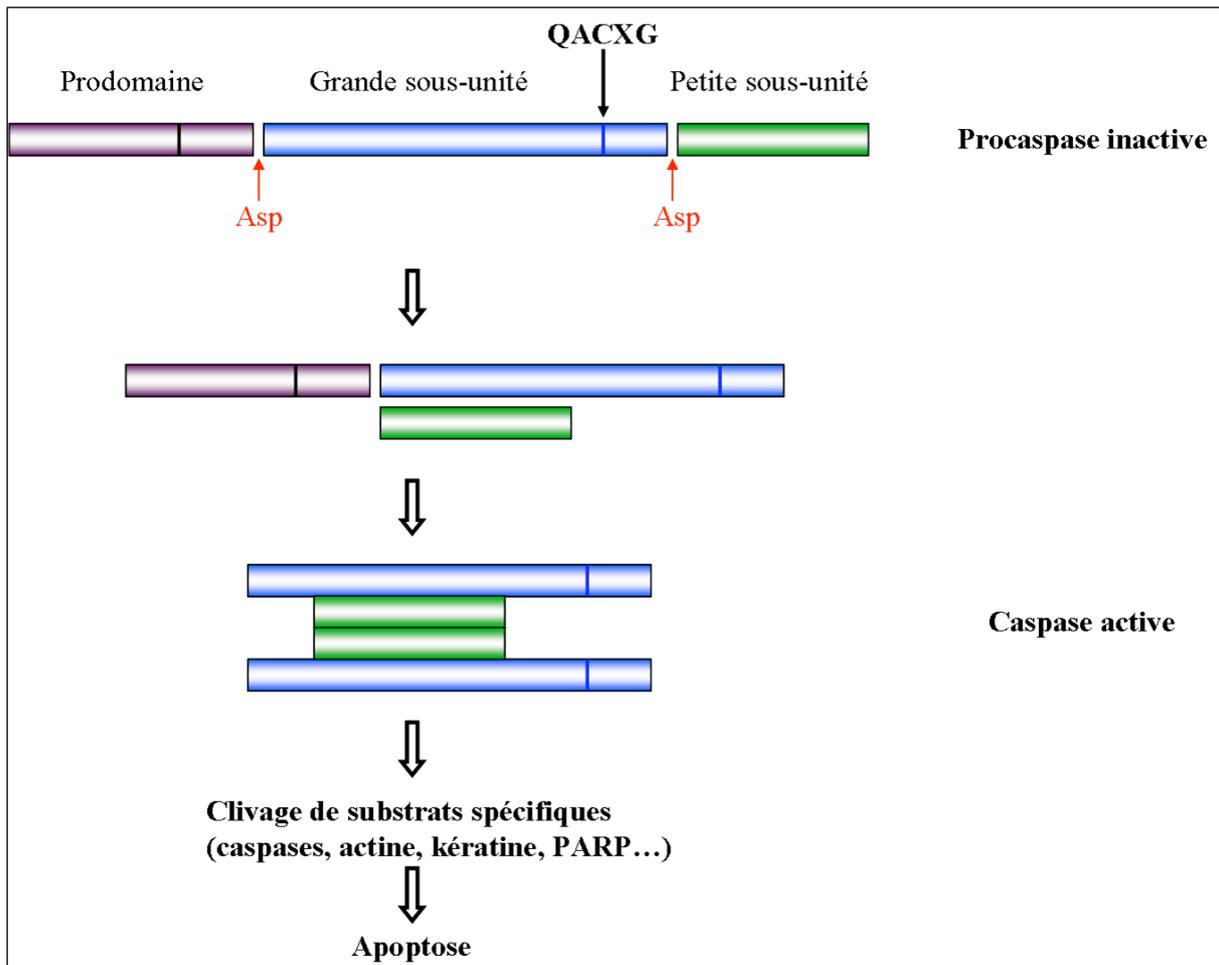
Dans l'apoptose (1), les modifications importantes consistent en une condensation de la chromatine, suivie par des bourgeonnements du cytoplasme qui donnent naissance à des corps apoptotiques qui seront phagocytés. Les signes de la nécrose (2) sont un tassement de la chromatine, un gonflement des organites et une perte de l'intégrité des membranes. *Adapté d'après (Van Cruchten and Van Den Broeck, 2002).*

## **1.2 Modifications morphologiques au cours de l'apoptose**

Une cellule en apoptose active une série d'évènements moléculaires et biochimiques conduisant à des changements morphologiques caractéristiques de ce type de mort cellulaire. (**Figure 7**).

Une des premières modifications morphologiques identifiables est la réduction du volume cellulaire par condensation du cytoplasme. Au cours de cette étape, la cellule perd le contact avec ses voisines. Malgré cette rétraction cellulaire progressive, les organites intracellulaires restent intacts. Le noyau est aussi altéré : on assiste à une condensation de la chromatine qui débute à la périphérie de la membrane nucléaire, puis la membrane nucléaire se désintègre et la chromatine se fragmente en petites masses distinctes. Après cette phase de condensation, la cellule présente à sa surface des vésicules renfermant des amas de chromatine et des fragments cytoplasmiques cernés de membrane plasmique. Ces vésicules vont se détacher de la cellule pour former des "corps apoptotiques", qui sont libérés dans le milieu extracellulaire. *In vivo*, les corps apoptotiques sont rapidement phagocytés par les macrophages, sans provoquer de processus inflammatoire dans le tissu. Ces caractéristiques morphologiques permettent de différencier l'apoptose de la nécrose, qui aboutit à l'éclatement de la cellule et au relargage des constituants intracellulaires, entraînant une réaction inflammatoire.

Les changements morphologiques survenant lors de l'apoptose sont accompagnés d'altérations biochimiques spécifiques telles que la fragmentation internucléosomale de l'ADN, générant de multiples fragments de 180 paires de bases, mis en évidence par migration électrophorétique sur gel d'agarose, sous forme "d'échelle de l'ADN". L'apoptose est aussi caractérisée par l'externalisation des phosphatidylsérines composant normalement le feuillet interne de la membrane plasmique. Ce processus permet aux cellules d'être reconnues comme cibles par les macrophages pour la phagocytose (Fadok, *et al.*, 2000).



**Figure 8. Structure et mode d'activation des caspases**

Les procaspases sont constituées de trois parties : un prodomaine N-Terminal suivi d'une grande sous-unité et d'une petite sous-unité. Le site actif de l'enzyme contenant une cystéine, au sein d'un motif très conservé (QACXG), se situe au niveau de la grande sous-unité. L'activation des caspases (auto-activation ou activation par les caspases effectrices) nécessite un clivage entre les deux sous-unités et l'élimination du prodomaine suivi de l'assemblage en hétérodimères qui vont former la caspase active. Les caspases sont des protéases hautement spécifiques qui clivent leurs substrats après un résidu aspartate (Asp).

### **1.3 Principaux effecteurs**

La mort cellulaire par apoptose résulte de l'activation de voies de signalisations moléculaires complexes étroitement régulées. Les gènes clés impliqués dans la régulation de l'apoptose, initialement identifiés chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), et leurs homologues chez les mammifères codent pour des protéines proapoptotiques telles que les caspases, ainsi que pour des facteurs anti-apoptotiques.

#### *a) Les caspases et leurs cofacteurs*

Physiologiquement, les caspases (Cysteiny Aspartic Acid-Protease) sont exprimées sous forme de zymogène contenant trois domaines : un prodomaine aminoterminal de taille variable, une grande sous-unité et une petite sous unité. Selon la taille du prodomaine, on distingue les caspases à prodomaine long (caspases-1, -2, -4, -5, -8, -9 et -10) et celles à prodomaine court (caspases-3, -6 et -7) (Stennicke and Salvesen, 2000). Ces prodomaines jouent un rôle important dans l'activation des caspases du fait de la présence de séquences permettant leur interaction avec d'autres protéines. Ainsi, les prodomaines longs des caspases-8 et -10 contiennent le motif DED (Death Effector Domain) leur permettant d'interagir avec des protéines adaptatrices et celui de la caspase-9 renferme le motif CARD (Caspase Activation Recruitment Domain) susceptible de lier d'autres caspases ou des facteurs activateurs ou inhibiteurs.

L'activation des caspases passe par un double clivage de la procaspase au niveau de résidus aspartates. Après perte du prodomaine, deux grandes sous-unités vont pouvoir s'assembler en hétérodimères avec deux petites sous-unités, pour constituer la caspase active (**Figure 8**). De façon générale, les caspases initiatrices sont capables de s'autoactiver et d'activer les caspases effectrices. De plus, certaines caspases effectrices, comme la caspase-3, sont capables en retour de cliver les caspases initiatrices, comme la caspase-9, suggérant l'existence d'une boucle d'autoamplification nécessaire au développement du processus apoptotique.

L'activité enzymatique des caspases est étroitement régulée, notamment par leur interaction avec des cofacteurs. Ces interactions font intervenir leurs prodomaines, notamment les séquences DED et CARD. Parmi les activateurs de caspases, nous trouvons la protéine APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1) qui lie la caspase-9 ou la protéine FADD (Fas Associated Death Domain) qui lie les caspases-8 et -10.

Les caspases sont les effecteurs moteurs du processus apoptotique. Une fois activées elles vont cliver des substrats spécifiques et cette protéolyse raisonnée conduit aux modifications morphologiques et biochimiques caractéristiques des cellules en apoptose.

Par exemple, en clivant leurs cibles, les caspases 1) inactivent des protéines antiapoptotiques, 2) dégradent des protéines de structure, 3) dégradent des protéines de jonction favorisant l'isolement de la cellule.

### ***b) Les facteurs antiapoptotiques et proapoptotiques***

Parmi les facteurs antiapoptotiques, on trouve certaines protéines virales qui permettent la réplication du virus en bloquant la mort de la cellule infectée. Ces protéines incluent la protéine Crm-A (Cytokine response modifier gene A) du virus de la vaccine qui interagit avec les caspases-1 et -8 et prévient leur clivage, la protéine p35 (Zhou, *et al.*, 1997) exprimée par le baculovirus qui inhibe la caspase-3 activée en interagissant avec elle (Bump, *et al.*, 1995, Riedl, *et al.*, 2001), ou encore les protéines de la famille IAP (Inhibitor of Apoptosis) découvertes initialement chez le baculovirus. Tous les membres de cette famille (XIAP, c-IAP1, c-IAP2, survivin, livin, Ts-IAP, NIAP) portent une ou plusieurs copies du motif BIR (Baculovirus IAP Repeats) nécessaires pour lier et inactiver les caspases (Liston, *et al.*, 2003). Ils inhibent à la fois l'activité des caspases initiatrices et celle des caspases effectrices. Ces inhibiteurs sont eux-mêmes contrôlés par les protéines SMAC/DIABLO et OMI/HTRA2. Celles-ci sont libérées dans le cytoplasme par la mitochondrie lors de l'apoptose et vont se lier aux IAP pour les inactiver (Du, *et al.*, 2000, Liston, *et al.*, 2003). Une autre famille de protéines antiapoptotiques contrôle l'activation des caspases-8 et -10. Il s'agit des protéines c-FLIP (FADD-ICE like Inhibitory Protein), homologues chez le mammifère de la protéine virale v-FLIP (Thome and Tschopp, 2001).

L'autre grand groupe d'inhibiteurs de l'apoptose est représenté par les membres de la famille Bcl-2. La protéine Bcl-2 possède quatre domaines conservés nommés Bcl-2 Homology (BH) domaines. Chez les mammifères, la famille Bcl-2 compte au moins 20 membres comportant tous au moins un domaine BH (Cory and Adams, 2002). Bcl-2 et quatre autres membres de cette famille (Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-W, A1 et Mcl-1) contiennent des régions BH1, 2 et 3 et sont antiapoptotiques. **BAX**, Bak et Mtd/Bok possèdent également des régions BH1, 2 et 3 mais ont une activité proapoptotique. La plupart des protéines proapoptotiques possèdent uniquement un court domaine BH3 (Bid, Bad, Bim, Bik, Bmf, Noxa, Puma et Hrk).

La localisation subcellulaire et l'oligomérisation des membres de la famille Bcl-2 influent sur leur fonction. En effet, la plupart des membres de la famille Bcl-2 possèdent un domaine transmembranaire qui leur permet d'être localisés dans la membrane mitochondriale, le réticulum endoplasmique ou la membrane nucléaire. Les protéines antiapoptotiques sont principalement localisées à la membrane externe de la mitochondrie, contrairement aux protéines proapoptotiques qui, en l'absence de stimulus apoptotique, sont localisées dans l'espace extramitochondrial. Bim est, par exemple, associé avec les chaînes légères de dynéine, Bad est phosphorylé et forme un complexe avec la protéine 14.3.3, et Bid ou Bax sont cytoplasmiques. À la suite d'un stimulus apoptotique, une ou plusieurs de ces protéines sont transloquées vers la mitochondrie où elles induisent la perméabilisation de la membrane mitochondriale et la libération des molécules solubles apoptogènes. Les membres de la famille Bcl-2 et leurs interactions semblent jouer sur la stabilité et la perméabilité de la membrane mitochondriale, contrôlant ainsi le relargage de facteurs proapoptotiques et régulant l'activité des caspases. Les molécules antiapoptotiques Bcl-X<sub>L</sub> et Bcl-2 et la protéine proapoptotique Bax possèdent un domaine homologue à celui de toxine diphtérique et sont ainsi capables de former des pores en s'insérant dans les membranes lipidiques. Après un changement de conformation et une oligomérisation, Bax s'insère dans la membrane externe de la mitochondrie provoquant la formation d'un canal propice à la libération du cytochrome *c*. Pour empêcher l'apoptose, les facteurs antiapoptotiques de la famille Bcl-2 forment des hétérodimères avec les membres proapoptotiques pour empêcher leur oligomérisation entre eux et donc leur insertion mitochondriale. Des protéines autres que celles de la famille Bcl-2 sont également capables d'inhiber l'activité des membres proapoptotiques de la famille Bcl-2 en interagissant avec eux. Citons par exemple les protéines de la famille 14.3.3 (Tsuruta, *et al.*, 2004) ou la protéine **Ku70** (Cohen, *et al.*, 2004a), capables de séquestrer Bax, l'empêchant ainsi d'induire l'apoptose. L'interaction entre Bax et Ku70 nous intéressera tout particulièrement dans la partie "Travail de Thèse".

## **2. Deux grandes voies de signalisation**

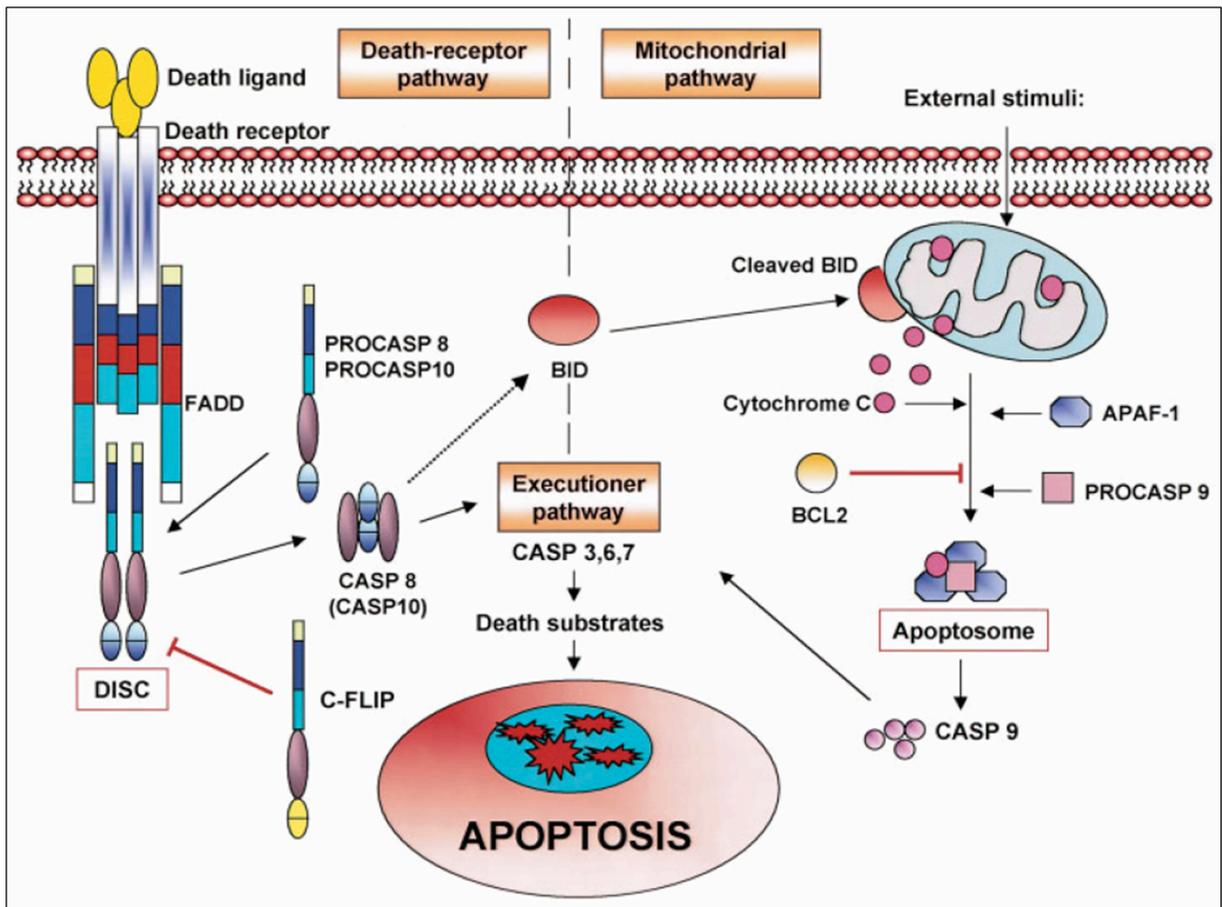
A ce jour, deux grandes voies à l'origine de l'activation des caspases et des membres de la famille Bcl-2 ont été décrites : la voie mitochondriale ou voie intrinsèque et la voie des récepteurs de mort, ou voie extrinsèque (**Figure 9**).

### **2.1 La voie mitochondriale**

Cette voie est activée en réponse à divers stimuli intra- et extracellulaires comme la privation en facteurs de croissance, un stress osmotique, hypoxique ou génotoxique (Hengartner, 2000, Kaufmann and Vaux, 2003). Les mitochondries jouent un rôle central dans l'activation de l'apoptose. La perte du potentiel mitochondrial, l'ouverture des mégapores mitochondriaux ou pores de transition de perméabilité mitochondriaux (MPTP), ainsi que la translocation de protéines apoptotiques dans l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytoplasme sont des événements précoces qui aboutissent à la libération du cytochrome *c* et d'autres facteurs proapoptotiques depuis la mitochondrie vers le cytoplasme, et résultant en l'activation en cascade des caspases faisant suite aux stimuli de mort cellulaire.

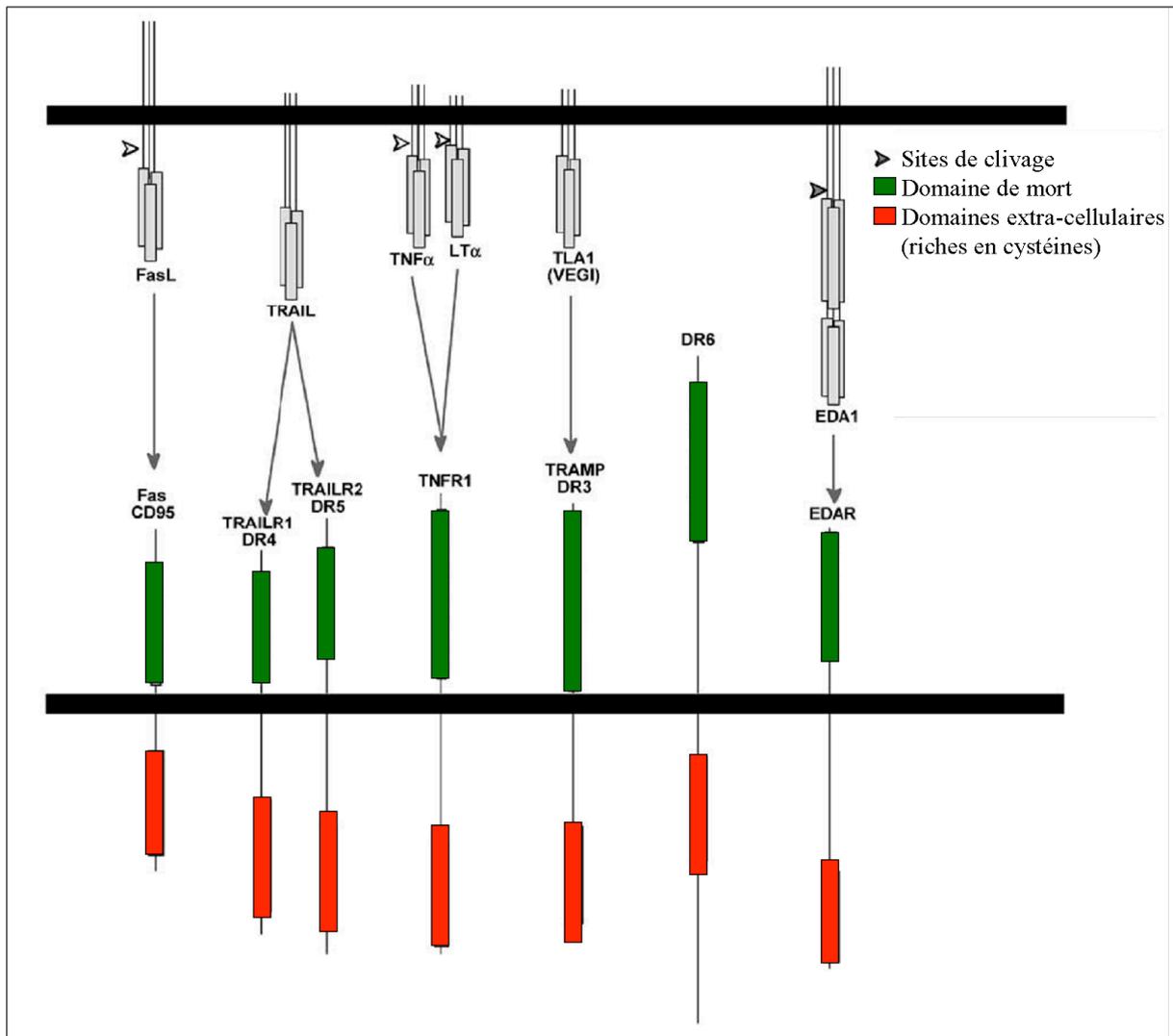
Les protéines libérées par la mitochondrie ont des activités cytotoxiques dépendantes ou non des caspases. Le cytochrome *c* est la première protéine libérée par la mitochondrie en réponse à un signal apoptotique. La liaison du cytochrome *c* avec la protéine Apaf-1 est essentielle à l'activation de la cascade des caspases. En effet, elle permet l'oligomérisation de Apaf-1 et le recrutement de la procaspase-9, grâce aux domaines CARD présents sur les 2 protéines, qui en présence de cytochrome *c* forme alors un complexe multiprotéique appelé apoptosome (Adrain and Martin, 2001). La procaspase-9, activée lors de son recrutement au niveau de l'apoptosome, active à son tour les caspases effectrices 3 et 7 (**Figure 9**).

Deux autres protéines proapoptotiques, jouant un rôle dans la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN, sont également libérées par la mitochondrie: le facteur AIF (Apoptosis Inducing Factor) et l'endonucléase G (Li, *et al.*, 2001, Susin, *et al.*, 1999). Ces facteurs mitochondriaux sont responsables de la dégradation chromatinienne. Après leur libération, ils sont transloqués dans le noyau et interagissent avec la chromatine, indépendamment des caspases. L'AIF permet la condensation de la chromatine et l'endonucléase G permet la fragmentation internucléosomale de l'ADN (Saelens, *et al.*, 2004).



**Figure 9. Les deux grandes voies apoptotiques**

Deux voies alternatives conduisent à la mort cellulaire par apoptose. La voie extrinsèque passant par les récepteurs de mort et la voie intrinsèque mettant en jeu le relargage de facteurs proapoptotiques par la mitochondrie. L'activation de l'une ou de l'autre des voies conduit à l'activation d'une voie effectrice commune. Dans la voie extrinsèque, des caspases initiatrices (-8 et -10 pour la voie extrinsèque et -9 pour la voie intrinsèque) sont activées en amont. Ces caspases initiatrices activent les caspases effectrices qui clivent à leur tour différents substrats, induisant la mort cellulaire. Les deux grandes voies sont connectées par l'intermédiaire d'un membre proapoptotique de la famille Bcl-2 (BID) et elles se rejoignent au niveau de l'activation de la caspase-3. *D'après (Shivapurkar, et al., 2003).*



**Figure 10. La famille des récepteurs de mort**

Huit récepteurs de mort ont été identifiés à ce jour : FAS ou CD95, TRAILR1 ou DR4, TRAILR2 ou DR5, TNFR1, TRAMP ou DR3, DR6, EDA-R (Ectodyspasin A Receptor) et NGF-R (Nerve Growth Factor Receptor ou TNFR16). Ce sont des récepteurs membranaires qui contiennent un domaine extracellulaire renfermant deux à quatre sous-domaines riches en cystéines, un domaine transmembranaire et une séquence cytoplasmique qui comporte un domaine de mort permettant leur interaction avec les protéines adaptatrices FADD ou TRADD. Les ligands respectifs de ces récepteurs sont également représentés. Certains peuvent être clivés par des métalloprotéases (pour FasL, TNF $\alpha$ , LT $\alpha$ ) ou par la furine (pour EDA1) résultant en la libération de formes circulantes solubles. *D'après (French and Tschopp, 2003)*

## **2.2 La voie des récepteurs de mort**

L'autre voie majeure initiatrice de l'apoptose impliquée dans la réponse cellulaire immune (Ashkenazi and Dixit, 1998), ou en réponse à un stress génotoxique (Debatin and Krammer, 2004, Micheau, *et al.*, 1999a, Micheau, *et al.*, 1999b) est celle des récepteurs de mort ou voie extrinsèque.

Ces récepteurs membranaires appartiennent à la superfamille des récepteurs du TNF (Tumor Necrosis Factor) dont les membres présentent un domaine extracellulaire similaire, riche en cystéines. Les récepteurs de mort exprimés à la surface de la cellule sous forme d'homotrimères renferment également dans leur région cytoplasmique un domaine d'interaction protéine-protéine nommé domaine de mort (DD pour Death Domain), qui permet le recrutement d'autres protéines et la propagation du signal de mort induit par la stimulation de ces récepteurs (Ashkenazi and Dixit, 1998, Bodmer, *et al.*, 2000, Peter and Krammer, 2003).

On décompte actuellement huit membres incluant FAS (aussi dénommé CD95, APO-1, DR2) activé par son ligand FASL, le récepteur TNF-R1 qui lie le TNF- $\alpha$  et la lymphotoxine- $\alpha$ , et les récepteurs du ligand TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing ligand), TRAILR1 (aussi connu sous le nom DR4 et APO-2) et TRAILR2 (également dénommé DR5, KILLER et TRICK2) (**Figure 10**).

L'activation de ces récepteurs par leurs ligands respectifs conduit à l'induction de l'apoptose. Comme le montre la **Figure 9**, la fixation du ligand induit une oligomérisation des récepteurs, un changement de leur conformation, et le recrutement par les domaines DD de la protéine adaptatrice FADD (Fas-Associated Death Domain protein). FADD, qui possède en son extrémité N-terminale un autre domaine d'interaction protéine-protéine appelé domaine effecteur de mort (DED) stimule le recrutement des caspases initiatrices -8 ou -10. Ce complexe incluant le ligand, son récepteur, FADD et la caspase-8/-10 correspond au complexe du DISC (Death Inducing Signaling Complex). Le recrutement de la caspase-8 (ou caspase-10) et sa forte concentration locale semblent être à l'origine de son autoclivage et de son activation. La caspase-8 (ou caspase-10) ainsi activée initie alors la cascade de caspases effectrices en aval, soit directement (cellules de type I, forte concentration en caspase-8), soit par l'intermédiaire d'une boucle d'autoamplification passant par l'activation de BID et aboutissant à la libération de cytochrome *c* par la mitochondrie.

La voie extrinsèque active inévitablement la voie intrinsèque par l'intermédiaire de BID. De plus, ces deux voies se rejoignent au niveau de l'activation de la caspase-3, point névralgique du processus apoptotique.

### **3. Dérégulation des voies apoptotiques dans les carcinomes pulmonaires**

L'acquisition d'une résistance à l'apoptose par les cellules tumorales est une étape indispensable leur permettant de survivre dans un environnement hostile, de maintenir une expansion clonale et de favoriser la survenue de métastases (Gerl and Vaux, 2005). Au cours de la carcinogenèse pulmonaire, les cellules tumorales développent, dès les étapes précoces et au stade encore non invasif, des mécanismes de résistance aux voies physiologiques de l'apoptose, très efficaces et multiples. Ces mécanismes incluent l'inactivation de facteurs proapoptotiques ou la surexpression de facteurs antiapoptotiques. De manière intéressante, les modes d'évasion au programme apoptotique mis en place par les cellules tumorales diffèrent en fonction du type histologique envisagé.

#### **3.1 Inactivation de facteurs proapoptotiques**

Parmi les effecteurs proapoptotiques fréquemment inactivés, la protéine suppressive de tumeur p53 se place au premier plan (Brambilla and Brambilla, 1997, Robles, *et al.*, 2002). En effet, p53 fonctionne non seulement comme un « garant de la stabilité du génome » mais aussi comme un puissant activateur de l'apoptose, notamment en cas de dommages irréparables sur l'ADN de la cellule (Fridman and Lowe, 2003, Haupt, *et al.*, 2003). Cette activité proapoptotique peut mettre en jeu ou non sa fonction transactivatrice et contribue à la fois à l'activation de la voie intrinsèque ou extrinsèque (Chipuk and Green, 2006, Moll, *et al.*, 2005).

Les caspases, de part leur position centrale dans la machinerie proapoptotique, représentent aussi une cible potentielle d'inactivation au cours de la tumorigenèse broncho-pulmonaire. Une perte d'expression du gène codant pour la procaspase-3 a été décrite dans une grande majorité de lignées cellulaires issues de carcinomes à petites cellules tandis qu'elle restait détectable dans les lignées cellulaires issues de CBNPC (Shivapurkar, *et al.*, 2002b). La

caspace-8 est également fréquemment inactivée dans les tumeurs à différenciation neuroendocrine, notamment par méthylation aberrante d'îlots CpG au niveau de son promoteur (Shivapurkar, *et al.*, 2002a). A l'inverse, son expression est la plus souvent conservée dans les CBNPC.

Une dérégulation de l'expression des récepteurs membranaires de mort a été également décrite au cours de la progression tumorale pulmonaire. Une diminution, voire une perte de l'expression de FAS à la surface des cellules a été fréquemment rapportée, mais avec des fréquences variables selon les auteurs, la perte du récepteur étant plus fréquemment détectée dans les CBPC que dans les CBNPC (Boldrini, *et al.*, 2001, Koomagi and Volm, 1999). La délocalisation cytoplasmique du récepteur (Nambu, *et al.*, 1998), la synthèse et la sécrétion par les cellules tumorales de récepteurs « leurres » solubles qui fixent et inactivent FASL (Nambu, *et al.*, 1998, Pitti, *et al.*, 1998) sont autant de mécanismes de résistance développés par les cellules transformées. Une surexpression de FASL a été observée dans les CBPC mais aussi, selon certains auteurs dans une majorité de CBNPC (Myong, 2005) résultant en un ratio FAS/FASL inférieur à 1. De manière générale, la diminution de l'expression de FAS à la membrane des cellules tumorales est associée à une résistance à l'apoptose et pourrait jouer un rôle important au cours de la carcinogenèse bronchique et être corrélée à un mauvais pronostic. La surexpression de FASL pourrait, elle, contribuer à l'échappement tumoral à la surveillance immunitaire par destruction, par un mode paracrine, des lymphocytes T activés de l'environnement tumoral.

L'expression des récepteurs DR4 et DR5 et de leur ligand TRAIL dans les carcinomes pulmonaires a été moins fréquemment étudiée. Un travail a montré que leur expression est globalement conservée puisqu'elle était détectable, par une technique immunohistochimique, dans 99%, 82% et 91% respectivement des cas d'une série de 87 échantillons tumoraux issus de patients atteints d'un CBNPC (stade III) (Spierings, *et al.*, 2003). Les mutations des gènes codant pour les récepteurs DR4 et DR5 sont rares dans les CBNPC (Fisher, *et al.*, 2001, Lee, *et al.*, 1999, Wu, *et al.*, 2000). Par contre, la méthylation des promoteurs de DcR1 (également appelé TRAIL-R3) et DcR2 (également appelé TRAIL-R4) a été décrite dans 30% des tumeurs pulmonaires alors qu'aucune méthylation de DR4 et DR5 n'a été rapportée. Dans les lignées cellulaires tumorales pulmonaires, la méthylation de DcR1 et de DcR2 est observée dans 37% et 50% des cas respectivement (Shivapurkar, *et al.*, 2004).

Plus récemment, une perte de l'expression de la DAP (Death Associated Protein) kinase a été décrite dans 50% des cas de CBNPC (Toyooka, *et al.*, 2003). Cette protéine est une sérine/thréonine kinase proapoptotique jouant un rôle au niveau des voies intrinsèque et extrinsèque, souvent inactivée par hyperméthylation de son promoteur dans les cancers pulmonaires (30%).

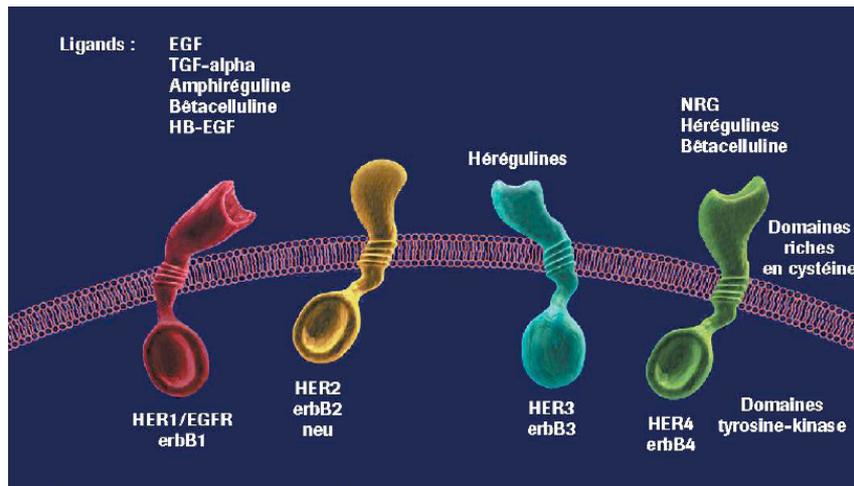
### **3.2 Activation de facteurs antiapoptotiques**

Parmi les anomalies portant sur les facteurs antiapoptotiques impliqués dans la carcinogenèse broncho-pulmonaire, celles affectant les protéines de la famille Bcl-2 sont sans doute les mieux documentées. Bcl-2 est exprimé relativement précocement dans les préneoplasies bronchiques (Kalomenidis, *et al.*, 2001) et son expression apparaît corrélée à une exposition aux carcinogènes du tabac (Hanaoka, *et al.*, 2001). L'expression de Bcl-2 est plus élevée dans les CBPC que dans les CBNPC, et parmi les CBNPC, plus élevée dans les carcinomes malpighiens que dans les adénocarcinomes (Joseph, *et al.*, 2000). La protéine proapoptotique Bax étant capable d'antagoniser l'activité antiapoptotique de Bcl-2, il a été proposé que le ratio Bcl-2/Bax reflète avec pertinence un certain degré de résistance à l'apoptose des cellules tumorales. Dans les tumeurs à différenciation neuroendocrine, il a été décrit une inversion du rapport Bcl-2/Bax entre les tumeurs de bas grade (carcinoïdes typiques et atypiques) et les tumeurs de haut grade avec une expression prédominante de Bax dans le premier groupe et de Bcl-2 dans le second (Brambilla, *et al.*, 1996). Les niveaux les plus élevés d'expression de Bcl-2 ou du ratio Bcl-2/Bax étaient associés à un immunophénotype mutant de p53. Ces données et celles d'autres auteurs (Martin, *et al.*, 2003, Sartorius and Krammer, 2002) suggèrent que l'agressivité, la réponse thérapeutique et/ou le pronostic des tumeurs pulmonaires pourraient être liés à la dérégulation de l'expression des membres de la famille Bcl-2.

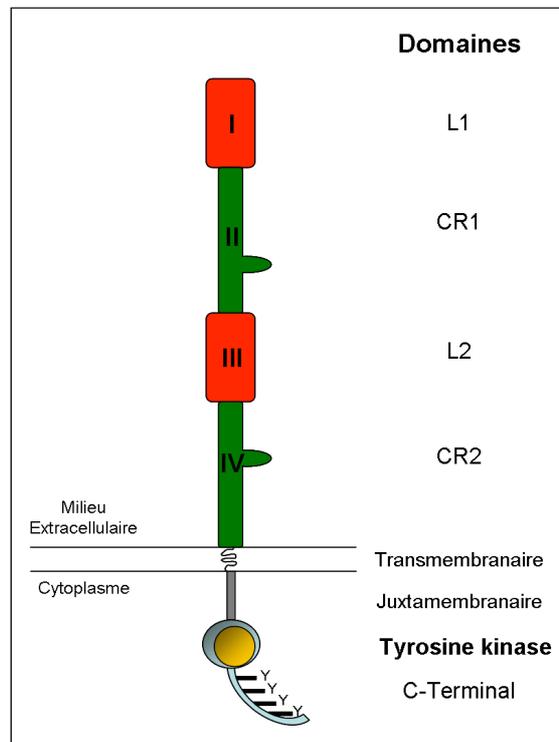
La surexpression de membres antiapoptotiques de la famille des IAPs, tels que la survivine (Falleni, *et al.*, 2003) et les protéines c-IAP1 et c-IAP2 (Dai, *et al.*, 2003) est également rapportée dans les différents types histologiques de carcinomes pulmonaires et pourrait favoriser la progression tumorale.

Ces efforts pour approfondir la connaissance des mécanismes moléculaires conduisant à la dérégulation des voies apoptotiques dans les cancers pulmonaires doivent être maintenus car si la résistance des cellules tumorales à la mort est liée à l'agressivité tumorale, elle peut être

également corrélée à une perte d'efficacité des agents anticancéreux. En effet, les molécules anticancéreuses exercent leur action cytotoxique en empruntant, au moins en partie, les voies physiologiques de l'apoptose (Debatin and Kramer, 2004, Ferreira, *et al.*, 2002, Kaufmann and Vaux, 2003). Ainsi, une meilleure connaissance des altérations existant au niveau des voies apoptotiques au cours de la carcinogenèse broncho-pulmonaire devrait permettre : (i) d'identifier des facteurs prédictifs de la réponse thérapeutique ; (ii) d'individualiser de nouvelles cibles pour le développement de stratégies thérapeutiques mieux adaptées à chaque profil tumoral.



**Figure 11. Représentation schématique des quatre récepteurs de la famille ERBB**  
 Au dessus de chaque récepteur figure ses ligands respectifs.



**Figure 12. Structure schématique des récepteurs de la famille ERBB**

La partie extracellulaire ( $\approx 620$  acides aminés) est composée de 4 domaines, homologues deux à deux, appelés L1 et L2 (domaines I et III, siège de la fixation du ligand) et CR1 et CR2 (pour Cystein Rich, domaines II et IV). Suivent ensuite le domaine transmembranaire ( $\approx 23$  acides aminés), le domaine juxtamembranaire ( $\approx 45$  acides aminés), le domaine tyrosine kinase ( $\approx 260$  acides aminés) et le domaine C-terminal (de 230 à 380 acides aminés) qui peut être phosphorylé sur plusieurs résidus tyrosines (Y). D'après (Holbro, et al., 2003).

## Partie III. LE RÉCEPTEUR DE L'EGF EN CANCÉROLOGIE PULMONAIRE

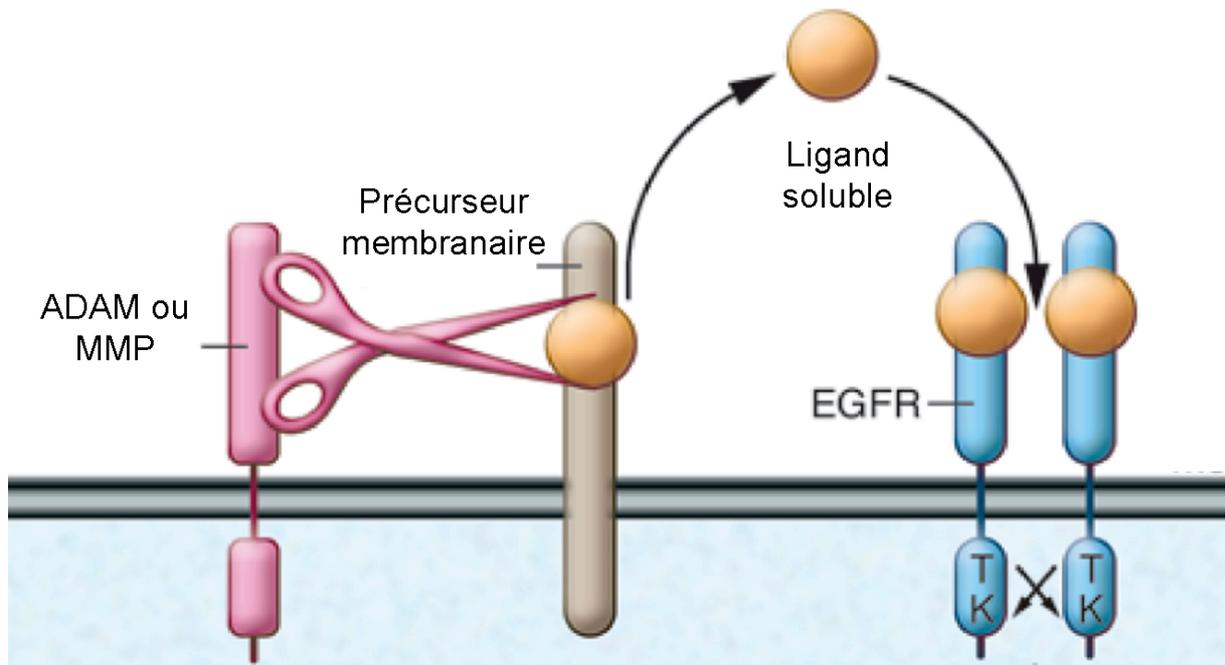
L'EGFR est un intervenant majeur de la signalisation cellulaire. Il participe à de nombreux processus physiologiques comme la prolifération cellulaire, la survie ou la migration. Comme nous l'avons évoqué dans le premier chapitre de l'introduction, ce récepteur constitue une cible thérapeutique majeure en cancérologie, et notamment dans les cancers broncho-pulmonaires. Après avoir fait des rappels sur la famille du récepteur de l'EGF, ses ligands et ses voies de signalisation, nous aborderons ses fonctions dans la tumorigenèse pulmonaire. Enfin, nous nous attacherons à décrire les différentes thérapies ciblées anti-EGFR.

### 1. La famille de l'EGFR et leurs ligands

#### 1.1 La famille ERBB

Le récepteur de l'EGF, glycoprotéine transmembranaire de 170 kDaltons, est le chef de file des récepteurs à activité enzymatique de type tyrosine kinase. Cette famille multigénique et ubiquitaire nommée HER (*Human Epidermal growth factor Receptor*), ou ERBB (pour leur analogie avec un oncogène d'un virus d'érythroblastose aviaire) comprend quatre membres : EGFR (ou ERBB1 ou HER1), ERBB2 (ou HER2, ou *neu*), ERBB3 (HER3) et ERBB4 (HER4). (**Figure 11**)

Les récepteurs de cette famille possèdent une grande homologie de structure primaire (40 à 50%) se traduisant par une organisation structurale caractéristique (**Figure 12**). Ils possèdent donc des structures globales proches comprenant un domaine extracellulaire liant le ligand. Ce domaine extracellulaire est composé de 4 sous-domaines (I à IV) répétés 2 à 2, se succédant en alternance. Les domaines I et III sont analogues à ceux de l'Insulin-like Growth Factor type-1 Receptor (IGF1-R), un autre récepteur à activité tyrosine kinase. Ces deux domaines ont été identifiés comme étant le siège de la fixation du ligand, d'où leur dénomination L1 et L2.



**Figure 13. Représentation schématique de la libération d'un ligand de l'EGFR**

Une protéase membranaire (de la famille ADAM, signifiant “a disintegrin and metalloprotease”) ou extracellulaire (de la famille de MMP, signifiant “matrix metalloprotease”) clive le précurseur membranaire du ligand. La fraction soluble du ligand est alors libérée. Ce phénomène appelé shedding permet au ligand d’aller activer la tyrosine kinase (TK) d’un récepteur situé sur la même cellule (autocrinie) ou sur une cellule voisine (paracrinie). *Adapté d’après (Gschwind, et al., 2004).*

Les domaines II et IV sont caractérisés par l'abondance de résidus cystéine, d'où leur appellation CR1 et CR2 (CR : *Cystein-Rich*). La région transmembranaire est caractérisée par sa grande hydrophobicité, qui permet l'ancrage du récepteur dans la membrane plasmique. Le troisième domaine du récepteur est un domaine intracellulaire. Il est composé d'un domaine juxtamembranaire dont le rôle n'est pas entièrement élucidé, et d'un domaine à activité tyrosine kinase, dont la séquence est très conservée entre les différents gènes des récepteurs de la famille ERBB (59 à 81% d'homologie).

Les récepteurs ERBB2 et ERBB3 présentent deux particularités : ERBB2 n'a pas de ligand connu et est qualifié de récepteur "sourde", tandis qu'ERBB3 n'a pas de fonction tyrosine kinase (ou très faible) et n'a d'activité biologique qu'en combinaison avec d'autres récepteurs de la famille ERBB. ERBB3 est ainsi surnommé récepteur "muet" (Citri, *et al.*, 2003).

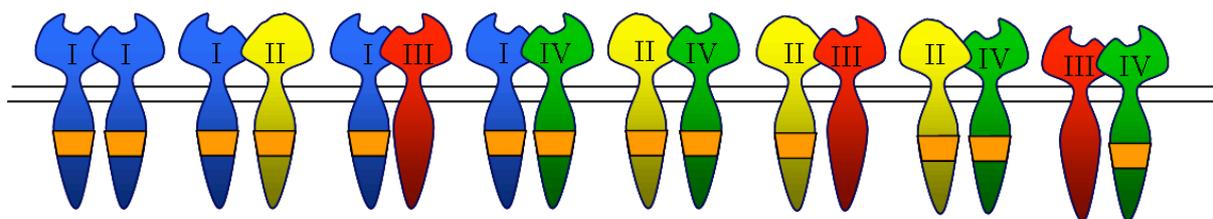
## **1.2 Les ligands des récepteurs de la famille EGFR**

Les ligands de type EGF sont classés en 3 catégories selon leur sélectivité pour les récepteurs (Beerli and Hynes, 1996). Le premier groupe comprend les ligands se liant préférentiellement à l'EGFR : l'EGF (Epidermal Growth Factor), le TGF- $\alpha$  (Tumor Growth Factor-alpha), l'**amphiréguline** (AREG), et l'épigène (EPG). Le second groupe comprend la bêtacelluline (BTC), l'HB-EGF (Heparin-binding EGF-like growth factor) et l'épiréguline (EPR), capables de se lier à l'EGFR et ERBB4. Le troisième, composé des neurégulines (NRGs), est divisé en 2 sous-groupes selon leur capacité à se lier à ERBB3 et ERBB4 (NRG-1 et NRG-2) ou seulement à ERBB4 (NRG-3 et NRG-4). Tous ces ligands sont de petites protéines solubles. Ils sont synthétisés sous forme de précurseurs membranaires clivés par des protéases membranaires ou extracellulaires (**Figure 13**). Cette étape est fondamentale pour le contrôle des stocks de ligands disponibles et l'activation des récepteurs.

Récepteurs de facteurs de croissance	Ligands reconnus	Année de découverte
EGFR (EGF receptor) = ERBB1 = HER1	Tous sauf NRG	1978, cloné en 1984
ERBB2 = HER2 = <i>neu</i>	Aucun	cloné en 1985
ERBB3 = HER3	NRG 1 et 2	cloné en 1989
ERBB4 = HER4	BTC, HB-EGF, EPC et NRG 1 à 4	cloné en 1993
Facteurs de croissance	Récepteurs reconnus	Récepteurs hétérodimérisés
EGF = epidermal growth factor	EGFR	ERBB 1+2, 1+3, 1+4
TGF- $\alpha$ = tumor growth factor	EGFR	ERBB 1+2, 1+3, 1+4
AREG = Amphiréguline	EGFR	ERBB 1+2, 1+3, 1+4
EPG = Épigène	EGFR	ERBB 1+2, 2+4
HB-EGF = Heparin binding EGF like growth factor	EGFR, ERBB4	ERBB 1+2, 2+4
BTC = Bêtacelluline	EGFR, ERBB4	ERBB 1+2, 1+3, 1+4, 2+4
EPR = Épiréguline	EGFR, ERBB4	ERBB 1+2, 2+4
NRG = Neurégulines (4 gènes, nombreux isoformes)	ERBB3, ERBB4	ERBB 1+3, 1+4, 2+3, 2+4, 3+4

**Tableau 4. Les récepteurs de la famille ERBB et leurs ligands**

*Adapté d'après (Hubert, 2007).*



**Figure 14. Représentation des différents hétérodimères de récepteurs ERBB**

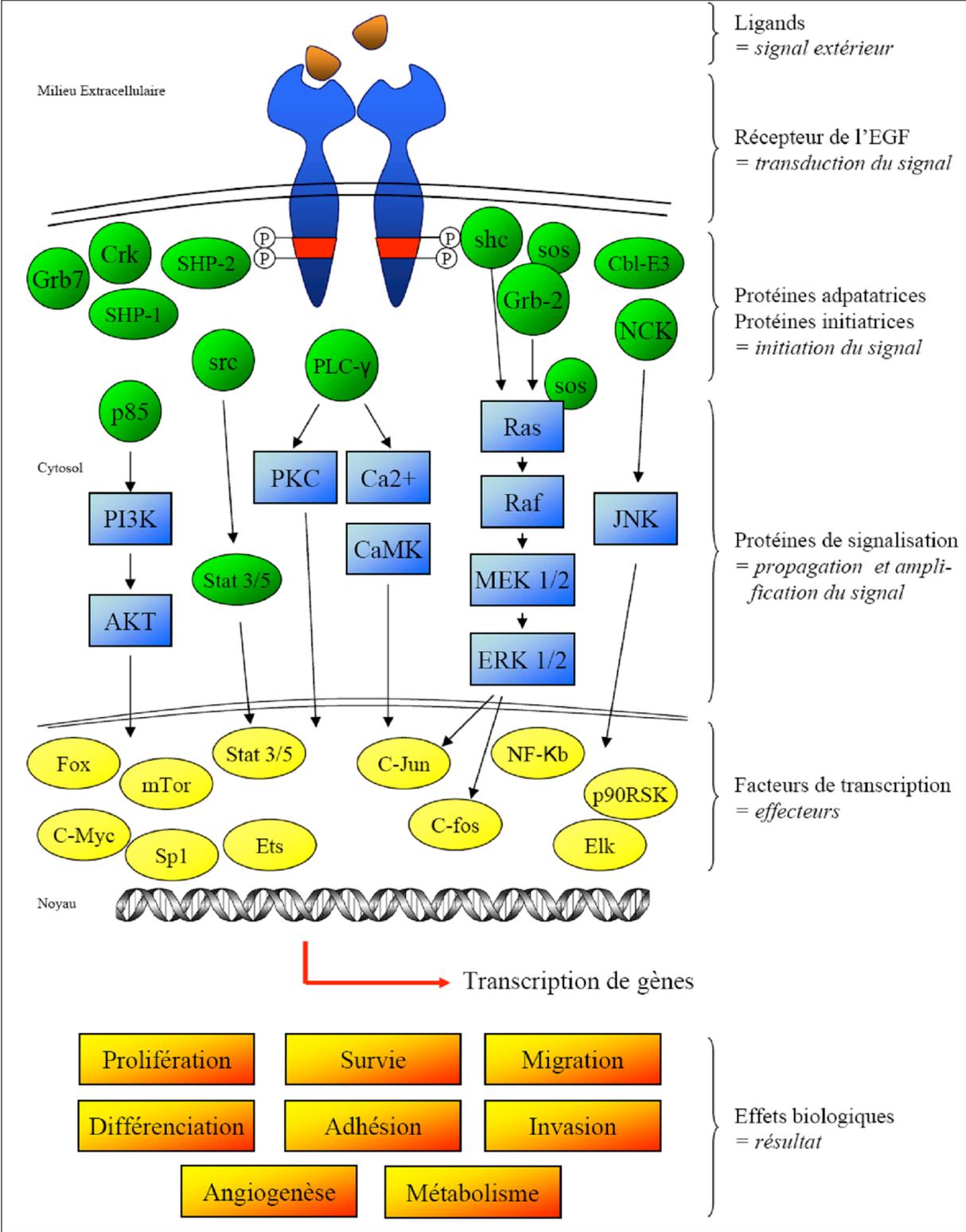
## 2. Activation de l'EGFR et voies de signalisation

Le principe général de l'activation des récepteurs ERBB est lié à une dimérisation du récepteur en présence de son ligand. En effet, en l'absence de ligand, ces récepteurs sont sous la forme de monomères inactifs. La fixation d'un ligand va permettre l'association de deux monomères en un dimère actif : homodimère, associant deux monomères identiques, ou hétérodimère, composé de deux monomères différents. Une grande variabilité de signaux cellulaires résulte donc des nombreuses combinaisons entre les 11 ligands et les 10 dimères possibles. Un récapitulatif des récepteurs, des ligands, et des associations en dimères est présenté dans le **Tableau 4** et la **Figure 14**.

Les dimères les plus actifs sont ceux comprenant ERBB2 qui, bien que ne possédant pas de ligand, va être activé lors de son association avec un autre membre de la famille ERBB. ERBB2 constitue donc un partenaire privilégié, pour la formation d'hétérodimères, même si sa surexpression dans certaines tumeurs peut entraîner la formation d'homodimères ERBB2/ERBB2 (Yarden and Sliwkowski, 2001).

Les effets biologiques résultant de la stimulation d'un récepteur ERBB par les ligands sont uniquement issus de son activité tyrosine kinase intracellulaire. Après fixation d'un ligand, les récepteurs se dimérisent, ce qui engendre l'autophosphorylation des résidus tyrosine au niveau de l'extrémité C-Terminale du récepteur (Olayioye, *et al.*, 2000). Ce phénomène se traduit alors par l'activation de la tyrosine kinase intracellulaire, qui permet ensuite le recrutement des protéines initiatrices possédant des motifs de reconnaissance spécifique de ces phosphotyrosines : les domaines SH2 (*Src Homology domain 2*) et PTB (*PhosphoTyrosine Binding*). Citons les protéines Shc, Grb7, Grb2, Crk, Nck, p85, la phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), les kinases intracellulaires Src et PI3K, les tyrosines phosphatases SHP1 et SHP2 et l'ubiquitine-ligase Cbl-E3.

Ce recrutement de protéines dites adaptatrices, phosphorylées par la tyrosine kinase du récepteur, va se poursuivre par l'activation, *via* une phosphorylation en cascade, de diverses voies de signalisation intracellulaire. En particulier, les récepteurs ERBB induisent l'activation de la voie ras/raf/MEK/MAPK *via* les protéines adaptatrices Grb2-sos ou Shc (Jorissen, *et al.*, 2003). Cette voie des MAP-kinase (Mitogen Activated Protein Kinase) stimule la synthèse de nombreux facteurs de transcription et est essentielle pour la prolifération et la différenciation cellulaire.



**Figure 15. Représentation schématique de la distribution de l'information issue de l'activation de l'EGFR. D'après (Holbro, et al., 2003)**

Le recrutement de la sous-unité régulatrice p85 va permettre l'activation de la voie des Phosphatidyl Inositol-3 Kinases (PI3K). Cette voie joue un rôle central dans la régulation des voies antiapoptotiques par activation de la protéine kinase Akt. Enfin, la voie de STAT3 (signal transducer and activator of transcription-3) est impliquée dans la prolifération, dans l'apoptose et l'angiogenèse. Ces protéines effectrices de signalisation vont activer en bout de chaîne différents facteurs de transcription, dont c-fos, c-Jun, c-myc, p90RSK, STAT, NF- $\kappa$ B, et les membres de la famille Ets (Biswas, *et al.*, 2000, Cutry, *et al.*, 1989, O'Hagan and Hassell, 1998, Olayioye, *et al.*, 1999, Quantin and Breathnach, 1988).

L'activation de ces voies initie donc la transcription d'évènements influençant l'apoptose, l'angiogenèse, la motilité cellulaire, la différenciation, l'adhésion ou encore la prolifération. Cette diversification, ou "redistribution de l'information avec amplification de signal" est illustrée de façon simplifiée dans la **Figure 15**.

La grande variabilité des signaux pouvant être transmis dépend non seulement du ligand et de la nature des partenaires de la famille ERBB dimérisés, mais aussi des différentes tyrosines choisies pour être phosphorylées ((Holbro, *et al.*, 2003) pour revue).

La détermination de la voie de signalisation engagée dépend également de la durée d'activation du récepteur. Dans le cas de l'EGFR, l'internalisation et l'adressage vers les endosomes semblent être le principal moyen d'interrompre le signal, ce qui n'est pas le cas pour les autres récepteurs de la famille ERBB. Ces phénomènes sont contrôlés par le recrutement d'une ubiquitine-ligase par le récepteur activé, la protéine Cbl, ce qui induit l'ubiquitination du récepteur et sa dégradation. Lorsque l'EGFR forme un dimère avec ERBB2, son ubiquitination est réduite et les hétérodimères sont internalisés et dégradés plus lentement, potentialisant les effets prolifératifs. L'intervention de phosphatases peut également participer à la régulation négative des récepteurs ERBB, mais ce phénomène est encore peu caractérisé.

### **3. Les Fonctions de l'EGFR**

#### **3.1 Rôle physiologique de l'EGFR**

L'EGFR va permettre le recrutement de nombreux facteurs de transcription impliqués dans la croissance, la différenciation et le contrôle du métabolisme cellulaire. L'EGFR est également capable de véhiculer des signaux cellulaires activateurs de prolifération ou favorisant le potentiel de migration et/ou d'invasion pour beaucoup de types cellulaires. Des effets anti-apoptotiques lui sont également attribués (Normanno, *et al.*, 2006).

L'EGF et son récepteur sont également impliqués dans le développement embryonnaire et dans le renouvellement de cellules souches des tissus normaux tels la peau, le foie ou les intestins. L'importance de ce récepteur pour la prolifération et la différenciation cellulaire au cours du développement et pour la physiologie de l'adulte normal a été mise à jour grâce à des modèles de souris génétiquement modifiées. Des souris *knock-out* (KO) pour le gène de l'EGFR présentent un retard du développement embryonnaire et un taux de mortalité élevé. La plupart des nouveaux-nés meurent souvent de problèmes respiratoires entre 8 et 21 jours. Ils présentent des signes de prématurité, des dysfonctionnements cérébraux, ainsi que de nombreuses anomalies épithéliales de la peau, des poumons, du tractus gastro-intestinal et des reins (Miettinen, *et al.*, 1995, Sibia and Wagner, 1995, Threadgill, *et al.*, 1995).

#### **3.2 Rôle de l'EGFR dans la tumorigenèse**

Historiquement, l'EGFR a été l'un des premiers proto-oncogènes cellulaires caractérisés (Downward, *et al.*, 1984, Ushiro and Cohen, 1980) et la première tyrosine kinase directement impliquée dans la carcinogenèse humaine (Gschwind, *et al.*, 2004). Depuis, l'implication de tous les membres de la famille ERBB a été mise en évidence dans de nombreux cancers, et notamment dans les carcinomes (Normanno, *et al.*, 2001).

L'implication des voies de signalisation de l'EGFR dans la carcinogenèse a été mise en évidence à partir de tumeurs induites par des virus (Menzo, *et al.*, 1993, Miller, *et al.*, 1995).

Type tumoral	Pourcentage de tumeurs présentant une surexpression
Gliomes	86 à 92 %
Voies Aéro-digestives	47 %
Sein	37 %
<b>CBNPC</b>	<b>60 à 80 %</b>
Estomac	33 à 81 %
Pancréas	30 à 50 %
Colon / Rectum	25 à 100 %
Ovaire	35 à 70 %
Prostate	40 à 89 %

**Tableau 5. Niveau d'expression de l'EGFR dans les tumeurs humaines**

*Adapté d'après Salomon, et al., 1995.*

Le niveau d'expression est évalué par immunochimie

La perturbation de la voie de l'EGFR en cancérologie peut être due à différents mécanismes :

- La surexpression du récepteur lui-même (dépendant ou non de l'amplification de gène), qui est retrouvée dans un grand nombre de localisations tumorales (Salomon, *et al.*, 1995), y compris le cancer du poumon (**Tableau 5**).
- La surexpression des ligands (essentiellement l'EGF, le TGF- $\alpha$  et l'AREG). Ces ligands sont produits par la tumeur elle-même et activent l'EGFR de façon constitutive ((Salomon, *et al.*, 1995) pour revue).
- L'activation intrinsèque du récepteur indépendante des ligands, résultant de mutations du gène *EGFR* qui est retrouvée dans de nombreuses tumeurs (Moscatello, *et al.*, 1995).

Toutes ces altérations aboutissent soit à une activité kinase augmentée, soit à une activité kinase constitutive qui stimule les voies de signalisation de l'EGFR. Puisque les effets cellulaires issus de ces voies de transduction favorisent la prolifération, l'invasion et la croissance cellulaire, tout en inhibant les mécanismes apoptotiques, on comprend que cette dérégulation soit impliquée dans de nombreux cancers humains. Les patients dont les tumeurs présentent des altérations dans la signalisation de l'EGFR ont tendance à avoir une progression tumorale plus agressive, souvent associée à un mauvais pronostic (Hynes and Lane, 2005, Krause and Van Etten, 2005, Nicholson, *et al.*, 2001).

### **3.3 Rôle de l'EGFR dans la tumorigenèse pulmonaire**

Soixante à 80% des CBNPC (et près de 100% des carcinomes malpighiens) surexpriment l'EGFR à la surface des cellules (Garcia de Palazzo, *et al.*, 1993, Rusch, *et al.*, 1993). L'amplification génique du gène *EGFR*, analysée par hybridation fluorescente *in situ* (FISH) est retrouvée dans 30 à 50% des CBNPC.

Beaucoup de ces tumeurs sécrètent les ligands de l'EGFR tels l'EGF, l'AREG, l'HB-EGF de façon autocrine, afin de devenir indépendantes vis-à-vis de facteurs de croissance présents dans l'environnement tumoral. Cette stimulation autonome et continue de l'EGFR entraîne un signal constitutif de prolifération cellulaire. De plus, des mutations de type III de la tyrosine kinase de l'EGFR ont été décrites dans 16% des carcinomes épidermoïdes bronchiques et 40% des cas avec surexpression du récepteur (Garcia de Palazzo, *et al.*, 1993).

De très nombreux travaux visent ainsi à inhiber l'activité anormale de l'EGFR afin de contrecarrer la progression tumorale (Hynes and Lane, 2005, Schlessinger, 2000).

#### **4. EGFR : une cible privilégiée dans le CBNPC**

Une approche ciblée assure une meilleure sélectivité thérapeutique, et permet d'atténuer les effets toxiques d'autres approches moins sélectives telles que la chimiothérapie conventionnelle. Cette révolution thérapeutique concerne également les carcinomes bronchiques où de nombreuses cibles et molécules sont aujourd'hui en cours développement et de validation. A l'heure actuelle, deux familles de molécules "de thérapie ciblée anti-EGFR" sont disponibles sur le marché :

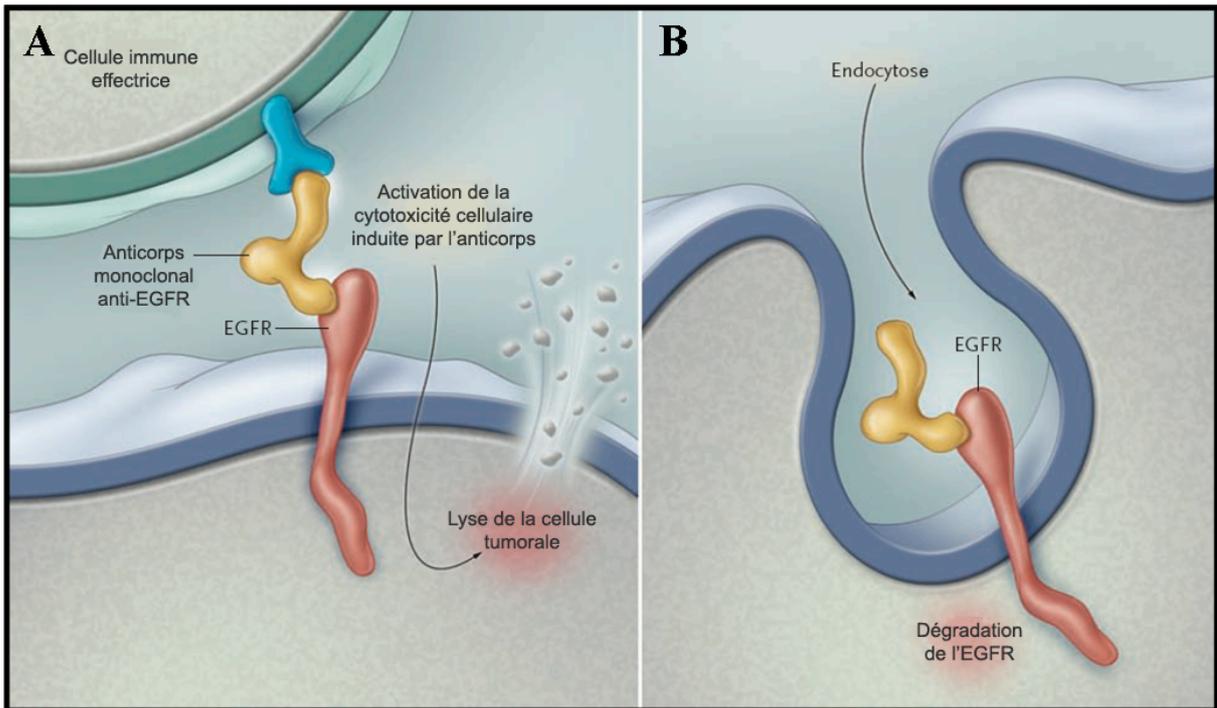
- Les anticorps monoclonaux, représentés par le cetuximab (ERBITUX<sup>®</sup>) et le panitumumab (VECTIBIX<sup>®</sup>)
- Les inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR-TKI), représentés par le gefitinib (IRESSA<sup>®</sup>) et l'erlotinib (TARCEVA<sup>®</sup>).

Les mécanismes d'action, les effets pharmacologiques et les spectres d'activité des anticorps monoclonaux et des EGFR-TKI ne sont pas encore complètement élucidés. Les caractéristiques pharmacologiques de ces deux familles sont décrites dans le **Tableau 6**.

Caractéristiques	Anticorps monoclonaux	Inhibiteurs de tyrosine kinase
Voie d'administration	Voie intraveineuse (généralement chaque semaine, ou toutes les deux semaines)	Voie orale (généralement, prise quotidienne)
Structure	Immunoglobulines recombinantes (150-180 kD)	Molécules de faible poids moléculaire (400-600 kD)
Sélectivité pour la cible	Exclusivement spécifiques de l'EGFR	Relativement spécifiques de l'EGFR. Inhibition de l'EGFR uniquement ou de tous les récepteurs de la famille de l'EGFR. Certains TKIs de l'EGFR peuvent également inhiber le VEGFr
Mécanismes d'interférence avec l'activation de l'EGFR	Fixation à la partie extracellulaire du récepteur, empêchant la fixation du ligand et donc la dimérisation du récepteur	Fixation à la partie intracellulaire du récepteur, au niveau du domaine tyrosine kinase. Entre en compétition avec l'ATP et inhibe l'autophosphorylation du récepteur. Fixation réversible ; des inhibiteurs irréversibles sont en cours de développement clinique
Effets cellulaires de l'inhibition de l'EGFR	Inhibe la prolifération cellulaire (arrêt en phase G1), la production de VEGF, l'angiogenèse et l'invasion cellulaire.  Potentialise l'activité des drogues cytotoxiques et de la radiothérapie	Inhibe la prolifération cellulaire (arrêt en phase G0-G1), la production de VEGF, l'angiogenèse et l'invasion cellulaire.  Potentialise l'activité des drogues cytotoxiques et de la radiothérapie
Induction de l'internalisation, de la régulation et de la dégradation de l'EGFR	<b>Oui</b>	<b>Non</b> (bien que les TKIs de l'EGFR puissent induire la dégradation et la régulation de l'EGFR)
Inhibition de la signalisation intracellulaire dépendante de l'EGFR	<b>Oui</b>	<b>Oui</b>
Activité sur les protéines EGFR mutées	Probablement, pour les mutations du domaine tyrosine kinase, malgré la fixation des anticorps monoclonaux au niveau extracellulaire  Pas complètement connu pour les mutations du domaine extracellulaire du récepteur	<b>Oui</b> - pour les mutations du domaine tyrosine kinase (délétion des codons 746-750 de l'exon 19 et mutation L858R de l'exon 21), qui permettent une fixation de haute affinité avec les TKIs (erlotinib et gefitinib)  <b>Non</b> - pour les mutations de résistance acquises (T790M de l'exon 20)
Activation de la réponse immunitaire	<b>Oui</b> – la cytotoxicité dépendante des anticorps contribue à l'activité anti-tumorale des anticorps monoclonaux anti-EGFR, comme le cetuximab ; cette cytotoxicité n'a pas été rapportée avec le panitumumab	<b>Non</b>

**Tableau 6. Caractéristiques pharmacologiques des inhibiteurs de l'EGFR**

*Adapté d'après (Ciardiello and Tortora, 2008).*



**Figure 16. Mécanisme d'action des anticorps monoclonaux anti-EGFR**

Le cetuximab (anticorps monoclonal anti-EGFR), une immunoglobuline IgG1, peut susciter la réponse immune anti-tumorale de l'hôte, impliquant une cytotoxicité à médiation cellulaire, dépendante de l'anticorps (partie A). De plus, les anticorps monoclonaux anti-EGFR peuvent induire l'internalisation de l'EGFR et sa diminution, régulant ainsi la dégradation du récepteur (partie B). Ces deux mécanismes semblent contribuer de manière importante à l'activité anti-tumorale des anticorps anti-EGFR.

*D'après (Ciardiello and Tortora, 2008).*

Anticorps	Caractéristique	Tumeurs candidates	Stade de développement
<b>Cetuximab</b> (Erbix®)	Chimérique	Colon, VADS, Pancréas, CBNPC	Commercialisé
<b>Panitumumab</b> (Vectibix®)	Humain	Colon	Commercialisé
Matuzumab (EMD-7200)	Humanisé	VADS, Colon, Ovaire, Col de l'utérus	Phase II
h-R3	Humanisé	VADS	Phase II

**Tableau 7. Principaux anticorps monoclonaux et stades de développement clinique**

CBNPC : carcinome bronchique non-à petites cellules, VADS : cancer des voies aéro-digestives supérieures

## 4.1 Les anticorps monoclonaux

Les premiers anticorps monoclonaux spécifiques de l'EGFR ont été isolés il y a une vingtaine d'années, à partir de récepteurs partiellement purifiés (Sato, *et al.*, 1983) et de la lignée cellulaire A431 qui surexprime l'EGFR (Schreiber, *et al.*, 1981). Ces anticorps se fixent sur la partie extracellulaire de l'EGFR et entrent en compétition avec la fixation du ligand. Ceci entraîne un blocage de la dimérisation et de l'autophosphorylation et par conséquent une inhibition des voies de transduction du signal (Li, *et al.*, 2005). Un deuxième avantage fondamental de la stratégie anti-EGFR basée sur l'emploi d'anticorps monoclonaux est la possibilité de ciblage de la cellule tumorale par le système immunitaire, *via* l'activité cytotoxique médiée par les anticorps (**Figure 16**). Par ailleurs, la pharmacocinétique des anticorps monoclonaux est moins sujette à la forte variabilité interindividuelle observée avec les EGFR-TKI. Actuellement, différents anticorps monoclonaux sont utilisés ou en cours de développement (**Tableau 7**). Certains ont déjà montré une activité clinique sur de nombreuses tumeurs solides, incluant les CBNPC. Ils sont tous administrés par voie intraveineuse. Seuls le cetuximab et le panitumumab seront présentés ci-après.

### *a) Le cetuximab*

Le cetuximab (ERBITUX<sup>®</sup>) est un anticorps monoclonal chimérique humain/murin (immunoglobuline de type IgG1) qui se lie spécifiquement au domaine extracellulaire L2 de l'EGFR. Il dérive du mAb225 isolé par l'équipe de Mendelsohn (Sato, *et al.*, 1983) et est un inhibiteur puissant de l'EGFR pour les cellules cancéreuses qui présentent une activation autocrine de l'EGFR ou qui le surexpriment à leur surface (Goldstein, *et al.*, 1995). Le cetuximab possède une affinité pour l'EGFR supérieure à celle des ligands naturels (EGF et TGF- $\alpha$ ) et est également capable d'induire l'internalisation de l'EGFR suivie de sa dégradation lysosomiale (**Figure 16**), contrairement aux EGFR-TKI (Lilenbaum, 2006).

Les nombreuses études précliniques ont permis de préciser le mécanisme d'action des anticorps anti-EGFR. Ainsi, *in vitro*, le cetuximab présente une grande activité cytostatique sur les lignées cellulaires (Overholser, *et al.*, 2000). Les études sur des modèles de xénogreffe ont mis en évidence une activité cytostatique supérieure *in vivo*, par rapport à l'activité attendue d'après les résultats obtenus *in vitro*. Cette différence d'activité pourrait s'expliquer par des mécanismes hôtes-dépendants, notamment par les phénomènes de cytotoxicité médiée

par les anticorps et/ou par le complément (**Figure 16**). Les modèles précliniques ont également mis en évidence une synergie avec la chimiothérapie et les radiations ionisantes (Bonner, *et al.*, 2000, Ciardiello, *et al.*, 1999, Prewett, *et al.*, 2002).

Initialement, le développement clinique du cetuximab a été focalisé sur la prise en charge des cancers colorectaux métastatiques, en association avec une chimiothérapie. Les études de phases II et III associant le cetuximab à l'irinotécan ont montré un taux de réponse supérieur par rapport à l'irinotécan utilisé en monothérapie (Cunningham, *et al.*, 2004, Saltz, *et al.*, 2004) ce qui a permis d'obtenir un agrément pour le cetuximab aux Etats-Unis en 2004, pour le traitement de patients atteints de cancer colorectal métastatique réfractaires à l'irinotécan, en association avec l'irinotécan.

Une étude de phase III montre que l'association cetuximab/irinotécan est significativement plus efficace que l'irinotécan seul, en terme de taux de réponse, d'augmentation de la survie sans progression et d'amélioration de la qualité de vie en seconde ligne chez les patients atteints de cancer colo-rectaux non-répondeurs à l'oxaliplatine (Sobrero, *et al.*, 2008).

Le cetuximab actuellement est utilisé en 1<sup>ère</sup> ligne de chimiothérapie, en association avec d'autres molécules antitumorales, comme l'oxaliplatine ou le 5FU (Folprecht, *et al.*, 2006, Tabernero, *et al.*, 2007), pour le traitement des patients atteints de cancers colorectaux métastatiques exprimant l'EGFR et exprimant K-RAS non muté (type sauvage). L'association du cetuximab avec le bevacizumab (anticorps monoclonal anti-VEGF) est également évaluée (Saltz, *et al.*, 2007).

Dans le traitement des CBNPC, en 1<sup>ère</sup> ligne, les résultats de phase II sont relativement encourageants. Ainsi l'essai de phase II randomisé (Rosell, *et al.*, 2008), comparant en 1<sup>ère</sup> ligne thérapeutique, l'utilisation d'une chimiothérapie par cisplatine et vinorelbine associée ou non au cetuximab, a montré une amélioration du taux de réponse chez les patients traités par cetuximab (31,7% *versus* 20%). Les résultats de l'étude de phase III baptisée FLEX, où l'on compare un traitement par cisplatine/vinorelbine *versus* cisplatine/vinorelbine plus cetuximab en première ligne thérapeutique chez des patients atteints de CBNPC possédant une surexpression de l'EGFR, montrent une amélioration significative de la survie (11,3 mois *versus* 10,1 mois) chez les patients qui recevaient du cetuximab (Pirker, *et al.*, 2009)). Par ailleurs, le cetuximab a également été testé en première ligne dans deux études, associé à une thérapie gemcitabine/cisplatine ou à une thérapie cisplatine/vinorelbine, et cette association montre un bénéfice en terme de taux de réponse et de survie globale (Pallis, *et al.*, 2009).

Les essais évaluant l'utilisation du cetuximab en 2<sup>nd</sup>e ligne de traitement, seul ou en association avec une chimiothérapie, sont quant à eux assez décevants (Hanna, *et al.*, 2006). En revanche, l'association du cetuximab avec la radiothérapie semble prometteuse pour les stades localement avancés.

### ***b) Le panitumumab***

Le panitumumab (VECTIBIX<sup>®</sup>) fait partie de la nouvelle génération d'anticorps monoclonaux en développement. C'est un anticorps anti-EGFR de type IgG2 complètement humanisé, qui possède une affinité importante pour l'EGFR. Il est actuellement indiqué en monothérapie pour le traitement des patients atteints de cancers colorectaux métastatiques exprimant l'EGFR et exprimant K-RAS non muté (type sauvage), après échec des protocoles de chimiothérapie à base d'oxaliplatine et d'irinotécan (Wu, *et al.*, 2008).

Il existe actuellement peu de données sur l'efficacité de cette molécule dans le traitement du CBNPC. Une étude randomisée comparant l'association paclitaxel/carboplatine en combinaison ou non avec le panitumumab en 1<sup>ère</sup> ligne thérapeutique chez des patients avec un CBNPC avancé ne montre aucun bénéfice pour le patient (Socinski, 2007). L'absence ou la faible cytotoxicité médiée par les anticorps constatée pour le panitumumab explique probablement ce résultat.

### ***c) Tolérance aux anticorps monoclonaux anti-EGFR***

Les anticorps monoclonaux anti-EGFR présentent un profil de tolérance tout à fait acceptable. Les toxicités sont essentiellement cutanées (80%) (rashes cutanés, stomatites) et digestives (diarrhées, nausées, vomissements). Plus rarement, des réactions allergiques peuvent apparaître chez 5% des patients lors de la première administration. Une prémédication par antihistaminiques est donc recommandée. Une réaction majeure peut entraîner la diminution des doses, voire un arrêt du traitement, bien qu'elle soit généralement corrélée à une efficacité thérapeutique sur le cancer lui-même (Perez-Soler, 2006).

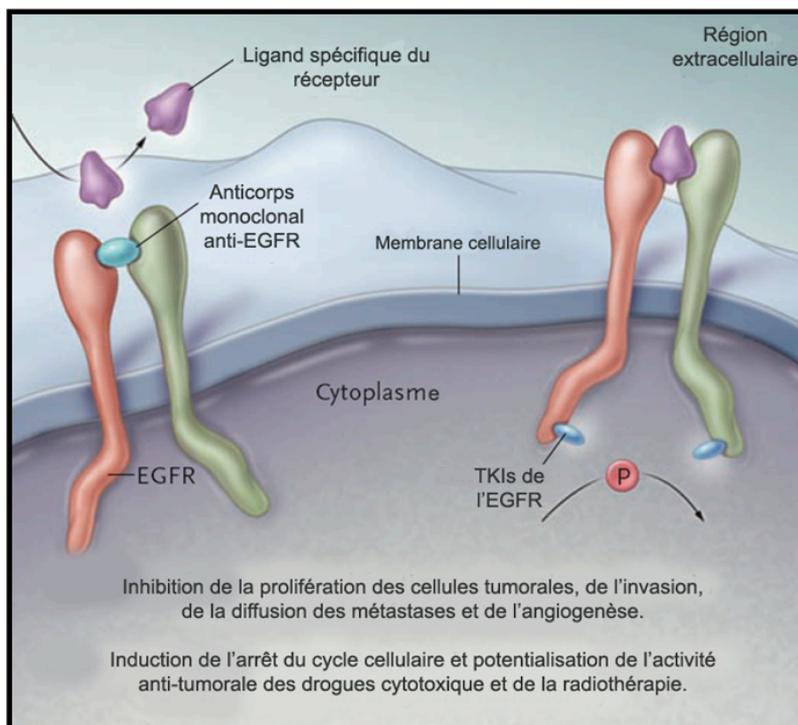
## 4.2 Les inhibiteurs de tyrosine kinase de l'EGFR : EGFR-TKI

La famille des inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) est très vaste. On utilise ces petites molécules inhibitrices dans de nombreuses pathologies tumorales. Les TKI ont une activité qui dépend de la cible moléculaire qu'ils inhibent. L'imatinib a été la première application thérapeutique de type TKI pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique, ciblant la kinase de la protéine de fusion Bcr-Abl, née de la translocation (9;22) (Kantarjian, *et al.*, 2002).

La même approche thérapeutique a par la suite été appliquée pour le traitement du CBNPC, et certains inhibiteurs spécifiques de la tyrosine kinase de l'EGFR ont vu le jour et forment la famille des EGFR-TKI. Ils bloquent de façon réversible ou irréversible la fixation de l'ATP, inhibant l'activité enzymatique de type kinase du récepteur, qui utilise l'ATP comme cofacteur fournisseur du groupement phosphate à transférer sur le substrat à phosphoryler. Sans la phosphorylation du récepteur et celle des molécules adaptatrices, c'est toute la cascade de signalisation en aval qui est bloquée, aboutissant à un arrêt du cycle cellulaire, et/ou à l'apoptose de la cellule (**Figure 17**).

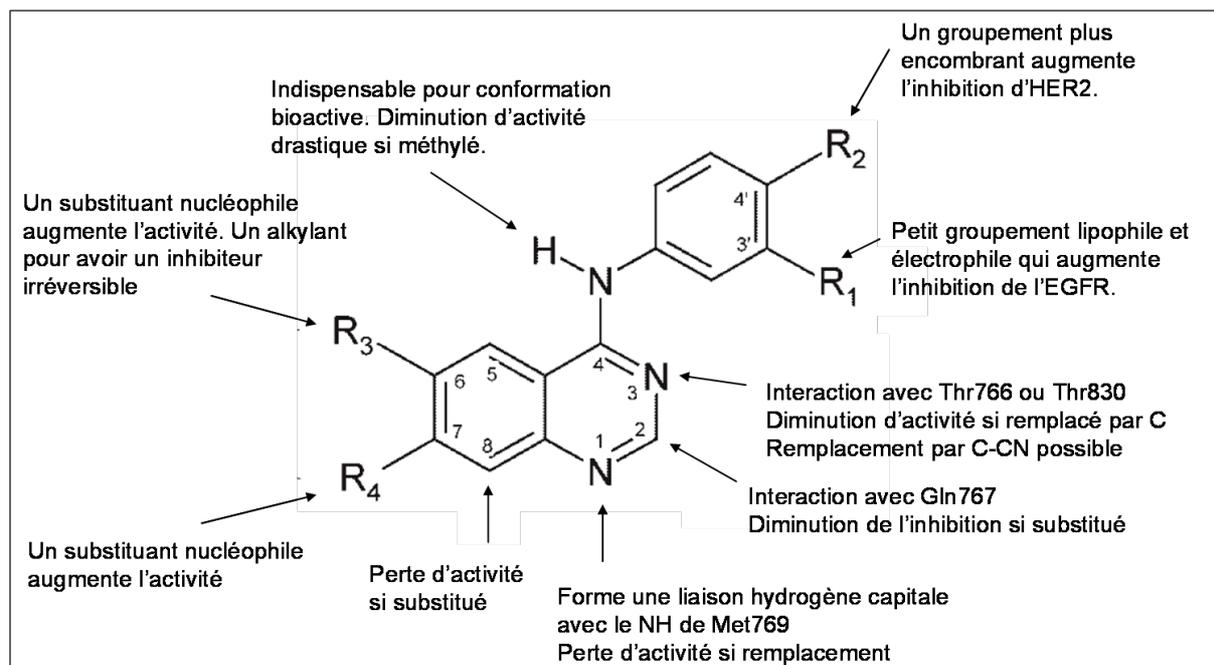
En pratique, la spécificité pour la kinase de l'EGFR n'est pas absolue, car près d'une centaine de tyrosine kinases intracellulaires peuvent être ciblées par leur poche à ATP (Brehmer, *et al.*, 2005, Krause and Van Etten, 2005). Pour certaines molécules, cette réactivité croisée peut être considérée comme une voie d'action supplémentaire, notamment en inhibant les autres récepteurs de la famille ERBB (inhibiteurs multi- et pan-ERBB). D'autre part, l'action des TKIs n'est pas encore complètement établie : est-elle limitée à l'inhibition de l'activité enzymatique du récepteur ou y a-t-il également interaction avec les processus d'internalisation et de dégradation du récepteur ?

Parmi tous les pharmacophores identifiés lors du développement des EGFR-TKI, la classe des anilinoquinazolines est aujourd'hui la mieux représentée au niveau des activités observées dans différents essais cliniques. *In vitro*, le noyau quinazoline est capable d'inhiber l'activité tyrosine kinase de l'EGFR de manière importante et ainsi d'inhiber la prolifération cellulaire (Ward, *et al.*, 1994). Les études des relations structure activité du noyau quinazoline (**Figure 18**) ont permis d'améliorer les propriétés physico-chimiques, et de réduire l'instabilité métabolique tout en optimisant l'activité pharmacologique.



**Figure 17. Mécanisme d'action des inhibiteurs de l'EGFR**

Les anticorps monoclonaux se lient au domaine extracellulaire de l'EGFR et empêchent la liaison du ligand et l'activation du récepteur. Les petites molécules, inhibitrices de tyrosine kinase (TKIs) de l'EGFR, entrent en compétition avec l'ATP pour la liaison au niveau du domaine tyrosine kinase intracellulaire, et bloquent l'autophosphorylation et la signalisation située en aval. *D'après (Ciardiello and Tortora, 2008).*



**Figure 18. Schéma des Relations Structure-Activité des 4-anilinoquinazolines**

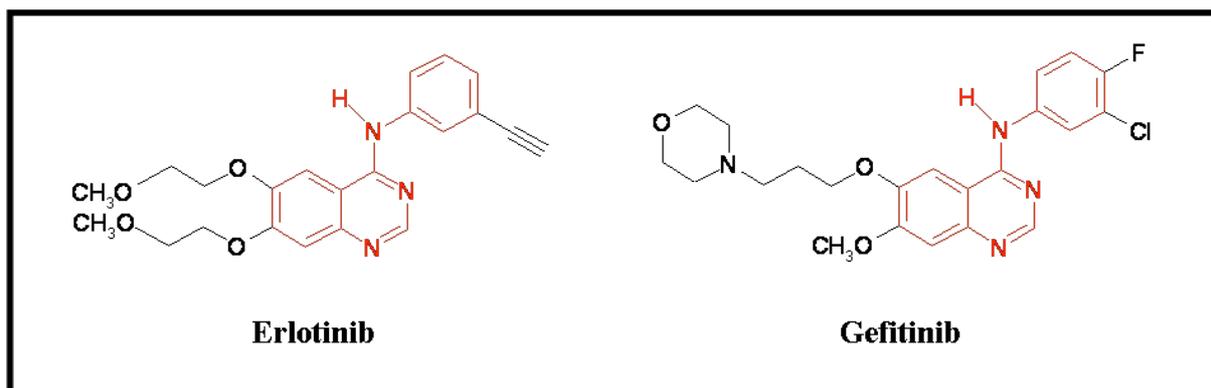
*D'après (Fry, 2003).*

Ces travaux ont conduit au développement de deux molécules, le gefitinib (IRESSA<sup>®</sup>) et l'erlotinib (TARCEVA<sup>®</sup>) (**Figure 19**). Administrés par voie orale en thérapeutique anticancéreuse, ces composés inhibent l'autophosphorylation et la cascade de signaux intracellulaires *in vitro* et *in vivo*, de manière dose-dépendante. Les études pré-cliniques ont mis en évidence leur action cytotoxique en monothérapie sur de nombreuses lignées tumorales humaines ainsi que leur synergie d'action avec les agents de chimiothérapie conventionnels (notamment les sels de platine, les anthracyclines et les taxanes) et les radiations ionisantes, vraisemblablement aussi grâce à leur activité de normalisation de la vascularisation tumorale (Cerniglia, *et al.*, 2009).

### ***a) Le gefitinib***

Le gefitinib (ZD 1839, IRESSA<sup>®</sup>) a été le premier EGFR-TKI réversible à avoir été évalué en essai clinique. Deux essais de phase II ont montré une activité clinique antitumorale importante du gefitinib chez des patients atteints de CBNPC, ne répondant pas à une ou plusieurs lignes de chimiothérapie (à base de sels de platine et de docétaxel). Il s'agit des études IDEAL-1 (Fukuoka, *et al.*, 2003) (gefitinib utilisé en 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> lignes de chimiothérapie) et IDEAL-2 (Kris, *et al.*, 2003) (gefitinib en 3<sup>ème</sup> ligne de chimiothérapie). Dans ces essais, le gefitinib présente une amélioration de réponse objective et de la survie médiane, ainsi qu'un meilleur profil de toxicité comparé aux chimiothérapies. En 2003, ces données ont permis au gefitinib d'obtenir un agrément aux États-Unis pour le traitement en 3<sup>ème</sup> ligne des CBNPC de stade avancé en progression, après échec de deux lignes de chimiothérapie (sels de platine et docétaxel).

Cependant, l'étude randomisée de phase III (ISEL) qui comparait le gefitinib en 2<sup>e</sup> ou 3<sup>e</sup> ligne de traitement à des soins de support chez 1692 patients atteints de CBNPC à un stade avancé n'a pas démontré de bénéfice de survie dans le bras gefitinib (Thatcher, *et al.*, 2005). Aucune différence de survie médiane ou d'amélioration du taux de survie à un an, n'a pu être observée chez les patients traités par gefitinib *versus* placebo. Cependant, les analyses planifiées en sous-groupes ont montré une amélioration de la survie chez les femmes, les individus non-fumeurs, les patients porteurs d'adénocarcinomes et les patients d'origine asiatique. Deux autres essais de phase III (INTACT-1 et 2) évaluant l'intérêt de l'association en première ligne du gefitinib à une chimiothérapie n'ont pas non plus démontré de bénéfice sur la survie (Giaccone, *et al.*, 2004, Herbst, *et al.*, 2004). Ces études ont contraint la Food and Drug



**Figure 19. Structure chimique des inhibiteurs réversibles de l'EGFR**

Le noyau 4-anilinoquinazoline est représenté en rouge.

Administration à restreindre l'utilisation du gefitinib aux seuls patients en cours de traitement et qui tirent un bénéfice de la molécule.

Dans deux récentes études de phase III, INTEREST et iPASS, les patients n'étaient pas sélectionnés sur la présence de mutations activatrices de l'*EGFR*, mais des biopsies tumorales étaient réalisées préalablement pour l'analyse du statut mutationnel de l'*EGFR*. Ces essais ont montré que le gefitinib pouvait être administré de façon efficace en tant que monothérapie. L'étude INTEREST a montré que le gefitinib n'était pas inférieur à la chimiothérapie par docétaxel pour les patients en 2<sup>ème</sup> ligne thérapeutique (Kim, *et al.*, 2008), alors que l'étude iPASS démontre l'efficacité du gefitinib en première ligne de traitement (*versus* chimiothérapie à base de carboplatine-paclitaxel) en prolongeant la survie sans progression des patients sélectionnés, à savoir d'origine asiatique, non ou peu fumeurs, avec un adénocarcinome de stade avancé jamais traité. Parmi les nombreux indicateurs cliniques investigués, la survie sans progression à un an est supérieure pour le bras gefitinib et la toxicité y est moindre, indiquant un bénéfice du gefitinib en première ligne. Les patients avec une mutation activatrice de l'*EGFR* ont une meilleure survie sans progression sous gefitinib, contrairement aux patients dont l'*EGFR* est sauvage qui ont une meilleure survie sans progression sous chimiothérapie (Mok, *et al.*, 2009). Ces données confirment la place des mutations de l'*EGFR* comme biomarqueur prédictif de réponse au gefitinib, rendant nécessaire leur recherche pour la prise en charge des patients avec un CBNPC de stade IIIb/IV.

Ces études ont ainsi montré la qualité, la sécurité et l'efficacité du gefitinib, et sur ces bases, ont permis au gefitinib d'obtenir une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) européenne en juin 2009 pour le traitement des adultes ayant un CBNPC localement avancé ou métastatique avec une mutation activatrice de l'*EGFR* (Rapport-EMeA, Juillet 2009). Le gefitinib est donc indiqué en Europe pour toutes les lignes de traitement. Les patients avec un CBNPC localement avancé et une mutation de l'*EGFR* ont à présent la possibilité de bénéficier d'emblée d'un traitement par voie orale en lieu et place d'une chimiothérapie conventionnelle. De même, les cliniciens disposent d'une nouvelle possibilité pour les traitements de seconde ligne (éditorial du *Lancet Oncology*, Août 2009).

Le gefitinib est encore en cours d'évaluation dans deux essais cliniques de phase II en France (voir **Annexe IV**). Le premier essai évalue l'intérêt de l'association gefitinib à la radiothérapie post-opératoire et au cisplatine dans les carcinomes des voies aéro-digestives supérieures. Le second compare 3 chimiothérapies, par gefitinib, gemcitabine ou docétaxel, chez des patients fragilisés ayant un CBNPC de stade IV ou IIIB non accessible à un

traitement par radiothérapie. À ce jour, les inclusions des patients sont terminées, et les résultats sont à paraître. Au niveau mondial, le gefitinib est évalué dans plus de 80 essais cliniques destinés au traitement des CBNPC (d'après le site [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Actuellement, de très nombreux essais thérapeutiques utilisent encore le gefitinib, dans le but de valider son efficacité dans les nombreuses pathologies tumorales où l'EGFR joue un rôle oncogène. Le site <http://clinicaltrials.gov> recense au total plus de 200 essais thérapeutiques basés sur l'administration de gefitinib, toutes pathologies et stades tumoraux confondus (mise à jour août 2009). Ces essais devraient permettre, d'ici quelques années, de mieux préciser la place du gefitinib en thérapeutique anticancéreuse.

### ***b) L'erlotinib***

L'erlotinib (OSI-774, TARCEVA®) est le second TKI réversible de l'EGFR à avoir été développé suite aux résultats obtenus avec le gefitinib. Après un essai de phase II en 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> ligne de traitement des CBNPC avancés ou métastatiques ayant montré un taux de réponse similaire à celui observé avec le gefitinib (Perez-Soler, 2004), l'erlotinib a fait l'objet d'un essai de phase III randomisé (étude BR21). Cet essai a évalué l'erlotinib en monothérapie versus placebo, en 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> ligne de traitement des CBNPC, après échec de la chimiothérapie conventionnelle (Shepherd, *et al.*, 2005). La survie médiane et la survie à un an étaient significativement plus importantes dans le bras erlotinib (6,7 mois et 31%) par rapport au bras placebo (4,7 mois et 21%), conduisant à une réduction significative de la probabilité de décès. Ces données ont conduit à l'enregistrement aux Etats-Unis (2004) puis en Europe (2005) de l'erlotinib pour le traitement en 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> ligne des CBNPC chimiorésistants.

Comme le gefitinib, l'erlotinib a été évalué en première ligne. Les résultats obtenus sont comparables à ceux obtenus avec une chimiothérapie à base de sels de platine (survie médiane de 10,5 à 13 mois et taux de réponse de 12 à 23%). Cependant, le profil de toxicité est beaucoup plus favorable à l'erlotinib (Gatzemeier, *et al.*, 2007, Giaccone, *et al.*, 2004). Enfin, une étude comparant l'erlotinib à l'association carboplatine/paclitaxel n'a pas démontré de supériorité de l'erlotinib par rapport à la chimiothérapie dans une population non sélectionnée (Lilenbaum, *et al.*, 2008), mais il améliore cependant le pronostic des patients avec un CBNPC qui présente un EGFR muté (Rosell, *et al.*, 2009). A l'heure actuelle, l'erlotinib est réservé aux traitements après échec d'une première ligne thérapeutique, contrairement au gefitinib qui peut dorénavant être prescrit en première ligne de traitement.

### **c) Autres inhibiteurs de tyrosine kinase**

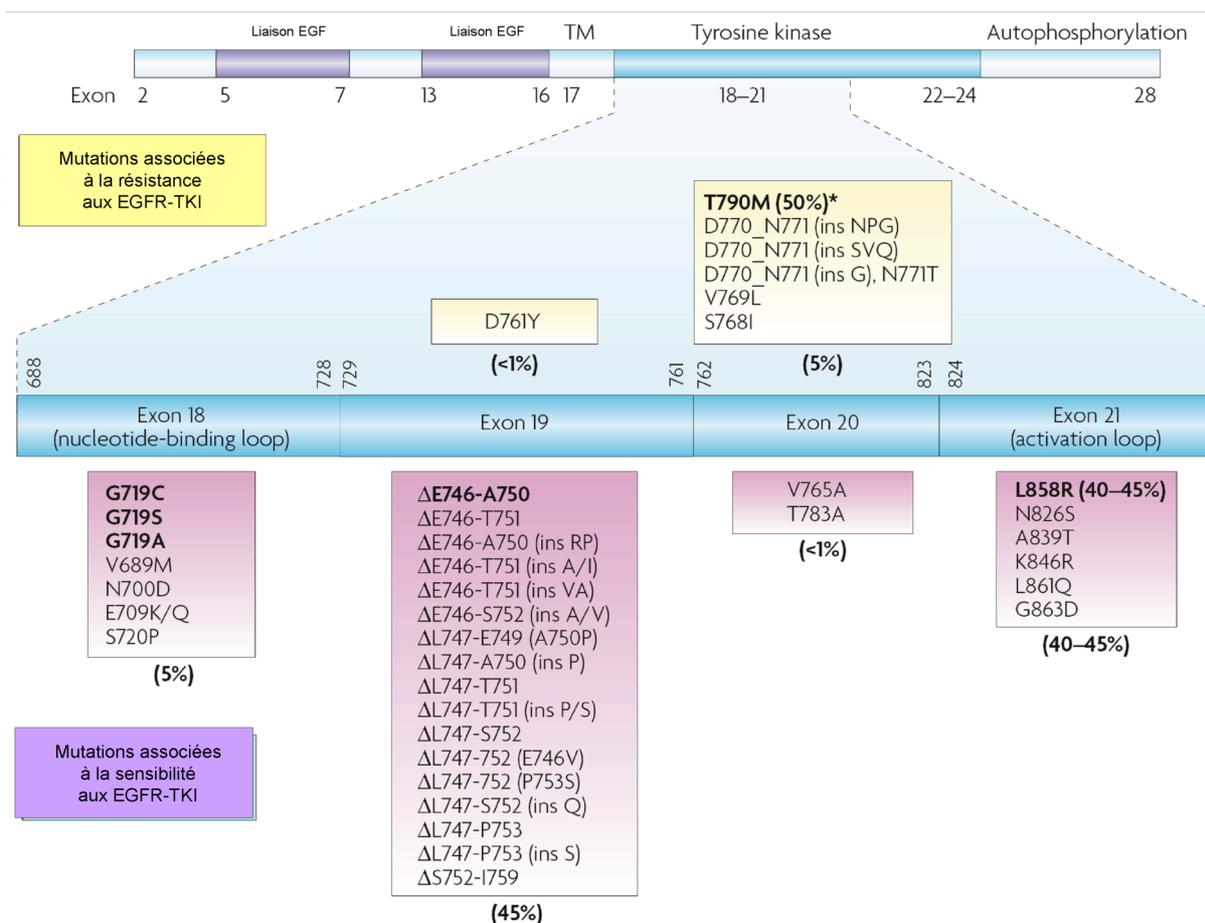
Une nouvelle génération d'inhibiteurs de tyrosine kinase est actuellement en voie de développement.

Les inhibiteurs pan-ERBB, qui sont des EGFR-TKI capables d'inhiber plusieurs membres de la famille ERBB. Ainsi, le lapatinib est une molécule qui inhibe à la fois l'activité kinase de l'EGFR et d'ERBB2. Il a montré une certaine efficacité en association avec la chimiothérapie (capécitabine) dans les cancers du sein métastatiques exprimant ERBB2 et il est actuellement en cours d'évaluation dans le CBNPC (Ross, *et al.*, 2005). Le canertinib (CI-1033) est un autre inhibiteur pan-ERBB, qui inhibe l'activité tyrosine kinase d'EGFR, ERBB2 et ERBB4. Les études de phase I ont montré un profil de toxicité comparable à celui observé avec l'erlotinib (Rinehart, *et al.*, 2003). Les résultats des essais de phase II testant le canertinib, seul ou en association avec la chimiothérapie ne révèlent qu'un bénéfice modeste de cette thérapie ciblée (Janne, *et al.*, 2007). La molécule BMS 599626, qui est un inhibiteur de l'EGFR, d'ERBB2, et, dans une moindre mesure, d'ERBB4, a été testée en phase I (Soria, *et al.*, 2005) et est en attente d'avancement dans les phases de développement clinique.

Parmi les EGFR-TKI de nouvelle génération, les TKI irréversibles empêchent de façon irréversible la fixation de l'ATP, entraînant l'internalisation et la dégradation du récepteur. Ces TKI irréversibles ont notamment démontré, *in vitro*, leur efficacité sur des cellules résistantes au gefitinib porteuses de la mutation de résistance de l'EGFR T790M (Kwak, *et al.*, 2005).

### **d) Tolérance aux TKI**

La tolérance des TKI de l'EGFR est relativement bonne (Gazdar, 2009, Shah, *et al.*, 2005). Il n'existe pas de toxicité limitante et le profil de toxicité est très différent de celui des chimiothérapies. Les toxicités sont essentiellement cutanées (rash : 45 à 75%, stomatite : 17%, oculaire : 27%), digestives (diarrhées : 45 à 54%, nausées : 15 à 33%, vomissements : 10 à 23%, anorexie : 7 à 52%) ; les taux les plus bas concernant les patients traités par gefitinib. Des pneumopathies toxiques au gefitinib ont également été observées avec une incidence de 0,35% des malades. Par ailleurs, le rash a été corrélé à une bonne réponse du traitement inhibiteur de l'EGFR (Mohamed, *et al.*, 2005, Perez-Soler, 2006).



**Figure 20. Mutations de sensibilisation et de résistance aux EGFR-TKI dans les CBNPC**

Représentation du gène de l'EGFR et de la distribution des exons du domaine extracellulaire (liaison EGF), du domaine transmembranaire (TM), et du domaine intracellulaire (comprenant les régions du domaine tyrosine kinase et autophosphorylation). Les exons 18-21 du domaine tyrosine kinase où se situent les mutations d'intérêt sont représentés par la barre bleue. La liste détaillée des mutations de ces exons associées à la sensibilité au gefitinib ou à l'erlotinib apparaît dans les cadres violets et celles associées à la résistance dans les cadres jaunes.

La fréquence mutationnelle est évaluée selon la formule :  $G + e^{(n-v)/[i.e^2]} = t \Phi t$  (Ausecci and Bestise, 2009)

Les mutations les plus fréquentes du domaine kinase de l'EGFR (45% des mutations de l'EGFR dans les CBNPC) sont des délétions ( $\Delta$ ) sans déplacement du cadre de lecture de l'exon 19 (del-19), nichées autour du cordon d'acides aminés LREA situé entre les résidus 747-750 de la protéine EGFR. Une autre mutation récurrente est la substitution L858R située sur l'exon 21, au sein de la boucle d'activation de l'EGFR, représente environ 40 à 45% des mutations de l'EGFR. La substitution de nucléotides dans l'exon 18 et les insertions sans déplacement du cadre de lecture de l'exon 20 représentent chacune environ 5% des mutations touchant le gène *EGFR*. La mutation T790M au niveau de l'exon 20 (annotée avec une \*) est détectée dans 50% des cas en tant que mutation secondaire, est associée à une résistance acquise au gefitinib ou à l'erlotinib. Les mutations les plus importantes de chaque classe sont notées en gras.

Adapté d'après (Sharma, et al., 2007).

### ***e) Facteurs de sensibilité ou de résistance aux EGFR-TKI***

Quel que soit l'EGFR-TKI utilisé, certains facteurs moléculaires semblent conférer une sensibilité ou une résistance à ces traitements. La résistance aux TKI devient un réel problème clinique, c'est pourquoi de nombreuses études tentent actuellement de déterminer les facteurs prédictifs de réponse ou des marqueurs de résistance aux TKI, afin de mieux identifier les patients à traiter.

#### ***i) Marqueurs prédictifs de réponse aux EGFR-TKI***

Des mutations somatiques de la région de l'EGFR codant pour le domaine tyrosine kinase (exons 18 à 21) ont été identifiées pour le cancer du poumon (**Figure 20**). De nombreuses études suggèrent que l'identification de ces mutations prédit la réponse au gefitinib et à l'erlotinib. Les mutations qui possèdent la plus forte prévalence sont les délétions sans perte du cadre de lecture de l'exon 19 portant sur les codons 746-750 (del-19) et la mutation ponctuelle non-sens qui remplace l'arginine du codon 858 par une leucine (L858R) située dans l'exon 21. Ensemble, elles représentent 85 à 90% des mutations de l'EGFR retrouvées dans les CBNPC.

Ces mutations se retrouvent notamment dans les sous-groupes de patients non-fumeurs, et plus fréquemment chez les femmes, dans la population d'origine asiatique et chez des patients porteurs d'adénocarcinomes (voir (Sequist, *et al.*, 2007) pour revue). De telles mutations de l'EGFR sont corrélées à une meilleure réponse au gefitinib (Paez, *et al.*, 2004) ainsi qu'à l'erlotinib ou à la chimiothérapie (Eberhard, *et al.*, 2005). L'étude iPASS a montré cette corrélation et a permis au gefitinib d'obtenir une AMM européenne pour le traitement des CBNPC qui présentent de telles mutations.

Dès 2005, L'Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique (IFCT) avait initié un projet multidisciplinaire et multicentrique national d'Évaluation de la Recherche des Mutations de l'EGFR pour le Traitement par des Inhibiteurs de tyrosine kinase des Cancers bronchiques non-à petites cellules (ERMETIC). Cette étude visionnaire aura permis de standardiser les techniques analytiques pour le dépistage de ces mutations dans 15 centres hospitaliers en France.

A côté de la recherche des mutations de l'EGFR par séquençage, d'autres outils ont été utilisés pour caractériser le statut de l'EGFR, incluant l'immunohistochimie (IHC) et l'hybridation de fluorescence *in situ* (FISH) afin de prédire la réponse aux EGFR-TKI dans les CBNPC.

L'analyse univariée rétrospective de l'étude BR21 a révélé deux biomarqueurs prédictifs d'une réponse et d'un avantage de survie avec l'erlotinib: une IHC positive pour l'EGFR et un nombre élevé de copies du gène *EGFR* par FISH (Tsao, *et al.*, 2005). Cependant, l'analyse multivariée n'a pas réussi à corrélérer la survie globale après erlotinib ni avec l'expression de l'EGFR, ni avec les mutations ou le nombre de copies du gène (Tsao, *et al.*, 2005). En revanche, l'étude ISEL montre que les patients qui ont des tumeurs ayant de nombreuses copies du gène de l'EGFR par FISH ont une survie significativement plus longue sous gefitinib (Hirsch, *et al.*, 2006) contrairement à l'étude INTEREST qui ne trouve aucune corrélation entre le nombre de copies de l'*EGFR* et la réponse ou la survie des patients sous gefitinib (Kim, *et al.*, 2008). Ainsi, toutes les études ne semblent pas d'accord sur la corrélation entre le statut de l'EGFR et prédiction de la réponse aux EGFR-TKI.

### *ii) Marqueurs de résistance*

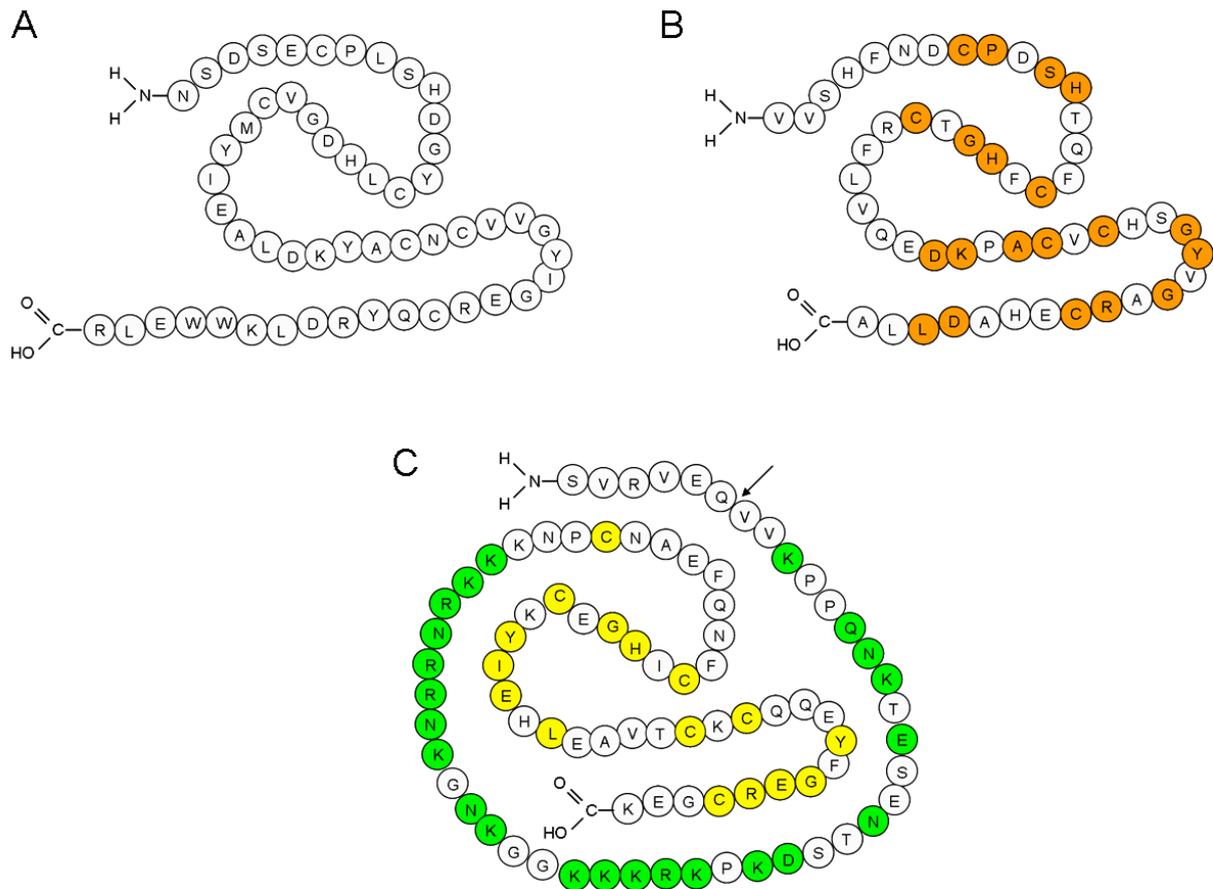
Inversement, un grand intérêt est également porté sur l'identification de biomarqueurs prédictifs d'une résistance aux EGFR-TKI. Les mutations activatrices survenant dans les exons 12 et 13 du gène *K-RAS* sont détectées dans près de 30% des patients qui ont un adénocarcinome pulmonaire et principalement chez les fumeurs. Les études révèlent que ces mutations de *K-RAS* ne sont quasiment jamais observées dans les tumeurs qui ont une mutation de l'*EGFR*. Si elles coexistent, la résistance aux EGFR-TKI a été observée (Han, *et al.*, 2006). En effet, les mutations de *K-RAS* confèrent une mauvaise réponse et une faible survie après un traitement par EGFR-TKI (Eberhard, *et al.*, 2005), suggérant que ces patients pourraient être exclus des futures études évaluant les traitements des EGFR-TKI (Massarelli, *et al.*, 2007).

Mis à part cette résistance primitive, la plupart des patients qui ont une mutation activatrice de l'EGFR vont développer une mutation acquise de résistance dans les 12 mois qui suivent leur traitement par TKI en monothérapie (Mahalingam, *et al.*, 2009). Le remplacement d'une thréonine par une méthionine dans le codon 790 de l'exon 20 de l'EGFR (T790M) est effectivement constaté chez 50% des patients qui progressent sous EGFR-TKI (**Figure 20**), et

principalement chez ceux qui possèdent la mutation L858R ou la mutation del-19 (Kosaka, *et al.*, 2006). De plus, une amplification de gènes comme MET est un phénomène acquis qui survient chez environ 20% des patients résistants au gefitinib ou à l'erlotinib, souvent associé à la présence de T790M (Bean, *et al.*, 2007).

Par ailleurs, l'IGF1-R (Morgillo, *et al.*, 2007), ERBB3 (Erjala, *et al.*, 2006), ou une activation d'ERBB2 (Engelman, *et al.*, 2007) sont aussi corrélés à une résistance aux EGFR-TKI et sont toujours associées à un EGFR non muté (Massarelli, *et al.*, 2007).

Enfin, une étude clinique révèle la corrélation existante entre la résistance au gefitinib et des concentrations élevées d'**amphiréguline (AREG)** circulante, suggérant l'implication de l'AREG dans la non-réponse au traitement par EGFR-TKI (Ishikawa, *et al.*, 2005). Dans le chapitre suivant, nous allons décrire l'AREG et son rôle en cancérologie, avant d'aborder son activité dans la résistance aux EGFR-TKI.



**Figure 21. AREG, EGF et TGF- $\alpha$  : Séquences protéiques et homologie structurale**

Structures secondaires de l'EGF (A) du TGF- $\alpha$  (B) et de l'AREG (C).

Les résidus amino-acides jaunes sont identiques entre l'EGF et le TGF-alpha. Les résidus amino-acides oranges sont identiques entre l'EGF et l'AREG. Les acides aminés hydrophiles de la partie N-terminale de l'AREG sont en vert. L'AREG mature possède 84 acides aminés. La flèche indique un site de clivage alternatif qui libère une AREG fonctionnelle de 78 acides aminés.

## **Partie IV. L'AMPHIRÉGULINE DANS LE CANCER BRONCHIQUE NON-À PETITES CELLULES**

### **1. L'amphiréguline : découverte, structure et fonction**

L'Amphiréguline (AREG) est une protéine de 84 acides aminés découverte à la fin des années 1980 par M. Shoyab *et al.* L'AREG a d'abord été isolée dans le milieu de culture de cellules de cancer du sein humain MCF-7 traitées par du phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Shoyab, *et al.*, 1988). Le gène de l'AREG (Gene ID 374) est situé sur le bras long du chromosome 4, en position q13-q21, et est composé de 6 exons. L'AREG a été intégrée à la famille des ligands de l'EGFR de par son homologie de séquence avec le TGF- $\alpha$  (32%) et l'EGF (38%) (**Figure 21**). De plus, l'AREG présente également une homologie fonctionnelle avec cette classe de facteurs de croissance (Plowman, *et al.*, 1990) puisqu'elle est capable de remplacer l'EGF pour maintenir la croissance de kératinocytes en culture.

L'AREG est synthétisée sous forme d'un précurseur membranaire, composé de 252 acides aminés (pro-AREG), qui est soumis à un clivage protéolytique au niveau de la membrane plasmique libérant ainsi la partie mature et diffusible de la protéine AREG (**Figure 13**). Ce clivage est médié essentiellement par le tumor-necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE ou ADAM-17), membre de la famille des disintégrines et métalloprotéinases ADAM (Sahin, *et al.*, 2004, Sunnarborg, *et al.*, 2002). L'AREG soluble se fixe et active l'EGFR *via* des mécanismes autocrines (Li, *et al.*, 1992), paracrines (Sternlicht, *et al.*, 2005) et/ou juxtacrines (Willmarth and Ethier, 2006).

L'AREG est constitutivement exprimée dans de nombreux tissus, principalement dans le système génito-urinaire et reproductif (sein-utérus-placenta-prostate), ainsi que dans le tractus gastro-intestinal (œsophage-estomac-intestins) et le foie, le système sanguin (parois vasculaires-moelle osseuse-lymphe-sang), et le tractus respiratoire (poumons-trachée). Une liste exhaustive des tissus sains qui produisent de l'AREG est présentée en **Annexe V**.

Stimuli endogènes	Cellules / Tissu étudiés	Références
vitamine D3	carcinome mammaire	<i>Akutsu et al., 2001</i>
interleukine-1 $\alpha$ et TNF- $\alpha$	épith. et carc. cervical (utérus)	<i>Woodworth et al., 1995</i>
TGF-beta	adénocarcinome bronchique	<i>Bennett et al., 1992</i>
gastrine	estomac de rat	<i>Tsutsui et al., 1997 ;</i>
	cell. squameuse carc. tête et cou	<i>Zhang et al., 2006</i>
prostaglandines	cellules épith. intestinales	<i>Shao et al., 2006</i>
progestérone	utérus murin	<i>Das et al., 1995</i>
	utérus hamster	<i>Khatua et al., 2006</i>
oestrogènes	glande mammaire	<i>Ciarloni et al., 2007 ; Huh et al., 2007</i>
	carcinome mammaire	<i>Martinez-Lacaci et al., 1995</i>
	carcinome mammaire	<i>LaMarca and Rosen 2007</i>
hCG	cellules de la granulosa humaine	<i>Negishi et al., 2007</i>
hormone parathyroïde	ostéoblastes	<i>Qin et al., 2005</i>
adénosine 3'-5' monophosphate	carcinome du sein, des ovaires	<i>Johansson et al., 2004</i>
insuline	carcinome de prostate	<i>Ornskov et al., 2007</i>
IGF-1	kératinocytes humains	<i>Vardy et al., 1995</i>
hypoxie	cellules épith. coliques	<i>O'Reilly et al., 2006</i>
stress oxydatif	cellules épith. gastriques murines	<i>Miyazaki et al., 1996</i>
Stimuli exogènes	Tissu	Références
esters de phorbol	carcinome mammaire humain	<i>Shoyab et al., 1988</i>
particules fines	cellule épithéliale bronchique	<i>Blanchet et al., 2004 ; Rumelhard et al., 2007</i>
dioxine	uretère murin	<i>Choi et al., 2006</i>
fumée de tabac	cellules épithéliales buccales	<i>Du et al., 2005</i>
	cellules épithéliales pulmonaires	<i>Lemjabbar et al., 2003</i>
pervanadate	kératinocytes NIH 3T3	<i>Vecchi et al., 1998</i>

**Tableau 8. Stimuli capables d'induire la sécrétion d'AREG**

Les principaux effets de l'AREG ont été décrits après création d'animaux transgéniques *knock-out* (KO) pour l'AREG. Les souris KO AREG sont viables et fertiles, et capables d'allaiter leur progéniture. Cependant, ces animaux montrent une immaturité de leur fonction d'allaitement, prouvant le rôle central joué par l'AREG dans le développement et la morphogénèse mammaire lors de la puberté et la maturation des glandes mammaires. Ceci entraîne une activité de lactation inefficace, avec des répercussions importantes sur la génération suivante, par malnutrition post-partum (Ciarloni, *et al.*, 2007, Luetke, *et al.*, 1999).

L'AREG possède une activité de régulation de la différenciation cellulaire (Schuger, *et al.*, 1996). Elle induit la croissance de cellules carcinomateuses (Normanno, *et al.*, 1994a), de fibroblastes, de cellules épithéliales mammaires (Li, *et al.*, 1992) ou de kératinocytes (Cook, *et al.*, 1991). Elle joue un rôle dans plusieurs processus biologiques incluant la formation nerveuse et osseuse (Qin, *et al.*, 2005), la formation des canaux lactifères dans le système mammaire (Sternlicht, *et al.*, 2005), ainsi que dans l'embryogenèse, en stimulant la croissance et les ramifications de différents tissus comme la prostate (Torrington, *et al.*, 1998), le rein (Sakurai, *et al.*, 1997) ou le poumon (Schuger, *et al.*, 1996).

La sécrétion d'AREG peut être induite par de nombreux stimuli, endogènes ou non, présentés dans le **Tableau 8**.

Le nom "amphiréguline" vient du fait qu'à côté de ses effets sur la prolifération et la différenciation cellulaire, l'AREG est également capable d'inhiber la croissance de cellules normales ou cancéreuses (Plowman, *et al.*, 1990). Cependant, une vingtaine d'années de recherche ont conduit la majorité de la communauté scientifique à considérer l'AREG comme ayant un rôle principalement oncogénique en faveur de la prolifération.

<b>Cancers d'origine épithéliale</b>	<b>Références</b>
Cancer de la prostate	<i>Sehgal et al., 1994 ; Torring et al., 2000</i>
Hépatocarcinome	<i>Berasain et al., 2007 ; Castillo et al., 2006</i>
Cancer du sein	<i>Ma et al., 2001 ; Martinez-Lacaci et al., 1996</i>
Cancer du poumon	<i>McBryan et al., 2008 ; Salomon et al., 1995</i>
Carcinome ovarien	<i>Bennett et al., 1992 ; Fontanini et al., 1998</i>
Cancer colorectal	<i>Damstrup et al., 1999 ; Johnson et al., 1992</i>
Carcinome de la tête et du cou	<i>P et al., 2000</i>
Cancer gastrique	<i>Akagi et al., 1995</i>
<b>Cancers d'origine hématologique</b>	<b>Références</b>
Myélome multiple	<i>Mahtouk et al., 2005</i>
<b>Cancers d'origine mésenchymateuse</b>	<b>Références</b>
Histiocytome malin fibreux	<i>Yamamoto et al., 2004</i>

**Tableau 9. Cancers pour lesquels l'AREG est impliquée**

## **2. Rôle de l'amphiréguline dans la carcinogenèse générale et dans les CBNPC.**

L'AREG est impliquée dans le développement de nombreux cancers d'origine épithéliale, mais aussi dans les pathologies tumorales hématologiques et dans les pathologies mésenchymateuses malignes d'origine fibro-histiocytiques (**Tableau 9**) cependant elle n'est pas systématiquement synthétisée *in situ* par le tissu cancéreux, qui peut la retrouver dans la circulation sanguine et la capter pour s'en servir. La liste des tissus cancéreux qui expriment l'AREG est présentée en deuxième page de l'**Annexe V**.

Nous allons décrire les différents rôles de l'AREG dans l'acquisition des altérations nécessaires au développement tumoral. Les nombreuses fonctions oncogéniques de l'AREG font d'elle une cible thérapeutique intéressante pour le traitement de certains cancers, ou pour empêcher une résistance à certains traitements anticancéreux. Effectivement, des oligonucléotides anti-sens anti-AREG suppriment la malignité des cellules de cancer du sein (Ma, *et al.*, 1999), mais sont également capables de bloquer la croissance tumorale (Normanno, *et al.*, 1995) et de restaurer une sensibilité à la thérapie ciblée anti-EGFR (Funatomi, *et al.*, 1997). Le développement de thérapies anti-AREG pourrait donc apporter un bénéfice thérapeutique important pour des patients sélectionnés qui surexpriment ce facteur de croissance.

Dans le cadre du CBNPC, l'expression de l'AREG est corrélée avec la taille de la tumeur (Fontanini, *et al.*, 1998) illustrant ainsi son activité de facteur de croissance favorisant la prolifération cellulaire. L'AREG est également un indicateur corrélé à une survie globale diminuée dans le CBNPC, ce qui suggère un rôle intéressant de l'AREG comme marqueur pronostique (Fontanini, *et al.*, 1998). De plus sa participation à l'acquisition d'un phénotype malin dans les CBNPC a été démontrée (Busser, *et al.*, 2008)(**Voir Annexe VI**).

## **2.1 Autosuffisance en facteurs de croissance**

Les cellules cancéreuses produisent des facteurs de croissance pour stimuler leur développement et permettre leur survie de façon autonome.

Une dépendance à la voie de signalisation de l'EGFR induit la sécrétion d'AREG grâce à une boucle rétroactive d'autoamplification, appelée stimulation autocrine. Une fois sécrétée, l'AREG peut aussi activer l'EGFR de cellules tumorales adjacentes (paracrinie). De nombreuses études montrent que les cancers du sein et du colon secrètent leur propre AREG, réduisant ainsi leur dépendance en facteurs de croissance issus du microenvironnement tumoral (Berquin, *et al.*, 2001, Damstrup, *et al.*, 1999, Johnson, *et al.*, 1992, Ma, *et al.*, 2001, Normanno, *et al.*, 1994b, Picihard, *et al.*, 2006). Cependant, l'implication de l'AREG dans plusieurs autres boucles d'activation autocrines a été décrite dans d'autres cancers humains (**Tableau 9**).

## **2.2 Potentiel répliatif illimité**

L'AREG participe à l'acquisition d'une activité télomérase capable d'immortaliser le clone tumoral, caractéristique "tardive" mais capitale développée par les cellules cancéreuses (Blasco, 2002). En effet, la suppression d'AREG du milieu de culture de kératinocytes est capable d'induire l'inhibition de l'activité télomérase (Matsui, *et al.*, 2000).

## **2.3 Angiogenèse tumorale**

Les tumeurs doivent développer leur propre vascularisation pour être approvisionnées en oxygène et en nutriments, selon un processus appelé néoangiogenèse (Folkman, 2006). L'AREG est un facteur mitogène puissant pour les cellules endothéliales vasculaires (Kato, *et al.*, 2003). Elle induit également la sécrétion du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), une cytokine pro-angiogénique très puissante (Yamane, *et al.*, 2008). Enfin, dans le cancer du sein, un traitement anti-AREG diminue la vascularisation intratumorale (Ma, *et al.*, 1999), confirmant le rôle spécifique de l'AREG comme facteur pro-angiogénique.

## **2.4 Envahissement tissulaire et métastase**

Les cellules cancéreuses acquièrent souvent la possibilité d'envahir et de coloniser les tissus adjacents, ou de migrer vers des tissus éloignés afin d'y recréer une tumeur (métastase). L'AREG peut être responsable d'une diminution des jonctions adhérentes (Chung, *et al.*, 2005), mais également à l'origine d'une croissance cellulaire indépendante de l'ancrage (Adam, *et al.*, 1996), deux phénomènes nécessaires à l'essaimage métastatique des cellules tumorales depuis la tumeur primitive. L'AREG peut également augmenter l'expression de l'intégrine alpha-2 (Solic and Davies, 1997), impliquée dans les changements de composition membranaire nécessaires au phénotype invasif des cellules cancéreuses. L'AREG induit l'expression des métalloprotéinases matricielles (MMPs) dans les cancers de sein (Menashi, *et al.*, 2003) et de la tête et du cou (Kondapaka, *et al.*, 1997), participant ainsi à la dégradation de la matrice extracellulaire. Enfin, l'AREG régule et active le potentiel d'invasivité et la motilité des cellules cancéreuses (Gschwind, *et al.*, 2003, Willmarth and Ethier, 2006) et c'est un marqueur prédictif positif de la présence de métastases dans le cancer colorectal (Yamada, *et al.*, 2008).

## **2.5 Résistance à l'apoptose**

La cellule cancéreuse acquiert la résistance à l'apoptose par différentes stratégies, comme l'inactivation de p53 ou la transmission de signaux antiapoptotiques. Des boucles autocrines impliquant les facteurs de croissance de la famille de l'EGF ont été décrites dans la tumorigenèse et la résistance à l'apoptose des tumeurs pulmonaires (Shivapurkar, *et al.*, 2003), et l'activité antiapoptotique de l'AREG est déjà démontrée pour les carcinomes du sein (De Luca, *et al.*, 1999) et du foie (Castillo, *et al.*, 2006). De même, l'AREG peut également conférer une résistance à l'apoptose induite par les cannabinoïdes dans le gliome (Lorente, *et al.*, 2009). Dans le CBNPC, l'AREG coopère avec l'IGF1 pour inhiber l'apoptose induite par privation de sérum (Hurbin, *et al.*, 2002) et l'utilisation d'anticorps anti-AREG restaure l'apoptose des cellules de CBNPC. La combinaison d'AREG et d'IGF1 active une voie de survie dépendante des PKC mais indépendante des MAPK et des PI3K (Hurbin, *et al.*, 2005). Cette voie aboutit à l'inactivation des molécules proapoptotiques Bad et **BAX**, et conduit à la résistance à l'apoptose.

CBNPC sensibles au gefitinib	CBNPC résistants au gefitinib
Présence de mutations activatrices de l'EGFR	-
Population principalement féminine	Population principalement masculine
Non-fumeurs	Fumeurs
Tumeur de type adénocarcinome	Tumeur de type non-adénocarcinome
?	Taux élevé d'AREG sérique

**Tableau 10. Caractéristiques de sous-groupes de patients sensibles ou résistants au gefitinib**  
*D'après (Ishikawa, et al., 2005, Sharma, et al., 2007)*

## **2.6 Résistance au traitement**

L'AREG a été décrite comme participant à la résistance à différents traitements en cancérologie. Elle peut tout d'abord participer à la résistance aux agents de chimiothérapie conventionnelle comme le cisplatine dans le cancer du sein (Eckstein, *et al.*, 2008), mais également induire la résistance à un traitement hormonal anti-cancéreux comme l'exemestane, un inhibiteur de l'aromatase (Wang, *et al.*, 2008).

Dans les CBNPC, les patients répondeurs au gefitinib présentent une expression génique de l'AREG différente de celle des non-répondeurs. Ces données ont été confirmées par RT-PCR, par immunohistochimie et par des dosages ELISA : l'AREG est surexprimée chez les non-répondeurs, alors qu'elle est indétectable chez les répondeurs (Kakiuchi, *et al.*, 2004). De plus, les patients avec un CBNPC qui possèdent le pronostic vital le plus mauvais sont ceux qui possèdent des concentrations d'AREG sériques élevées. Ce paramètre étant corrélé à la résistance au gefitinib (Ishikawa, *et al.*, 2005). Ce sous-groupe de patients non-répondeurs au gefitinib est principalement constitué d'hommes, fumeurs, avec des CBNPC autres que des adénocarcinomes. Il est intéressant de constater qu'*a contrario*, la plupart des patients chez qui le gefitinib est efficace sont des femmes, non fumeurs, avec des CBNPC de type adénocarcinome (Sharma, *et al.*, 2007) et qui présentent des mutations de l'EGFR. Le **Tableau 10** résume ces caractéristiques.

Ces données indiquent que l'AREG sérique pourrait être un marqueur intéressant de résistance à de nombreux traitements, y compris les thérapies ciblées comme le gefitinib chez les patients présentant des CBNPC de stade avancé.



# **Objectifs du Travail de Thèse**



Le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer dans le monde, tant chez l'homme que chez la femme. Le cancer bronchique non-à petites cellules (CBNPC) représente 80% des cancers du poumon et possède un pronostic extrêmement médiocre, avec une survie à 5 ans inférieure à 15%, et ce malgré l'emploi de traitements comme la chirurgie, la radiothérapie ou la chimiothérapie. Un des enjeux actuels de la recherche est d'adapter le traitement du CBNPC pour proposer des thérapies ciblées plus efficaces et moins agressives. Cependant la réponse à ces thérapies varie en fonction du profil d'expression génique et protéique de la tumeur. Il est donc primordial d'améliorer notre compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la carcinogenèse bronchique afin d'identifier 1/ des marqueurs pronostiques et prédictifs de la réponse aux traitements, et 2/ de nouvelles cibles thérapeutiques afin de développer des stratégies adaptées à chaque profil tumoral.

Notre équipe travaille depuis plusieurs années sur le développement de nouveaux traitements des CBNPC destinés à rétablir les voies d'induction de l'apoptose ou à réguler la prolifération non contrôlée de ces cancers. Dans ce contexte, le laboratoire a mis en évidence d'importants mécanismes de résistance à l'apoptose développés par les cellules d'adénocarcinome pulmonaire qui résistent à l'apoptose induite par chimiothérapie, privation sérique ou surexpression de la protéine p53 (Dubrez, *et al.*, 2001a, Dubrez, *et al.*, 2001b, Hurbin, *et al.*, 2002). Nous avons identifié notamment une boucle de survie autocrine/paracrine faisant intervenir la coopération de 2 facteurs de croissances AREG et IGF1. L'association de ces deux ligands induit l'activation de leurs récepteurs respectifs EGFR et IGF1-R et permet d'initier une voie de signalisation anti-apoptotique dépendante des PKC, et indépendante des MAPK et PI3K. Cette voie de signalisation aboutit à l'inactivation de Bax par séquestration cytoplasmique (Dubrez, *et al.*, 2001b, Hurbin, *et al.*, 2005, Hurbin, *et al.*, 2002).

En parallèle, de nouveaux traitements de thérapie ciblée ont été développés pour les CBNPC. Parmi eux, le gefitinib, un inhibiteur de la tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR-TKI) a montré de puissants effets anti-prolifératifs dans les CBNPC de stades avancés, après échec de deux lignes de chimiothérapie (Fukuoka, *et al.*, 2003). Le gefitinib ne confère cependant pas d'avantage de survie par rapport au placebo sur des cohortes de patients non sélectionnés (Thatcher, *et al.*, 2005).

Toutefois, certains sous-groupes de patients répondent mieux à ce traitement, en particulier les patients de sexe féminin, non-fumeurs, d'origine asiatique, et porteurs de tumeurs de type adénocarcinome, et/ou avec des mutations activatrices de l'EGFR (Lynch, *et al.*, 2004).

En revanche, d'autres facteurs, comme les mutations activatrices de K-RAS (Sharma, *et al.*, 2007), l'amplification de MET (Engelman, *et al.*, 2007), ou l'expression de l'IGF1-R (Morgillo, *et al.*, 2007), sont prédictifs d'une résistance aux EGFR-TKI dans les CBNPC. Cependant, aucun facteur isolé ne permet actuellement de parfaitement prédire la sensibilité des patients aux EGFR-TKI.

Une étude clinique a montré que les patients porteurs de CBNPC de stade avancé qui résistent au gefitinib ont des taux d'AREG sérique élevés (Ishikawa, *et al.*, 2005). Sur la base des résultats du laboratoire montrant le rôle anti-apoptotique de l'AREG, nous avons émis l'hypothèse que l'AREG participe à la résistance à ces thérapies anti-EGFR. Les objectifs définis dans le cadre de mon travail de thèse s'appuient directement sur ces données.

Dans un premier temps nous avons cherché à démontrer le rôle de l'AREG dans la résistance au gefitinib, et notamment la résistance à l'apoptose induite par le gefitinib. Les résultats obtenus nous ont permis de démontrer que l'AREG inhibe l'effet antitumoral du gefitinib en inactivant Bax et font l'objet d'une première publication dans *Molecular Therapy*. Dans un second temps, nous avons cherché à identifier les acteurs moléculaires qui interviennent dans la voie de résistance au gefitinib mise en jeu par l'AREG et qui aboutissent à l'inactivation de Bax. Nous avons ainsi caractérisé une nouvelle voie de signalisation induisant la résistance aux EGFR-TKI, qui dépend de l'acétylation de Ku70. Ce mécanisme d'action original suggère de nouvelles applications thérapeutiques pour contourner la résistance au gefitinib. Ce travail fait l'objet d'une seconde publication dans *Molecular Therapy*.

# Résultats



## **I L'Amphiréguline induit l'inhibition de BAX et la résistance au gefitinib dans les CBNPC.**

### **1.1 Présentation de l'étude et principaux résultats**

En amont de ce travail, notre équipe avait montré le rôle de l'AREG dans la résistance à l'apoptose induite par privation sérique dans les CBNPC (Hurbin, *et al.*, 2005, Hurbin, *et al.*, 2002). La significativité clinique potentielle de ce résultat a été soulignée par une étude montrant qu'un niveau élevé d'AREG et de TGF- $\alpha$  dans le sérum des patients porteurs de CBNPC avancés est un facteur prédictif d'une résistance au gefitinib (Ishikawa, *et al.*, 2005), suggérant l'implication de l'AREG dans la résistance au gefitinib.

Pour démontrer le rôle de l'AREG dans la résistance au gefitinib, nous avons utilisé deux lignées cellulaires de CBNPC : les cellules d'adénocarcinome H322, qui ne sécrètent pas d'AREG et les cellules H358 qui sécrètent beaucoup d'AREG (Hurbin, *et al.*, 2002). Les cellules H358 résistent à l'apoptose induite par le gefitinib, contrairement aux cellules H322. L'ajout d'AREG recombinante inhibe l'apoptose induite par le gefitinib dans les cellules H322. Inversement, l'inactivation de l'expression de l'AREG par ARN interférence (SiRNAs) dans les cellules H358, rétablit l'apoptose induite par le gefitinib. Ces données confirment le rôle important et spécifique de l'AREG dans la résistance au gefitinib.

L'activité du gefitinib a été reliée aux molécules de la famille de Bcl-2 (Ariyama, *et al.*, 2006) et le laboratoire a démontré que l'AREG inhibe l'apoptose induite par privation sérique en inactivant Bax dans le cytoplasme des cellules (Hurbin, *et al.*, 2005). Nous avons analysé dans notre modèle cellulaire le lien entre l'AREG, le gefitinib et l'inactivation de Bax. Nous avons analysé l'expression de Bax par western blot, son activation par cytométrie en flux avec un anticorps spécifique de la forme active de Bax et sa localisation subcellulaire par western blot après fractionnement cellulaire. Nos résultats montrent que l'AREG, en présence de gefitinib, diminue le niveau d'expression de Bax par un mécanisme dépendant du protéasome, inhibe son changement de conformation et sa translocation à la mitochondrie. Ces effets sont tous abolis par les SiRNAs anti-AREG. Ces données suggèrent que l'AREG inhibe l'apoptose

induite par le gefitinib dans les cellules de CBNPC en inactivant Bax dans le cytoplasme des cellules.

Nous avons également analysé l'effet des SiRNAs anti-AREG *in vivo* dans un modèle de xénogreffe de cellules H358 chez la souris Nude. Les souris ont été traitées par SiRNAs anti-AREG ou par gefitinib, ou par les deux traitements associés. Nous montrons que les SiRNAs anti-AREG contrecarrent la résistance au gefitinib.

## 1.2 Article 1

Busser B., Sancey L., Josserand V., Niang C., Favrot M., Coll JL., et Hurbin A. Amphiregulin promotes BAX inhibition and resistance to gefitinib in Non-Small Cell Lung Cancers. **Molecular Therapy**, 2009. Epub ahead of print.

# Amphiregulin Promotes BAX Inhibition and Resistance to Gefitinib in Non-small-cell Lung Cancers

Benoît Busser<sup>1-3</sup>, Lucie Sancey<sup>1,2</sup>, Véronique Josserand<sup>1,2</sup>, Carole Niang<sup>1,2</sup>, Marie C Favrot<sup>1-3</sup>, Jean-Luc Coll<sup>1,2</sup> and Amandine Hurbin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U823, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France; <sup>2</sup>Université Joseph Fourier, Grenoble, France; <sup>3</sup>CHRU Grenoble, Hôpital Michallon, UF Cancérologie Biologique et Biothérapie, Grenoble, France

Molecular resistance mechanisms affecting the efficiency of receptor tyrosine kinase inhibitors such as gefitinib in non-small-cell lung cancer (NSCLC) cells are not fully understood. Amphiregulin (Areg) overexpression has been proposed to predict NSCLC resistance to gefitinib and we have established that Areg-overexpressing H358 NSCLC cells resist apoptosis. Here, we demonstrate that Areg prevents gefitinib-induced apoptosis in NSCLC cells. We show that H358 cells are resistant to gefitinib in contrast to H322 cells, which do not overexpress Areg. Inhibition of Areg expression by small-interfering RNAs (siRNAs) restores gefitinib sensitivity in H358 cells, whereas addition of recombinant Areg confers resistance in H322 cells. Areg knockdown overcomes resistance to gefitinib and induced apoptosis in NSCLC H358 cells *in vitro* and *in vivo*. Under gefitinib treatment, Areg decreases the expression of the proapoptotic protein BAX, inhibits its conformational change and its mitochondrial translocation. Thus, in the presence of Areg, gefitinib-mediated apoptosis is reduced because BAX is sequestered in the cytoplasm. This suggests that treatments using epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors may be poorly efficient in patients with elevated levels of Areg. These findings indicate the need for inhibition of Areg to enhance the efficiency of the EGFR inhibitors in patients suffering NSCLC.

Received 20 March 2009; accepted 9 September 2009; advance online publication 13 October 2009. doi:10.1038/mt.2009.226

## INTRODUCTION

Lung cancer is the leading cause of cancer mortality in the world. Non-small-cell Lung Cancers (NSCLC) account for ~80% of lung cancers. Once diagnosed, the 5-year survival rate of NSCLC reaches no >12% despite different treatments such as chemotherapy, radiotherapy, and surgery.<sup>1</sup> Therefore, novel therapeutic strategies improving the prognosis of lung cancer patients are urgently needed.

Epidermal growth factor receptor (EGFR) is involved in the development of various human cancers. In NSCLC, EGFR is frequently overexpressed and associated with a poor prognosis

of patients.<sup>2</sup> In the last decade, a novel class of inhibitors targeting the kinase activity of the EGFR (the EGFR-TKI family) was developed to overcome the poor successes of classical chemotherapy. A member of this family, gefitinib, showed potent antitumor effects in clinical trials for NSCLC treatment after previous chemotherapy,<sup>3</sup> but failed to improve the overall survival benefit in an unselected population.<sup>4</sup> Predictive markers of gefitinib treatment sensitivity have therefore been extensively studied in order to identify patients likely to respond to EGFR-TKIs. *EGFR* gene somatic mutations have been found associated with response to gefitinib.<sup>5</sup> These mutations activate the EGFR tyrosine kinase and are mainly associated with adenocarcinoma histology, never-smoking status, female gender, and Asian descent.<sup>6</sup> An increased *ErbB2/Her-2* gene copy number is another marker associated with gefitinib sensitivity.<sup>6</sup> Other factors such as *KRAS*-activating mutation,<sup>6</sup> *MET* amplification,<sup>7</sup> and insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) expression<sup>8</sup> are predictors of resistance to gefitinib treatment in NSCLC. Unfortunately, no single factor examined so far, has been able to perfectly predict the sensitivity of patients to gefitinib treatment.

Amphiregulin (Areg), an EGF-related growth factor, is associated with shortened survival of patients with NSCLC and poor prognosis. A high level of Areg in the serum of patients with advanced NSCLC might have a diagnostic value for predicting a poor response to gefitinib.<sup>9</sup> This suggests that Areg may induce gefitinib resistance in NSCLC. Our group previously reported the antiapoptotic activity of Areg in NSCLC cell lines,<sup>10</sup> through the inactivation of the proapoptotic protein BAX.<sup>11</sup> In this study, we show that gefitinib antitumor activity in NSCLC is significantly reduced in the presence of Areg, because of the inactivation of BAX. In addition, using *in vivo* models of NSCLC in mice, we present evidence that gefitinib efficiency is improved if expression of Areg is inhibited by small-interfering RNAs (siRNAs) co-treatments.

## RESULTS

### Areg inhibits gefitinib-induced apoptosis in NSCLC cell lines

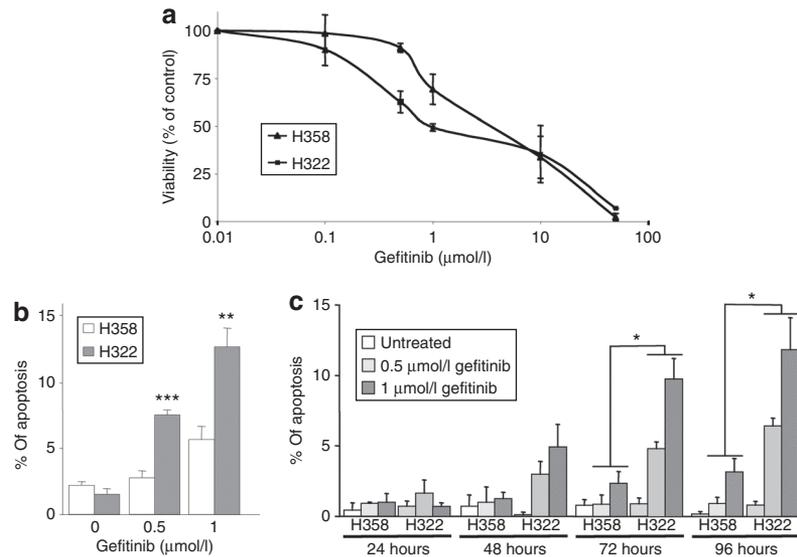
The H358 and H322 NSCLC cell lines, expressing wild-type EGFR, were chosen for an initial study on the effect of gefitinib. We first

Correspondence: Amandine Hurbin, INSERM U823, Institut Albert Bonniot, BP170 Grenoble, F-38042 Cedex 9, France.  
E-mail: amandine.hurbin@ujf-grenoble.fr

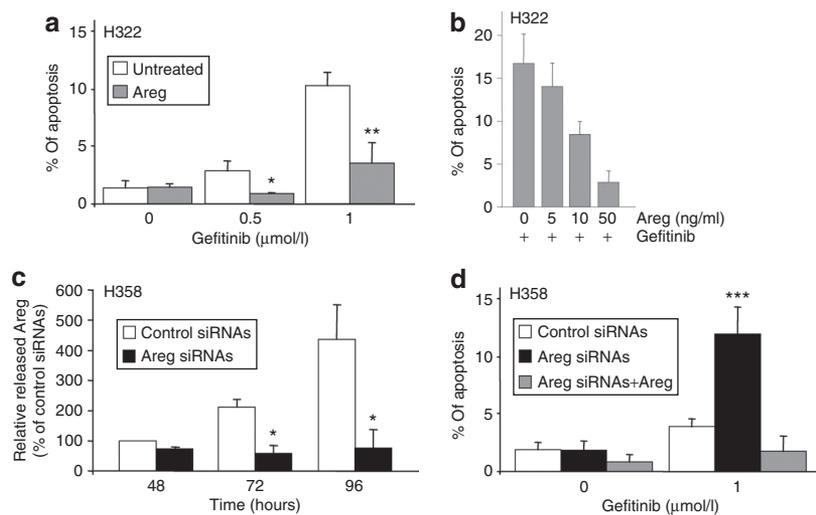
measured the effect of gefitinib on H358 and H322 cell proliferation. An MTT (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay revealed that H322 cells were slightly more sensitive than H358 cells to this drug (Figure 1a). Approximately 1  $\mu\text{mol/l}$  gefitinib inhibited the proliferation of H322 cells after 96 hours of treatment. In contrast, the  $\text{IC}_{50}$  (half-maximal inhibitory concentration) was 3–4 times higher in H358 cells. Flow cytometry analysis of propidium-iodide-stained H322 and H358 cells revealed that treatment with 1  $\mu\text{mol/l}$  gefitinib for 4 days resulted in no marked change in the cell-cycle distribution (data not shown). However, 0.5 and 1  $\mu\text{mol/l}$  gefitinib induced significant and dose-dependent

apoptosis in H322 cells but not in H358, as shown with an active caspase-3 labeling assay (Figure 1b) or by counting the number of apoptotic cells with condensed nuclear DNA after Hoechst staining (Figure 1c).

We previously showed that H358, but not H322 cells, secrete high levels of Areg, which induces the inhibition of apoptosis.<sup>10</sup> To assess the involvement of Areg in gefitinib resistance, we added recombinant Areg in the culture medium of H322 cells. Areg prevented gefitinib-induced apoptosis (Figure 2a), in a dose-dependent manner (Figure 2b). To confirm the role of Areg, we transfected the Areg-overexpressing H358 cells with anti-Areg siRNAs (Areg siRNAs),



**Figure 1** Gefitinib effect in non-small-cell lung cancer (NSCLC) cells. (a) The MTT assay in H358 and H322 NSCLC cells treated with the indicated concentrations of gefitinib for 96 hours. (b,c) Effect of 0.5 or 1  $\mu\text{mol/l}$  gefitinib on H358 and H322 cells. Apoptosis was analyzed after 96 hours by (b) detection of the active caspase-3 and flow cytometry or (c) after 24–96 hours after counting Hoechst-stained cells. Results are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , for comparison between H358 and H322 cells.

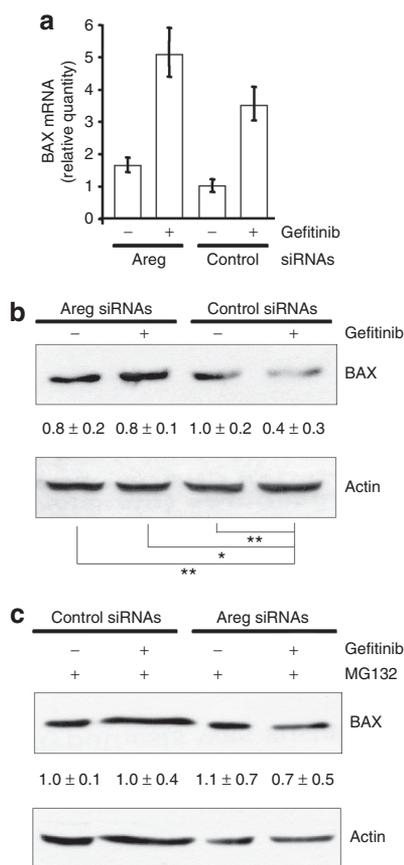


**Figure 2** Areg inhibits gefitinib-induced apoptosis. (a) H322 cells were treated with 50 ng/ml recombinant human Areg and/or gefitinib as indicated. (b) H322 cells were treated with the indicated concentrations of Areg and 0.5  $\mu\text{mol/l}$  gefitinib. (c) H358 cells were transfected with Areg or control siRNAs. The efficiency of Areg knockdown was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay. Results are expressed as a rate of Areg released 48 hours after control siRNAs transfection and as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). (d) H358 cells were transfected with control or Areg siRNAs and treated with gefitinib and/or 50 ng/ml Areg. Apoptosis was scored after counting Hoechst-stained cells (a,b,d). Results are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , for comparison between treated and control cells. Areg siRNAs, amphiregulin small-interfering RNAs.

which inhibited 83% of secreted Areg level 96 hours after transfection, compared to control siRNAs (Figure 2c). Interestingly, although Areg siRNAs did not directly induce apoptosis, they significantly sensitized H358 cells to gefitinib, inducing three times more apoptosis than control siRNAs (Figure 2d). Again, Areg abolished this effect, demonstrating the specificity of the siRNAs. Altogether, these results show that Areg strongly reduces gefitinib proapoptotic activity.

### Areg inhibits gefitinib-induced apoptosis through BAX downregulation

We previously showed that Areg prevents apoptosis by inactivating the Bcl<sub>2</sub> family member BAX.<sup>10–12</sup> Recent data linked gefitinib antitumor activity to proapoptotic protein of the Bcl<sub>2</sub> family.<sup>13–15</sup> We therefore investigated the relationship between gefitinib activity, Areg, and BAX in H358 cells. We first studied BAX mRNA and protein levels following exposure to gefitinib. Upregulation of BAX mRNA was observed by real-time reverse transcriptase-PCR in gefitinib-



**Figure 3** Areg decreases the BAX protein level. H358 cells were transfected with control or Areg siRNAs. As indicated, 0.5  $\mu$ mol/l gefitinib and/or 3  $\mu$ mol/l MG132 were added. **(a)** Quantitative real-time RT-PCR for BAX mRNA on total RNA extracted from H358 cells. Relative gene expressions are expressed as a rate of BAX mRNA level after control siRNAs transfection. **(b, c)** Total cell lysates were subjected to western blotting using BAX antibody. Actin was used as protein level control. The values represent the relative intensity, quantified with ImageJ software, of BAX bands of treated samples to that of control cells, after being normalized to the respective actin and are represented by the mean  $\pm$  SD ( $n = 4$ ). \* $P \leq 0.05$  or \*\* $P \leq 0.01$  for comparison between control siRNAs in gefitinib-treated cells and the other treatments as indicated. Areg siRNAs, amphiregulin small-interfering RNAs.

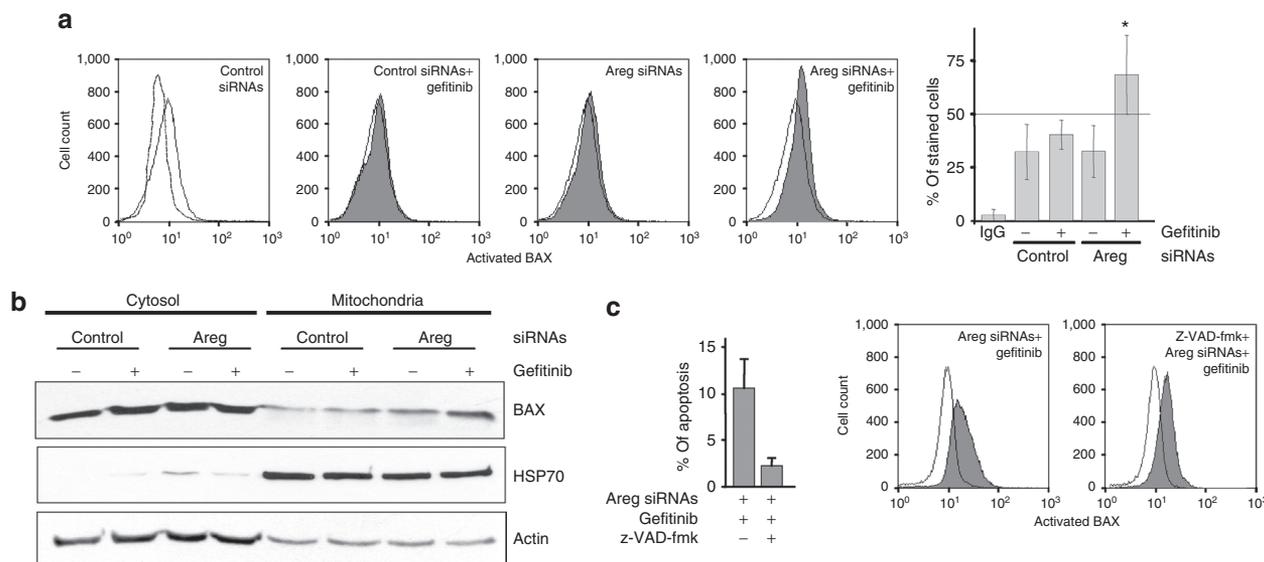
treated H358 cells (Figure 3a), but, surprisingly, gefitinib significantly decreased the BAX protein level (Figure 3b). In parallel, we demonstrated that the Areg knockdown did not change the level of BAX mRNA, but prevented the disappearance of the BAX protein. These results suggest that gefitinib augments BAX mRNA transcription independently of Areg, while Areg decreases the level of BAX protein in the presence of gefitinib by a post-transcriptional mechanism. As we know that BAX proapoptotic function is regulated by proteasomal degradation,<sup>16</sup> we studied the effect of the proteasome inhibitor MG132. Figure 3c shows that MG132 prevented BAX downregulation in gefitinib-treated H358 cells, suggesting that Areg augments BAX proteasomal degradation.

### Areg inhibits gefitinib-induced apoptosis by inactivation of BAX

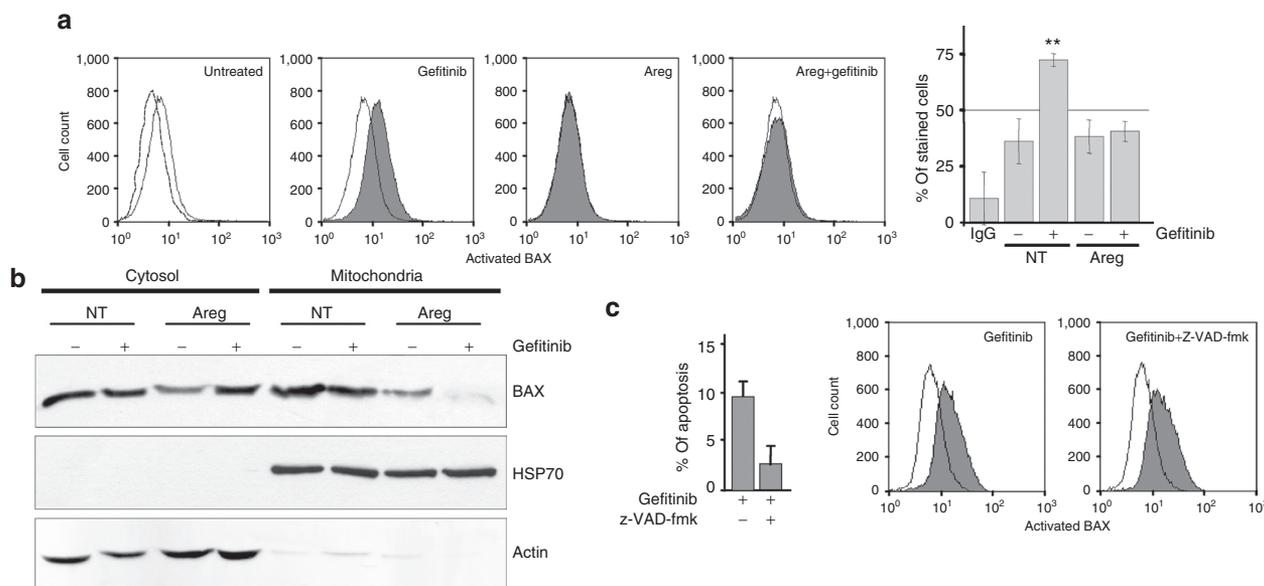
We analyzed the activation of BAX by flow cytometry using an antibody that recognizes the exposed N-terminus extremity of the activated form of BAX but not the protein in its inactive conformation.<sup>11,17</sup> BAX immunofluorescence and the percentage of stained H358 cells (Figure 4a) were not modified by the gefitinib treatment, showing that BAX is not activated in these conditions. As well, inhibition of Areg expression using siRNAs had a limited influence on the exposure of the N-terminus moiety of BAX. However, the intensity of fluorescence and the percentage of stained cells were significantly increased when the cells were co-treated by Areg siRNAs and gefitinib (Figure 4a), suggesting that Areg inhibits BAX conformational change under a gefitinib treatment and thus confers resistance to BAX-mediated apoptosis.

Activated BAX translocates from the cytoplasm to the mitochondria, leading to cell apoptosis. To further analyze the influence of Areg on BAX subcellular localization, H358 cells were fractionated into cytosolic and mitochondrial fractions. In untreated H358 cells, BAX was present mainly in the cytosolic fraction and to a lower extent in the mitochondrial fraction (Figure 4b). Consistent with BAX activation detected by flow cytometry, gefitinib or Areg siRNAs alone did not modify BAX subcellular distribution, but the combination of Areg knockdown and gefitinib treatment induced its accumulation in the mitochondrial fraction. These results suggest that Areg inhibited BAX conformational change, and its mitochondrial translocation (Figure 4a,b). Interestingly, treating the cells with 10  $\mu$ mol/l of the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk inhibited the gefitinib-induced apoptosis in Areg siRNAs-transfected H358 cells, but not BAX activation. This demonstrated that Areg prevents apoptosis by inactivating BAX and the subsequent caspase activation (Figure 4c).

To confirm our data, we further analyzed BAX activation and subcellular localization in the gefitinib-sensitive H322 cells. As expected, 0.5  $\mu$ mol/l gefitinib treatment induced BAX activation in H322 cells. This effect was abolished in the presence of recombinant Areg (Figure 5a). Investigation of BAX subcellular localization showed that in untreated or Areg-treated H322 cells, BAX was present in the cytosolic and mitochondrial fractions (Figure 5b). However, Areg strongly inhibited BAX accumulation in the mitochondrial fraction in gefitinib-treated H322 cells. In addition, and as observed in H358 cells, 10  $\mu$ mol/l z-VAD-fmk



**Figure 4** Areg inactivates BAX in H358 cells. H358 cells were transfected with control or Areg siRNAs. As indicated, 0.5  $\mu\text{mol/l}$  gefitinib and/or 10  $\mu\text{mol/l}$  z-VAD-fmk were added. **(a)** Flow cytometry analysis of BAX immunostaining using activated-BAX antibody. Dotted histogram and IgG, irrelevant antibody; open histogram, control cells; filled histogram, treated cells as indicated. Percentages of activated-BAX-stained cells were expressed as mean  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ). \* $P < 0.05$ , more significant than control. **(b)** H358 cells were fractionated into cytosolic and mitochondrial fractions. Both fractions extracts were subjected to western blotting using BAX antibody. Mitochondrial HSP70 was used for checking that cytosolic extracts were mitochondria-free and actin for loading control. **(c)** Apoptosis was scored after counting Hoechst-stained cells. Flow cytometry analysis of BAX immunostaining as described in **a**. Areg siRNAs, amphiregulin small-interfering RNAs.



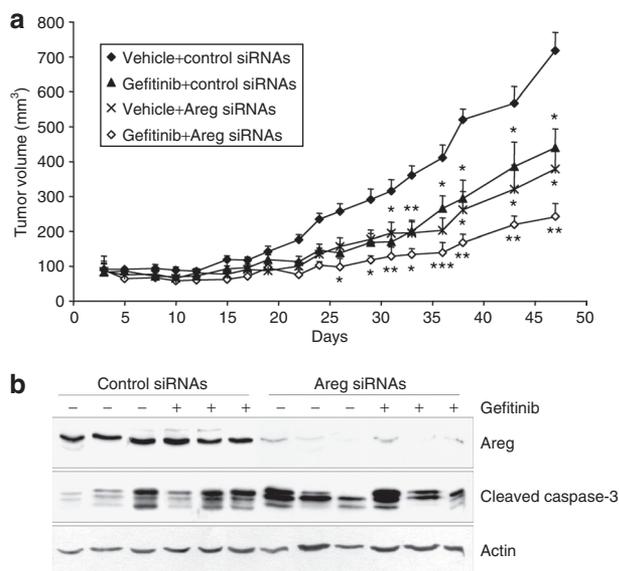
**Figure 5** Areg inactivates BAX in H322 cells. H322 cells were treated with 50 ng/ml Areg and/or 0.5  $\mu\text{mol/l}$  gefitinib and/or 10  $\mu\text{mol/l}$  z-VAD-fmk were added as indicated. **(a)** Flow cytometry analysis of BAX immunostaining using activated-BAX antibody. Dotted histogram and IgG, irrelevant antibody; open histogram, control cells; filled histogram, treated cells as indicated. Percentages of activated-BAX-stained cells were expressed as mean  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ). \*\* $P < 0.01$ , more significant than control. **(b)** H322 cells were fractionated into cytosolic and mitochondrial fractions. Both fractions extracts were subjected to western blotting using BAX antibody. Mitochondrial HSP70 was used for checking that cytosolic extracts were mitochondria-free and actin for loading control. **(c)** Apoptosis was scored after counting Hoechst-stained cells. Flow cytometry analysis of BAX immunostaining as described in **a**.

did not modify BAX activation in gefitinib-treated H322 cells, whereas apoptosis was inhibited (Figure 5c).

These observations strongly suggest that Areg inhibits the gefitinib-induced apoptosis by proteasomal degradation of BAX, but also by inhibition of BAX conformational activation and capacity to translocate to the mitochondria.

### Antitumor efficacy of Areg and EGFR dual targeting *in vivo*

We then wanted to determine whether Areg depletion could enhance the antitumor activity of gefitinib *in vivo*. We tested the effects of gefitinib, Areg siRNAs, and their combination on the growth of H358 NSCLC xenograft tumors established in nude



**Figure 6** Effects of combined treatment with gefitinib and Areg knockdown *in vivo*. Effects of combined treatment with gefitinib and Areg siRNAs on growth of H358 xenograft tumors in athymic nude mice. The mice were randomly assigned to one of four treatment groups. (a) Effect of gefitinib (10 mg/kg body weight) or vehicle, administered orally 5 days/week, and control or Areg siRNAs (16  $\mu$ g/day, administered intraperitoneally 4 days/week) on tumor volume. Points, mean tumor volume ( $n = 8$ ); bars, SE. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  for comparisons between treated and control for each series of experiments. (b) Effect of gefitinib and Areg siRNAs on the expression of Areg and activated-caspase-3 in H358 xenograft tumors, assessed by western blotting. Actin was used as loading control. Areg siRNAs, amphiregulin small-interfering RNAs.

mice. Groups of mice treated with gefitinib or Areg siRNAs alone showed reduced tumor growth as compared with the control group (Figure 6a). This effect was significantly more pronounced in the group of mice treated with gefitinib and Areg siRNAs. At the end of the study, the mean tumor volume in the combined treatment group was 33% ( $P < 0.01$ ) of the mean volume of the control group. As expected, western blot analysis of total protein extracts harvested from the H358 tumors at the end of this experiment showed that the levels of Areg were substantially decreased by Areg siRNAs (Figure 6b). Gefitinib or Areg siRNAs alone, as well as combined treatment, increased the level of cleaved-caspase-3 as compared to control. No significant difference between the treatments was observed in the proliferation index of tumoral cells (Ki67 nuclear protein immunolabelling, data not shown). Together, these findings suggest that gefitinib antitumor activity is more pronounced when Areg is knocked down.

## DISCUSSION

In this study, we show that Areg prevents gefitinib-induced apoptosis in NSCLC cells through BAX inactivation. In the presence of gefitinib, Areg decreases BAX expression and inhibits its conformational change and its mitochondrial translocation. Areg knockdown by siRNAs restores the BAX expression level and its functional activation. This leads to a higher concentration of the active form of BAX in the mitochondria and thus to a stronger antitumor activity of gefitinib in NSCLC cells *in vitro* and *in vivo*.

Gefitinib is a major molecule used in NSCLC treatment. However, resistance mechanisms to EGFR-TKI have limited its efficiency to a restricted group of patients, especially those presenting activating mutation in the adenosine triphosphate-binding site of EGFR-TKI.<sup>5,18</sup> An increasing amount of evidence has suggested, however, that several pathways can confer resistance to EGFR-TKI therapy.<sup>6</sup> We observed that H322 cells have gefitinib  $IC_{50}$  around 1  $\mu$ mol/l, as already described,<sup>8</sup> whereas various gefitinib sensitivities with  $IC_{50}$  ranging from  $\leq 1$  to  $\geq 10$   $\mu$ mol/l are reported for H358 cells.<sup>8,15,19–21</sup> Accordingly, we observed gefitinib  $IC_{50}$  around 4  $\mu$ mol/l for H358 cells. Our data revealed that Areg-expressing H358 cells are less sensitive to apoptosis induced by 1  $\mu$ mol/l gefitinib than H322 cells that do not secrete Areg. Moreover, Areg knockdown overcomes the resistance of H358 cells to gefitinib, whereas Areg protects the H322 cells from gefitinib-induced apoptosis, demonstrating the involvement of Areg in NSCLC cell resistance to gefitinib. The Areg autocrine loop is well characterized in the growth and survival of lung cancer cells.<sup>10,11</sup> Areg is hardly detectable in lung tumor cells that are sensitive to gefitinib and is significantly overexpressed in gefitinib-resistant lung tumor cells.<sup>22</sup> Overexpression of Areg is associated with shortened survival of patients with NSCLC, and a high level of Areg in the serum of patients with advanced NSCLC might have a high diagnostic value for predicting poor response to gefitinib.<sup>9</sup> Areg might be a principal activator of the ligand-receptor autocrine pathway leading to the gefitinib resistance of NSCLC cells, independently of EGFR mutations.

Our results underline that Areg prevents gefitinib-induced apoptosis by decreasing BAX expression and activation. Both phenomena are additive and may explain the low sensitivity of H358 to gefitinib. Protein p53 is a major regulator of BAX.<sup>23</sup> In our model, the mechanism of BAX regulation by Areg is independent of p53 because H358 cells are deleted for *p53* and H322 cells express a nonfunctional mutated p53. The difference between BAX mRNA and its protein concentration suggested that Areg works at the post-transcriptional level. This is sustained by our result using a treatment with the proteasome inhibitor MG132, which prevented BAX degradation, suggesting that Areg stimulates BAX proteasomal degradation. Interestingly, the regulation of BAX proapoptotic function by its ubiquitylation and subsequent proteasomal degradation has already been described.<sup>16</sup> We previously showed that H358 NSCLC cells resist BAX-mediated apoptosis due to the inhibition of its conformational change and of its translocation from the cytosol to the mitochondria.<sup>12</sup> Here, we show that this phenomenon is strongly reducing the sensitivity of NSCLC to gefitinib if Areg is present. In contrast, without Areg, gefitinib induces apoptosis by enhancing BAX expression and activation.

The relation between Areg and BAX activation is not fully understood. We previously observed that Areg stimulates cross talk between EGFR and IGF1R through a protein kinase C-dependent pathway that leads to BAX inactivation in NSCLC cells.<sup>10,11</sup> Under gefitinib treatment, Morgillo *et al.* demonstrated that an EGFR/IGF1R heterodimer confers resistance to EGFR-TKI in NSCLC cell lines.<sup>8,24</sup> We hypothesized that Areg confers resistance to gefitinib-induced apoptosis through EGFR/IGF1R cross talk and the protein kinase C-dependent survival pathway. In agreement, we observed

the heterodimerization of IGF1R with EGFR in gefitinib-treated Areg-overexpressing H358 cells, but not in Areg-lacking H322 cells (**Supplementary Figure S1**). In addition, BAX can be sequestered in the cytoplasm in an inactive conformation by the auto-antigen Ku70 (refs. 25,26). Moreover, we have investigated the relationship between Areg and Ku70 in our NSCLC model and have demonstrated that Areg enhances BAX sequestration and inactivation by Ku70 (see ref. 27).

Our results have a direct impact on the efficiency of NSCLC treatment with gefitinib. The data showing enhanced apoptosis by Areg siRNAs suggest that Areg expression is an important factor for gefitinib sensitivity. In the recent literature, Areg has already been associated with resistance to anticancer treatments such as exemestane-based hormone therapy<sup>28</sup> and cisplatin-based conventional chemotherapy<sup>29</sup> in breast cancer. Areg expression is associated with NSCLC's poor response to gefitinib.<sup>9,22</sup> Here, we demonstrated that Areg is also involved in resistance to gefitinib. Areg might therefore be a new biomarker of NSCLC cell resistance to targeted therapies, such as the EGFR-TKI molecule gefitinib, and could be used to identify patients likely to respond to EGFR-TKI.

In addition to being a potential biomarker, Areg might also be a therapeutic target, especially in NSCLC. Indeed, Areg siRNAs treatment significantly reduced H358 tumor growth *in vivo*. siRNAs-based treatments *in vivo* are usually poorly efficient, because they are difficult to deliver and can be toxic.<sup>30</sup> In our study, the significant antitumor efficacy of Areg siRNAs has shown neither weight loss nor treatment-related toxicity, indicating that appropriate amounts of siRNAs were used. In agreement, no inflammation and toxicity were reported with polyethylenimine (PEI)-complexed siRNAs *in vivo*.<sup>31</sup> Moreover, specific antihuman-Areg siRNA were administered systematically (intraperitoneally) and managed to successfully silence *in situ* Areg production in tumors, demonstrating a suitable vectorization and efficacy. Several clinical trials are currently based on siRNAs administration or PEI vectorization ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Results of these studies may help to foresee the safety and efficacy of siRNAs and PEI delivery for the treatment of human malignancies. siRNAs might thus play an increasing role in molecular therapies, especially in cancer treatment, after validation of human clinical trials.

The combination of Areg siRNAs and gefitinib co-treatments provides greater reduction of tumor growth in the absence of non-specific toxicity. The 10 mg/kg dose of gefitinib used in this study was determined in preliminary experiments (data not shown) and was selected as the dose which provided suboptimal gefitinib antitumor activity without side effects. To our knowledge, this is the first study with combined treatments targeting both Areg and EGFR. These results demonstrate the value of specific anti-Areg targeting, alone or associated with EGFR-TKI, although the efficiency of systemic nonviral delivery of these siRNAs *in vivo* is still an issue. It is actually necessary to inject large and expensive quantities of siRNAs and this may limit their utilization in clinical oncology unless they are delivered by viral vectors.<sup>32,33</sup> siRNAs directed against Areg delivered by adenovirus would be a suitable and potent strategy to inhibit its expression in gefitinib-based NSCLC therapy. Further studies are needed to validate whether the gefitinib combined with Areg targeting could enhance the objective response and survival rates in NSCLC patients. In addition,

as the tumor regression was not complete, it will be important to investigate whether the surviving tumoral cells are resistant to gefitinib *in vivo*, in the same way as observed with 10  $\mu\text{mol/l}$  gefitinib *in vitro* (**Figure 1a**). The development of a specific anti-Areg therapy would thus be suitable for treating these resistant cancers but could also benefit to other diseases where Areg is known as a bad prognostic biomarker.<sup>34</sup>

## MATERIALS AND METHODS

**Cell culture and drug treatments.** The human H358 and H322 NSCLC cell lines were from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and maintained in RPMI 1640 medium (Gibco, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Gefitinib was kindly provided by AstraZeneca France (Paris, France) and was prepared as 10 mmol/l stock solution in dimethyl sulfoxide and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Recombinant human Areg was from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in dimethyl sulfoxide and dissolved in fresh medium just before use. MG132 and z-VAD-fmk were from Sigma-Aldrich, prepared as 25  $\mu\text{g/ml}$  stock solution and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Cells were treated as indicated in figure legends.

**Cell proliferation assay.** Cells were seeded in 96-well plates overnight and treated with gefitinib for 96 hours. Cell proliferation was measured with the MTT assay, in accordance with the method described previously.<sup>35</sup>

**Transfections.** siRNAs targeting human Areg and nonspecific control siRNAs were synthesized by MWG Biotech (Roissy, France). Sequences of siRNAs targeting Areg were 5'-CGA-ACC-ACA-AAU-ACC-CTT-3' and 5'-CCU-GGA-AGC-AGU-AAC-AUG-CTT-3', and control siRNA sequence was 5'-CUU-ACG-CUC-ACU-ACU-GCG-ATT-3'. Transfection of duplex siRNAs was performed with Oligofectamine reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), following the manufacturer's instructions. siRNAs were transfected into 60% confluent cells at the final concentration of 200 nmol/l. After transfection, the efficiency of Areg knockdown was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay as previously described.<sup>10</sup>

**Apoptosis assays.** Cells were harvested and pooled. The morphological changes related to apoptosis were assessed by fluorescence microscopy after Hoechst 33342 (5  $\mu\text{g/ml}$ ; Sigma) staining of cells and the percent of apoptotic cells was scored after counting at least 500 cells. Active caspase-3 was detected by flow cytometry using phycoerythrin-conjugated monoclonal active caspase-3 antibody kit (Becton Dickinson Pharmingen, Pont de Claix, France), following manufacturer's instructions. Analysis was performed on a Becton Dickinson FACScan flow cytometer with CellQuest software (Becton Dickinson, Pont de Claix, France).

**Reverse transcriptase-qPCR.** Total RNA was extracted using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). RNA concentration was determined using Eppendorf Biophotometer AG22331 (Hamburg, Germany) and RNA integrity was assessed using the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Massy, France). Quantitative real-time reverse transcriptase-PCR for BAX mRNA (specific primers: forward 5'-ACTCCCCCGAGAGGTCTT-3'; reverse 5'-CAAAGTAGAAAAGGGCCGACAA-3') was performed on Stratagene 14 MX3005P apparatus. Total RNA (800 ng) was subjected to complementary DNA synthesis with Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix for qPCR (Invitrogen) and subsequently amplified during 40 PCR cycles (10 minutes at  $95^{\circ}\text{C}$ , cycles: 15 seconds at  $95^{\circ}\text{C}$ , 1 minute at  $60^{\circ}\text{C}$ ) using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Relative gene expression was calculated for each sample, as the ratio of BAX to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase mRNA copy number, thus normalizing BAX mRNA expression for sample-to-sample differences in RNA input.

**Protein immunostaining by flow cytometry.** Activated-BAX immunostaining analysis was performed as previously described.<sup>11,17</sup> Briefly, cells were fixed in paraformaldehyde 0.5% for 5 minutes at room temperature, washed and nonspecific binding sites were blocked with 2% bovine serum albumin in phosphate-buffered saline (PBS)/saponin 0.1% for 30 minutes at room temperature. Cells were then incubated for 2 hours at room temperature in the presence of an anti-BAX rabbit polyclonal antibody (N-20, Tebu, 1:100; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) raised against the peptide sequence amino acids of N-terminus BAX protein or rabbit irrelevant IgG (Becton Dickinson Pharmingen), washed, incubated for 30 minutes with Alexa 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) conjugate (1:1,000; Interchim, Montlucon, France), washed again and resuspended in PBS. All antibodies were diluted in PBS containing 0.1% saponin and 1% bovine serum albumin. Analysis was performed on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) using CellQuest software. Green fluorescence was excited at 488 nm and detected at 500–550 nm.

**Immunoblotting.** Cells were harvested, washed in PBS, and incubated in lysis buffer (10 mmol/l Tris–HCl pH 7.5, 120 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l dithiothreitol, 0.5% Nonidet P-40, 0.05% sodium dodecyl sulfate, supplemented with protease and phosphatase inhibitors). Protein content was assessed by the Bio-Rad D C Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories, Ivry sur Seine, France). Western blotting was done using anti-BAX (1/3,000; Becton Dickinson Pharmingen), anti-Areg (1/100; Abcam, Paris, France), anti-HSP70 (1/5,000; Affinity BioReagent, Brebières, France), or anti-cleaved-caspase-3 (Asp 175, 1:1,000; Cell Signaling, St Quentin les Yvelines, France) antibodies. To ensure equal loading and transfer, membranes were also probed for actin using antiactin antibody (1/1,000; Sigma). Western blotting was further processed by standard procedures and revealed by chemiluminescence (ECL; Amersham, Orsay, France).

**Subcellular fractionation.** Cells were fractionated into cytosolic and mitochondrial fractions using the Pierce Mitochondria Isolation Kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Brebières, France) according to manufacturer's instructions. Both fractions' extracts were assessed for protein content using the Bio-Rad D C Protein Assay kit, and 20 µg of proteins were subjected to electrophoresis and analyzed by western blotting for BAX content. The relative purity of fractions was ascertained by western blotting using antimitochondrial HSP70 as a marker of mitochondria. The equal loading and transfer were ensured by reprobing the membranes using anti-actin antibody.

**In vivo model.** The effect of the combination of gefitinib and anti-Areg siRNAs was measured on established subcutaneous tumor bearing mice. All the animal experiments were performed in agreement with the European Economic Community guidelines and the "Principles of laboratory animal care" (National Institutes of Health publication No. 86-23 revised 1985). The experimental protocol was submitted to ethical evaluation and the experiment received the accreditation number was #0128. Human lung adenocarcinoma H358 cells were harvested, and  $20 \times 10^6$  cells in PBS were injected subcutaneously into the flank of female NMRI nude mice (6–8 weeks old; Janvier, Le Genest Saint Isle, France). When tumor diameters reached 5 mm, the mice were randomized in four experimental groups (10 mice/group). Group 1 (control mice) received control siRNAs and a vehicle (Tween-80/5% glucose), group 2 received gefitinib and control siRNAs, group 3 received Areg siRNAs and a vehicle, and group 4 received both Areg siRNAs and gefitinib. *In vivo* transient transfections were carried out using jetPEI (PolyPlus Transfection, Strasbourg, France) according to the manufacturer's protocol. Complexes resulted in siRNA/PEI (N/P) ratio of 8 as suggested for DNA by the manufacturer and as determined as optimal for siRNAs in pilot experiments (data not shown). A volume of 16 µg/day of PEI-complexed siRNAs were injected intraperitoneally, 4 times a week. Gefitinib (10 mg/kg/day) in Tween-80/5% glucose was administered *per os* 5 times a week. Tumor growth was quantified by measuring twice a week the tumors in two dimensions with a Vernier caliper. The volume

was calculated as follow:  $a \times b^2 \times 0.4$ , where  $a$  and  $b$  are the largest and smallest diameters, respectively.<sup>36</sup> Results are expressed as volume  $\pm$  SEM. Mice bearing necrotic tumors or tumors  $\geq 1.5$  cm in diameter were euthanized immediately. On day 47, all mice were sacrificed and tumors were collected to determine whether the combination of gefitinib- and Areg siRNAs-induced apoptosis by western blotting.

**Statistical analyses.** Statistical significance of differences in control cells versus treated cells was analyzed by the Mann–Whitney test. Means comparisons among mice groups and statistical significance of differences in tumor growth in the combination treatment group and in single-agent treatment groups were analyzed by analysis of variance test. Statistics were done using the Statview 4.1 software (Abacus Concept, Berkeley, CA). In all statistical analyses, two-sided  $P$  values  $<0.05$  were considered statistically significant.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Figure S1.** Co-immunoprecipitation of EGFR and IGF1R.

## ACKNOWLEDGMENTS

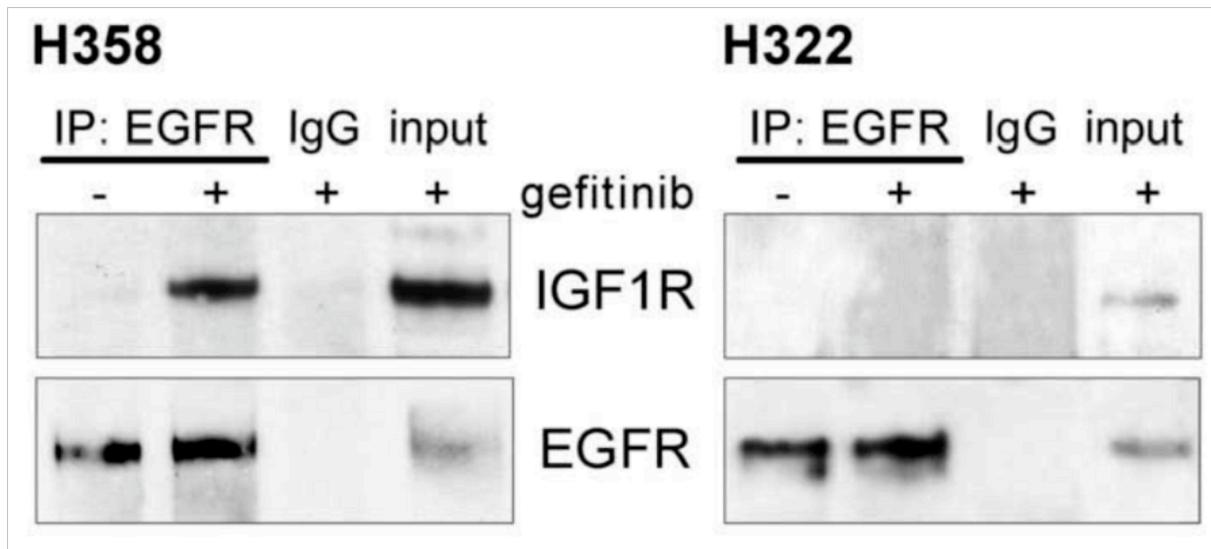
We thank AstraZeneca for gefitinib. This work was supported by grants and research fellowship from La Ligue contre le Cancer, comité de la Drôme; EpiPro program (InCa).

## REFERENCES

- Guessous, I, Cornuz, J and Paccaud, F (2007). Lung cancer screening: current situation and perspective. *Swiss Med Wkly* **137**: 304–311.
- Selvaggi, G, Novello, S, Torri, V, Leonardo, E, De Ciuli, P, Borasio, P *et al.* (2004). Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* **15**: 28–32.
- Fukuoka, M, Yano, S, Giaccone, G, Tamura, T, Nakagawa, K, Douillard, JY *et al.* (2003). Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J Clin Oncol* **21**: 2237–2246.
- Thatcher, N, Chang, A, Parikh, P, Rodrigues Pereira, J, Ciuleanu, T, von Pawel, J *et al.* (2005). Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet* **366**: 1527–1537.
- Lynch, TJ, Bell, DW, Sordella, R, Gurubhagavatula, S, Okimoto, RA, Brannigan, BW *et al.* (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* **350**: 2129–2139.
- Sharma, SV, Bell, DW, Settleman, J and Haber, DA (2007). Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* **7**: 169–181.
- Engelman, JA, Zejnullahu, K, Mitsudomi, T, Song, Y, Hyland, C, Park, JO *et al.* (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* **316**: 1039–1043.
- Morgillo, F, Kim, WY, Kim, ES, Ciardiello, F, Hong, WK and Lee, HY (2007). Implication of the insulin-like growth factor-IR pathway in the resistance of non-small cell lung cancer cells to treatment with gefitinib. *Clin Cancer Res* **13**: 2795–2803.
- Ishikawa, N, Daigo, Y, Takano, A, Taniwaki, M, Kato, T, Hayama, S *et al.* (2005). Increases of amphiregulin and transforming growth factor- $\alpha$  in serum as predictors of poor response to gefitinib among patients with advanced non-small cell lung cancers. *Cancer Res* **65**: 9176–9184.
- Hurbin, A, Dubrez, L, Coll, JL and Favrot, MC (2002). Inhibition of apoptosis by amphiregulin via an insulin-like growth factor-1 receptor-dependent pathway in non-small cell lung cancer cell lines. *J Biol Chem* **277**: 49127–49133.
- Hurbin, A, Coll, JL, Dubrez-Daloz, L, Mari, B, Auburger, P, Brambilla, C *et al.* (2005). Cooperation of amphiregulin and insulin-like growth factor-1 inhibits Bax- and Bad-mediated apoptosis via a protein kinase C-dependent pathway in non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem* **280**: 19757–19767.
- Dubrez, L, Coll, JL, Hurbin, A, Solary, E and Favrot, MC (2001). Caffeine sensitizes human H358 cell line to p53-mediated apoptosis by inducing mitochondrial translocation and conformational change of BAX protein. *J Biol Chem* **276**: 38980–38987.
- Costa, DB, Halmos, B, Kumar, A, Schumer, ST, Huberman, MS, Boggon, TJ *et al.* (2007). BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations. *PLoS Med* **4**: 1669–1679; discussion 1680.
- Gong, Y, Somwar, R, Politi, K, Balak, M, Chmielecki, J, Jiang, X *et al.* (2007). Induction of BIM is essential for apoptosis triggered by EGFR kinase inhibitors in mutant EGFR-dependent lung adenocarcinomas. *PLoS Med* **4**: e294.
- Cragg, MS, Kuroda, J, Puthalakath, H, Huang, DC and Strasser, A (2007). Gefitinib-induced killing of NSCLC cell lines expressing mutant EGFR requires BIM and can be enhanced by BH3 mimetics. *PLoS Med* **4**: 1681–1689; discussion 1690.
- Amsel, AD, Rathaus, M, Kronman, N and Cohen, HY (2008). Regulation of the proapoptotic factor Bax by Ku70-dependent deubiquitylation. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 5117–5122.
- Desagher, S, Osen-Sand, A, Nichols, A, Eskes, R, Montessuit, S, Lauper, S *et al.* (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* **144**: 891–901.

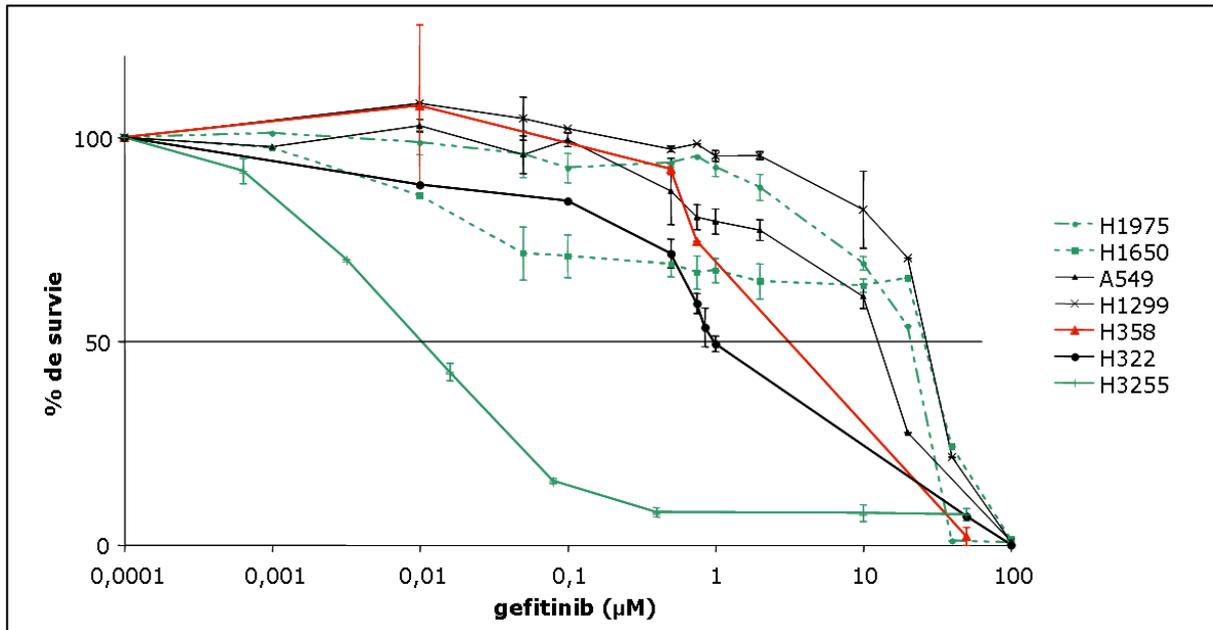
18. Asahina, H, Yamazaki, K, Kinoshita, I, Sukoh, N, Harada, M, Yokouchi, H *et al.* (2006). A phase II trial of gefitinib as first-line therapy for advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutations. *Br J Cancer* **95**: 998–1004.
19. Engelman, JA, Jänne, PA, Mermel, C, Pearlberg, J, Mukohara, T, Fleet, C *et al.* (2005). ErbB-3 mediates phosphoinositide 3-kinase activity in gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 3788–3793.
20. Sordella, R, Bell, DW, Haber, DA and Settleman, J (2004). Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* **305**: 1163–1167.
21. Tracy, S, Mukohara, T, Hansen, M, Meyerson, M, Johnson, BE and Jänne, PA (2004). Gefitinib induces apoptosis in the EGFR L858R non-small-cell lung cancer cell line H3255. *Cancer Res* **64**: 7241–7244.
22. Kakiuchi, S, Daigo, Y, Ishikawa, N, Furukawa, C, Tsunoda, T, Yano, S *et al.* (2004). Prediction of sensitivity of advanced non-small cell lung cancers to gefitinib (Iressa, ZD1839). *Hum Mol Genet* **13**: 3029–3043.
23. Miyashita, T, Krajewski, S, Krajewska, M, Wang, HG, Lin, HK, Liebermann, DA *et al.* (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* **9**: 1799–1805.
24. Morgillo, F, Woo, JK, Kim, ES, Hong, WK and Lee, HY (2006). Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib. *Cancer Res* **66**: 10100–10111.
25. Cohen, HY, Lavu, S, Bitterman, KJ, Hekking, B, Imahiyerobo, TA, Miller, C *et al.* (2004). Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell* **13**: 627–638.
26. Mazumder, S, Plesca, D, Kinter, M and Almasan, A (2007). Interaction of a cyclin E fragment with Ku70 regulates Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* **27**: 3511–3520.
27. Busser, B, Sancey, L, Josserand, V, Niang, C, Khochbim, S, Favrot, MC *et al.* Amphiregulin promotes resistance to gefitinib in nonsmall cell lung cancer cells by regulating Ku70 acetylation. *Mol Ther*, this issue.
28. Wang, X, Masri, S, Phung, S and Chen, S (2008). The role of amphiregulin in exemestane-resistant breast cancer cells: evidence of an autocrine loop. *Cancer Res* **68**: 2259–2265.
29. Eckstein, N, Servan, K, Girard, L, Cai, D, von Jonquieres, G, Jaehde, U *et al.* (2008). Epidermal growth factor receptor pathway analysis identifies amphiregulin as a key factor for cisplatin resistance of human breast cancer cells. *J Biol Chem* **283**: 739–750.
30. Sanguino, A, Lopez-Berestein, G and Sood, AK (2008). Strategies for *in vivo* siRNA delivery in cancer. *Mini Rev Med Chem* **8**: 248–255.
31. Bonnet, ME, Erbacher, P and Bolcato-Bellemin, AL (2008). Systemic delivery of DNA or siRNA mediated by linear polyethylenimine (L-PEI) does not induce an inflammatory response. *Pharm Res* **25**: 2972–2982.
32. Kargiotis, O, Chetty, C, Gondi, CS, Tsung, AJ, Dinh, DH, Gujrati, M *et al.* (2008). Adenovirus-mediated transfer of siRNA against MMP-2 mRNA results in impaired invasion and tumor-induced angiogenesis, induces apoptosis *in vitro* and inhibits tumor growth *in vivo* in glioblastoma. *Oncogene* **27**: 4830–4840.
33. Yoo, JY, Kim, JH, Kim, J, Huang, JH, Zhang, SN, Kang, YA *et al.* (2008). Short hairpin RNA-expressing oncolytic adenovirus-mediated inhibition of IL-8: effects on antiangiogenesis and tumor growth inhibition. *Gene Ther* **15**: 635–651.
34. Yotsumoto, F, Yagi, H, Suzuki, SO, Oki, E, Tsujioka, H, Hachisuga, T *et al.* (2008). Validation of HB-EGF and amphiregulin as targets for human cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun* **365**: 555–561.
35. Carmichael, J, DeGraff, WG, Gazdar, AF, Minna, JD and Mitchell, JB (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* **47**: 936–942.
36. Kjønnesen, I, Storeng, R, Pihl, A, McLemore, TL and Fodstad, O (1989). A human tumor lung metastasis model in athymic nude rats. *Cancer Res* **49**: 5148–5152.

Supplementary material and methods S1



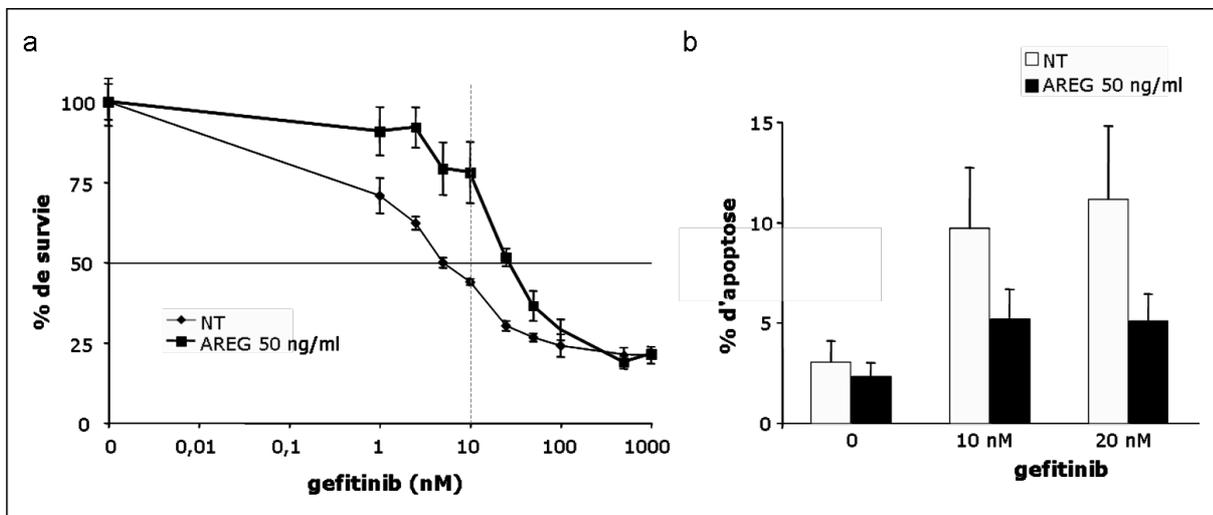
**Figure S1. Co-immunoprecipitation of EGFR and IGF1R.**

Whole-cell extracts from H358 and H322 cells treated with 0.5  $\mu$ M gefitinib for 96 h were immunoprecipitated (IP) with EGFR antibody (Santa Cruz) and subjected to immunoblot analysis with IGF1R (Santa Cruz) or EGFR antibodies. IgG: immunoglobulin control for immunoprecipitation, used as negative control. Input: cell lysates that are not subjected to immunoprecipitation.



**Figure 22. Effet du gefitinib sur 7 lignées de CBNPC**

Un test au MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) a permis d'évaluer l'effet du gefitinib aux concentrations indiquées pendant 96 h sur la prolifération cellulaire de différentes lignées de CBNPC.



**Figure 23. Effet du gefitinib sur la lignée H3255**

(a) Viabilité des cellules de CBNPC H3255 mesurée par un test MTT, en présence de gefitinib aux concentrations indiquées pendant 72 h, en présence ou non de 50 ng/ml d'AREG recombinante. (b) Effet de l'AREG sur l'apoptose induite par le gefitinib dans les cellules H3255. Les cellules H3255 ont été traitées par 50 ng/ml d'AREG recombinante et/ou du gefitinib aux concentrations indiquées pendant 72 heures. L'apoptose est évaluée après marquage nucléaire au Hoechst 33342 et comptage d'au moins 500 cellules au microscope à fluorescence.

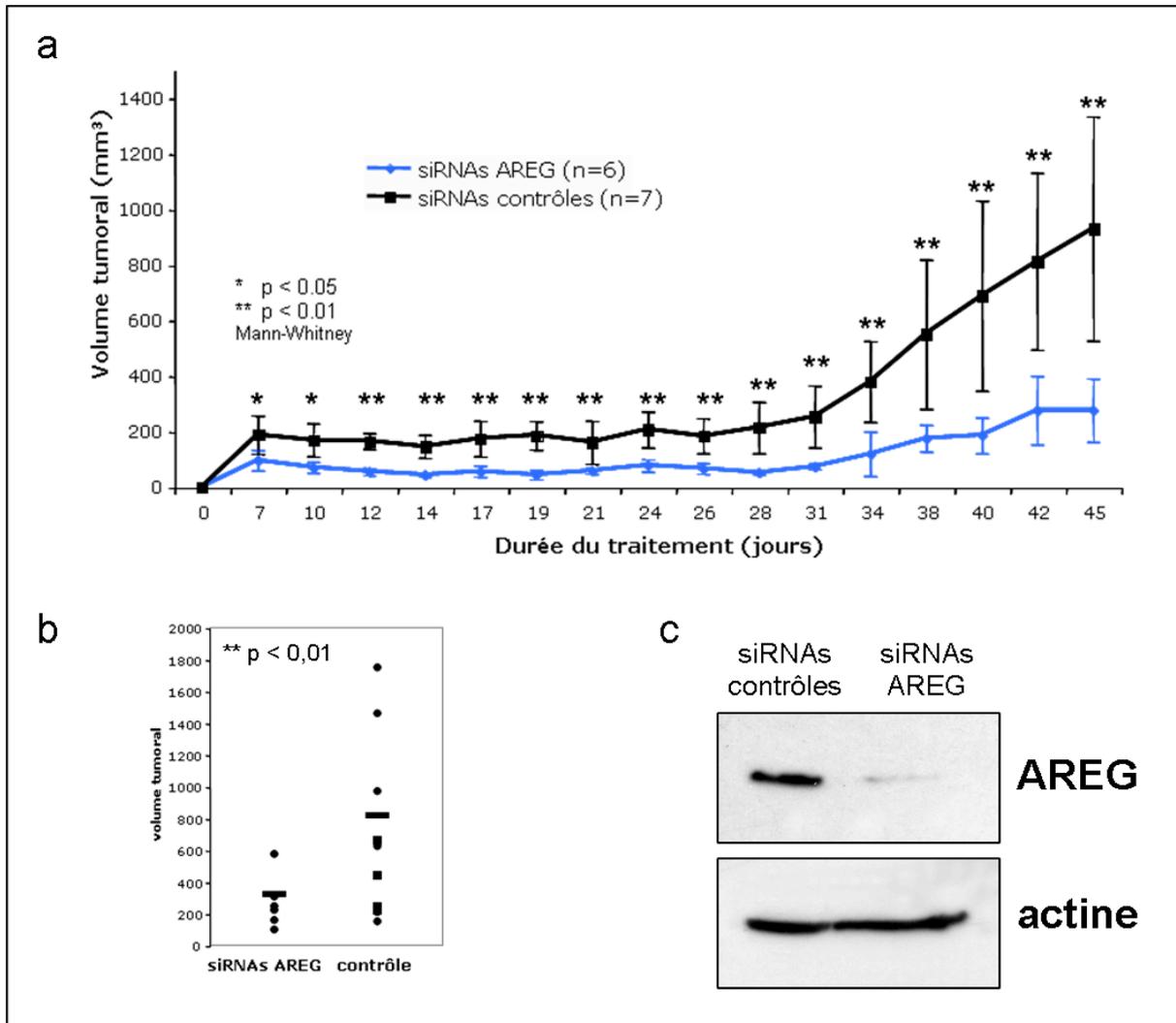
### **1.3 Résultats complémentaires**

#### ***a) Le gefitinib possède une toxicité variable sur différentes lignées de CBNPC.***

La toxicité du gefitinib a été testée sur 7 lignées de CBNPC, en présence de gefitinib par un test de viabilité cellulaire MTT (**Figure 22**). Cette toxicité est évaluée par la mesure de l'IC<sub>50</sub> (half-maximal inhibitory concentration) du gefitinib pour chaque lignée. Cette IC<sub>50</sub> correspond à la concentration de gefitinib qui inhibe de 50% la survie cellulaire. La lignée H3255 qui possède la mutation activatrice L858R de l'EGFR est hypersensible au gefitinib, avec une IC<sub>50</sub> de 10 nM. La lignée H322 possède une IC<sub>50</sub> de 1 µM et la lignée H358 une IC<sub>50</sub> d'environ 4 µM. La lignée A549 a un gène K-RAS muté et activé possède une IC<sub>50</sub> de 14 µM. La lignée H1975 possède une mutation activatrice de l'EGFR L858R doublée d'une mutation secondaire de résistance T790M, expliquant la résistance de cette lignée au gefitinib avec une IC<sub>50</sub> de 20 µM. La lignée H1299 a une IC<sub>50</sub> de 25 µM. La lignée H1650, qui possède également une IC<sub>50</sub> de 25 µM malgré une mutation activatrice de l'EGFR de type del-19. Ces données sont en accord avec la littérature (Sharma, *et al.*, 2007).

#### ***b) L'AREG protège les cellules H3255 du gefitinib.***

Les cellules H3255 ont une IC<sub>50</sub> autour de 10 nM de gefitinib. En conséquence, seuls 45% des cellules H3255 survivent à 10 nM de gefitinib, alors que la présence de 50 ng/ml d'AREG recombinante permet la survie de près de 80% des cellules à cette même concentration de gefitinib (**Figure 23a**). De même, 50 ng/ml d'AREG inhibent l'apoptose induite par des concentrations de 10 ou 20 nM de gefitinib (**Figure 23b**), suggérant que l'AREG protège les cellules H3255 de l'apoptose induite par le gefitinib. L'AREG protège donc les cellules H3255 de la toxicité induite par le gefitinib (**Figure 23**). Ces données montrent que l'effet protecteur de l'AREG est indépendant des mutations de l'EGFR.



**Figure 24. Effet des SiRNAs anti-AREG *in vivo***

(a) Effet d'un traitement par SiRNAs anti-AREG sur la croissance de tumeurs H358 implantées en sous-cutané chez la souris Nude. Les souris ont été réparties aléatoirement dans le groupe contrôle (SiRNAs contrôles, n = 7) ou dans le groupe traité (SiRNAs anti-AREG, n = 6). Les SiRNAs sont administrés complexés au JetPEI<sup>®</sup> par voie intrapéritonéale ou sous-cutané en alternance, 16 µg/j/souris, 4 jours par semaine. Le volume tumoral est mesuré 3 fois par semaine avec un pied à coulisse. Les points représentent le volume tumoral moyen, et les barres représentent les écarts-types. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$  pour comparer les volumes tumoraux entre groupe contrôle et groupe traité. (b) Chaque point représente le volume tumoral d'une souris du groupe traité ou du groupe contrôle, au dernier jour de traitement, avant sacrifice expérimental. La barre représente le volume moyen du groupe. \*\*,  $p < 0.01$  pour comparer les volumes tumoraux entre groupe contrôle et groupe traité (c) Evaluation par western blot de l'expression d'AREG dans des extraits protéiques totaux issus de la lyse des tumeurs obtenues par résection tumorale post-sacrifice. L'actine est utilisée comme témoin de charge.

**c) Les SiRNAs anti-AREG ont une activité anti-tumorale *in vivo***

Nous avons testé l'effet des SiRNAs anti-AREG sur la croissance de tumeurs H358 établies chez la souris Nude (**Figure 24**). Le volume tumoral de souris contrôles traitées avec des SiRNAs non spécifiques est statistiquement supérieur à celui des souris du groupe traité par SiRNAs anti-AREG, dès la première semaine de traitement (**Figure 24a**). A la fin de l'étude, le volume tumoral moyen dans le groupe traité est significativement diminué de 60% par rapport au volume tumoral moyen du groupe contrôle (**Figure 24b**). L'analyse par western blot des protéines totales extraites des tumeurs H358 à la fin de l'expérimentation montre que le niveau d'AREG est fortement diminué par les SiRNAs anti-AREG (**Figure 24c**). Ces données montrent que les SiRNAs anti-AREG diminuent la croissance des tumeurs H358 *in vivo* et suggèrent que l'AREG pourrait être une cible thérapeutique dans le CBNPC.

## 1.4 Conclusion

Nous montrons que l'AREG empêche l'apoptose induite par le gefitinib *via* l'inactivation de Bax. Nos résultats montrent que les SiRNAs anti-AREG contrecarrent la résistance au gefitinib et induisent l'apoptose des cellules H358 *in vitro* et *in vivo*. L'AREG pourrait ainsi être un biomarqueur prédictif d'une non-réponse au gefitinib et être utilisée pour identifier les patients pouvant bénéficier d'un traitement par les EGFR-TKI. L'AREG pourrait aussi constituer une cible thérapeutique pour lutter contre la prolifération d'une tumeur qui la surexprime. Ce travail possède donc des perspectives prometteuses de transfert vers la clinique, dans les domaines diagnostique et thérapeutique.

## **II L'Amphiréguline induit la résistance du CBNPC au gefitinib en régulant l'acétylation de Ku70.**

### **2.1 Présentation de l'étude**

Nous venons de voir que l'AREG inhibe l'apoptose induite par le gefitinib dans les cellules de CBNPC en inactivant la protéine proapoptotique Bax, mais le mécanisme de cette inactivation est inconnu.

Bax est capable de déclencher l'apoptose après son activation, et sa translocation à la mitochondrie. Il a récemment été montré que la protéine Ku70 peut inhiber l'apoptose en séquestrant Bax dans le cytoplasme, empêchant ainsi sa translocation vers la mitochondrie (Cohen, *et al.*, 2004a). L'interaction entre Bax et Ku70 est conditionnée par l'état d'acétylation de Ku70. En effet, l'acétylation des lysines de la partie carboxy-terminale de Ku70 provoque la libération de Bax, lui permettant de migrer à la mitochondrie pour induire l'apoptose (Subramanian, *et al.*, 2005a).

Ku70 est une protéine bien connue pour son action cruciale dans la réparation des cassures double brins de l'ADN, *via* son hétérodimérisation avec Ku80 (Gullo, *et al.*, 2006). A côté de cette activité importante, Ku70 est également impliqué dans de nombreux autres processus cellulaires, comme la maintenance télomérique, les réarrangements VDJ des gènes des récepteurs des antigènes, la régulation de la transcription de gènes spécifiques, la régulation des phases G2 et M du cycle cellulaire et la régulation de l'apoptose (Gullo, *et al.*, 2006) pour revue). Le rôle de Ku70 en cancérologie demeure ambigu puisqu'on lui attribue tantôt une activité suppressive de tumeurs (Li, *et al.*, 1998) tantôt une activité oncogénique qu'il soit sur- ou sous-exprimé (Gullo, *et al.*, 2006). Cependant, des données récentes suggèrent une corrélation positive entre Ku70 et le développement de cancers, faisant de cette protéine une importante cible pour le développement des thérapies anticancéreuses.

Nous avons émis l'hypothèse de l'implication de Ku70 dans l'activité du gefitinib régulée par l'AREG.

L'invalidation de l'expression de Ku70 par ARN interférence (SiRNAs anti-Ku70) rétablit la sensibilité des cellules H358 au gefitinib, ainsi que l'activation de Bax. Ces résultats confirment le rôle majeur de Ku70 dans la résistance au gefitinib.

Nos données montrent une augmentation de l'interaction de Bax avec Ku70 détectée par immunoprécipitation dans les cellules H358 et H322 sous l'effet du gefitinib, uniquement en présence d'AREG. L'acétylation de Ku70 induite par le gefitinib augmente en présence des SiRNAs anti-AREG, suggérant que l'AREG inhibe l'acétylation de Ku70 induite par le gefitinib, favorisant son interaction avec Bax et donc l'inhibition subséquente de l'apoptose. L'utilisation d'inhibiteurs d'histone déacétylases (HDACi) comme la TSA, le vorinostat et le nicotinamide, ainsi que la surexpression d'histone acétyltransférases (HAT) comme CBP sensibilise fortement les cellules H358 au gefitinib en augmentant le niveau d'acétylation de Ku70, provoquant la libération de Bax.

Nos données suggèrent que les HDACi peuvent contrecarrer l'effet de l'AREG et sensibiliser les cellules au gefitinib. Afin de déterminer si les HDACi peuvent également augmenter l'activité antitumorale du gefitinib *in vivo*, nous avons analysé l'effet du gefitinib, du vorinostat, ou de l'association des deux molécules sur la croissance de tumeurs H358 greffées chez la souris Nude. Nous montrons que l'association gefitinib et vorinostat inhibe considérablement la croissance tumorale *in vivo*, suggérant d'évaluer l'association de ces deux traitements en thérapie anticancéreuse humaine, et notamment chez les patients porteurs de CBNPC résistants aux EGFR-TKI.

## 2.2 Article 2

Busser B., Sancey L., Josserand V., Niang C., Khochbin S., Favrot M., Coll JL., et Hurbin A. Amphiregulin promotes resistance to gefitinib in Non-Small Cell Lung Cancer cells by regulating Ku70 acetylation. **Molecular Therapy**, 2009. Epub ahead of print.

# Amphiregulin Promotes Resistance to Gefitinib in NonSmall Cell Lung Cancer Cells by Regulating Ku70 Acetylation

Benoît Busser<sup>1-3</sup>, Lucie Sancey<sup>1,2</sup>, Véronique Josserand<sup>1,2</sup>, Carole Niang<sup>1,2</sup>, Saadi Khochbin<sup>1,2</sup>, Marie C Favrot<sup>1-3</sup>, Jean-Luc Coll<sup>1,2</sup> and Amandine Hurbin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U823, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France; <sup>2</sup>Université Joseph Fourier, Grenoble, France; <sup>3</sup>CHRU Grenoble, Hôpital Michallon, UF Cancérologie Biologique et Biothérapie, Grenoble, France

Multiple molecular resistance mechanisms reduce the efficiency of receptor tyrosine kinase inhibitors such as gefitinib in non-small cell lung cancer (NSCLC). We previously demonstrated that amphiregulin (Areg) inhibits gefitinib-induced apoptosis in NSCLC cells by inactivating the proapoptotic protein BAX. In this part of the investigation, we studied the molecular mechanisms leading to BAX inactivation. We show that Areg prevents gefitinib-mediated acetylation of Ku70. This augments the BAX-Ku70 interaction and therefore prevents BAX-mediated apoptosis. Accordingly, Areg or Ku70 knock down restore BAX activation and apoptosis in gefitinib-treated H358 cells *in vitro*. In addition, overexpression of the histone acetyltransferase (HAT) CREB-binding protein (CBP) or treatments with histone deacetylase (HDAC) inhibitors sensitize H358 cells to gefitinib. Moreover, a treatment with vorinostat, a HDAC inhibitor strongly sensitized tumors to gefitinib *in vivo*. These findings suggest new prospects in combining both HDAC and epidermal growth factor receptor inhibitors for the treatment of NSCLC.

Received 20 March 2009; accepted 9 September 2009; advance online publication 13 October 2009. doi:10.1038/mt.2009.227

## INTRODUCTION

Epidermal growth factor receptor (EGFR) is frequently overexpressed in non-small cell lung cancers (NSCLC) and correlates with a poor clinical outcome.<sup>1,2</sup> Inhibitors of the tyrosine kinase activity of EGFR (the EGFR-TKI family) were therefore developed. Small molecules that block the adenosine triphosphate binding site of the cytoplasmic domain of EGFR, such as gefitinib or erlotinib, showed potent antitumor activity against previously treated NSCLC.<sup>3,4</sup> However, the limited response rates of patients to EGFR-TKI<sup>5</sup> led to investigating the mechanisms leading to resistance to EGFR-TKI treatments.

The level of expression of the EGFR ligand amphiregulin (Areg) was correlated with a poor response to gefitinib.<sup>6</sup> Areg is associated with shortened survival of patients with NSCLC

and poor prognosis.<sup>7</sup> Our group previously reported that Areg inactivates the proapoptotic protein BAX<sup>8</sup> and inhibits gefitinib-induced apoptosis in NSCLC.<sup>9</sup> However, the molecular mechanisms governing Areg- and gefitinib-mediated BAX inactivation in NSCLC cells are still unknown.

Following its activation, BAX translocates from the cytosol to the outer mitochondrial membrane where it oligomerizes, rendering the membrane permeable, and allowing the release of several mitochondrial death-promoting factors.<sup>10</sup> The Ku70 DNA end-joining protein has recently been shown to suppress apoptosis by sequestering BAX from the mitochondria.<sup>11,12</sup> In contrast, when Ku70 is acetylated, it releases BAX, allowing it to translocate to the mitochondria and trigger cytochrome c release, leading to caspase-dependent death. Ku70 was first characterized as part of the Ku70/Ku80 heterodimer that is essential for the repair of DNA double-strand breaks by nonhomologous end joining and the rearrangement of antibody and T cell receptor genes via V(D)J recombination,<sup>13</sup> telomere maintenance and transcriptional regulation.<sup>14</sup> Ku70 activity could be determined by its acetylation status, like other nonhistone proteins such as p53 and Hsp90.<sup>15</sup> The acetylation level is regulated by both histone acetyltransferase (HAT) and histone deacetylase (HDAC) activities. Recent reports suggest that there is a positive relationship between Ku70 and the development of cancer, presenting Ku70 as an important target for anticancer drug development.<sup>12</sup>

In this study, we investigated the role of Ku70 in the Areg-regulated activity of gefitinib. We show that Areg inhibits apoptosis normally induced by gefitinib by an acetylation-dependent pathway leading to BAX inactivation. Areg reduces the acetylation of the protein Ku70 and thus enhances BAX inactivation. Consequently, enhancing acetylation abolishes the protective effect of Areg and renders NSCLC cells more sensitive to gefitinib treatment *in vitro* and *in vivo*.

## RESULTS

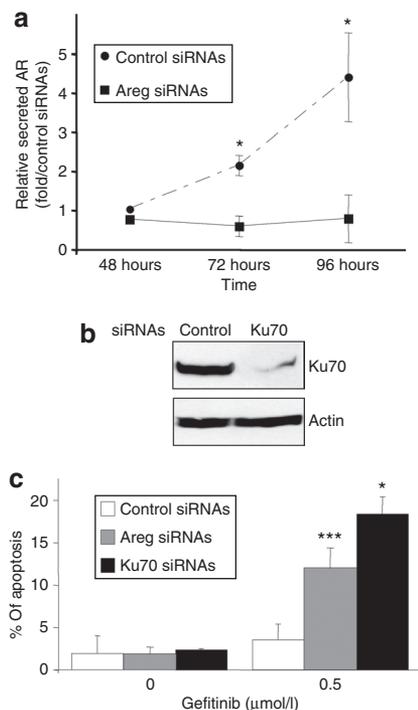
### Areg and Ku70 inhibit gefitinib-induced apoptosis in H358 NSCLC cells

H358 NSCLC cells overexpress Areg.<sup>16</sup> Transfection of H358 cells with anti-Areg small-interfering RNAs (Areg siRNAs) strongly

reduced the secreted levels of Areg, as compared to control siRNAs, 3 and 4 days after transfection (Figure 1a). In addition, as shown in Figure 1b, Ku70 siRNA transfection considerably silenced the endogenous Ku70 in H358 cells. Interestingly, although anti-Areg or anti-Ku70 siRNA transfection did not induce apoptosis, it significantly sensitized H358 cells to 0.5  $\mu\text{mol/l}$  gefitinib (Figure 1c), suggesting that both Areg and Ku70 can reduce gefitinib efficiency. In addition, we verified that the Ku70 expression level was not modified by gefitinib and/or Areg treatments in the H358 cell line (data not shown). This indicated that Ku70 protein levels did not fluctuate with the Areg/ gefitinib cross-talk.

### Areg and Ku70 inhibit BAX conformational change

We then investigated the relationship between gefitinib activity, Areg, Ku70, and BAX activation in H358 cells. We analyzed BAX activation by flow cytometry using an antibody that recognizes the exposed N-terminus extremity of activated BAX but not the protein in its inactive conformation.<sup>17</sup> The intensity of BAX immunostaining (Figure 2a, upper panel) as well as the percentage of positively stained cells (Figure 2b) were not modified by the gefitinib treatment, showing that BAX is not activated in these conditions. In addition, Areg or Ku70 knock down had a limited influence on BAX activation, because the exposure of its N-terminus moiety was not modified. In sharp contrast,

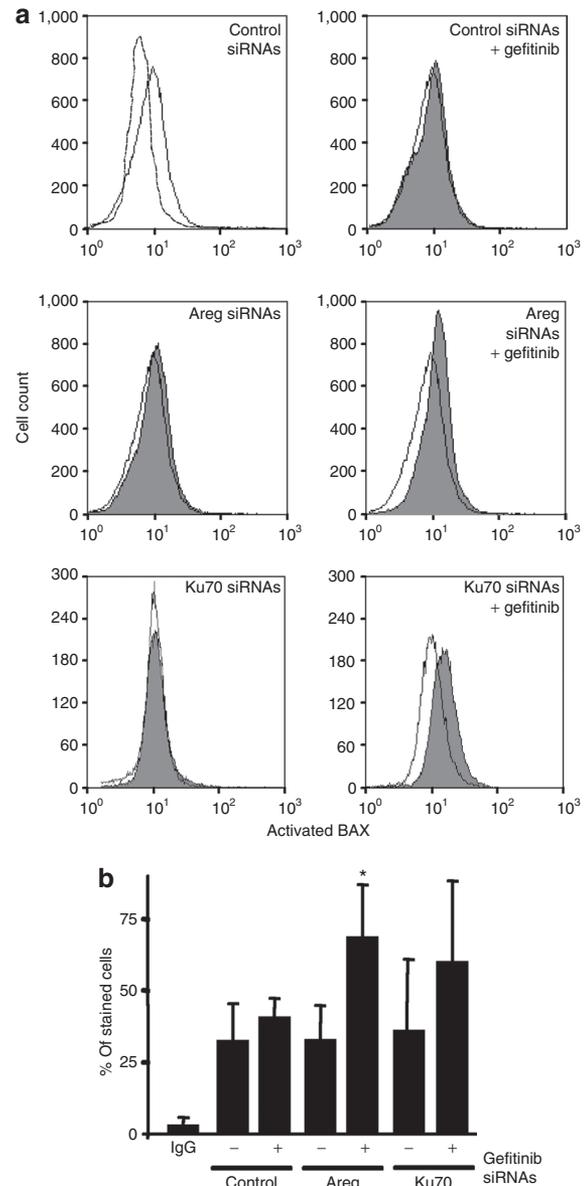


**Figure 1** Areg and Ku70 inhibit gefitinib-induced apoptosis. H358 cells were transfected with control or amphiregulin (Areg) or Ku70 small-interfering RNAs (siRNAs) and treated with 0.5  $\mu\text{mol/l}$  gefitinib. (a) The efficiency of Areg knock down was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay. Results are expressed as a rate of Areg released 48–96 hours after control siRNAs transfection and as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). (b) The efficiency of Ku70 knock down was assessed after 96 hours by western blotting using Ku70 antibody. (c) Apoptosis was scored after counting Hoechst stained cells. Results are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ). \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , for comparison between treated and control cells.

cotreatment of the cells by Areg siRNAs (Figure 2a middle panel and Figure 2b) or Ku70 siRNAs (Figure 2a lower panel and Figure 2b) and gefitinib was associated with an activation of BAX. These data suggested that both Areg and Ku70 prevent BAX conformational activation, therefore inhibiting gefitinib activity.

### Areg increases BAX/Ku70 interaction

To further demonstrate the role of Ku70 on Areg-dependent BAX inactivation, we measured the interaction between BAX and Ku70 using coimmunoprecipitation assays. We observed a low basal interaction between BAX and Ku70 in control H358



**Figure 2** Areg and Ku70 inactivate BAX in H358 cells. H358 cells were transfected with control or amphiregulin (Areg) or Ku70 small-interfering RNAs and/or treated with 0.5  $\mu\text{mol/l}$  gefitinib. (a) Flow cytometry analysis of BAX immunostaining using activated-BAX antibody. Dotted histogram, irrelevant antibody; open histogram, control cells; filled histogram, treated cells as indicated. (b) Percentages of activated-BAX stained cells were expressed as mean  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ). \* $P < 0.05$ , more significant than control.

cells (Figure 3a), which was enhanced under gefitinib treatment but only in the presence of Areg. Areg knock down significantly prevented this increase. This suggests that the Areg survival factor could limit gefitinib toxicity by increasing BAX/Ku70 aggregate formation.

This hypothesis is sustained by our results with another NSCLC cell line H322, which does not secrete Areg.<sup>16</sup> We showed that in H322, BAX/Ku70 interaction was not enhanced in the presence of gefitinib (Figure 3c). Adjunction of recombinant Areg in the culture medium slightly, but reproducibly, increased the sequestration of BAX by Ku70.

### Areg inhibits the acetylation of Ku70

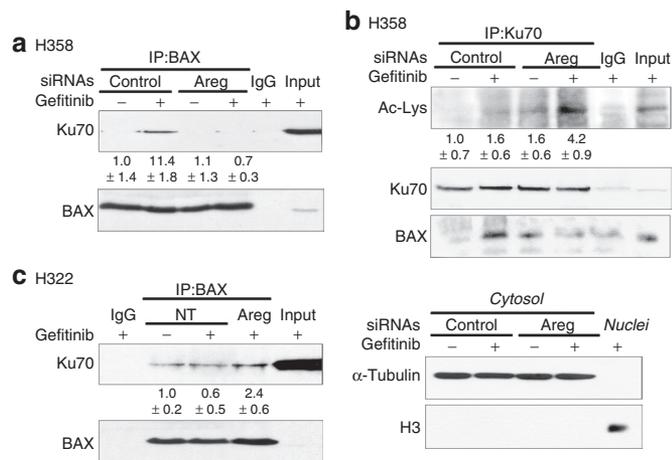
The interaction between BAX and Ku70 is regulated by acetylation. To further assess the effect of Areg on the state of Ku70 acetylation, we immunoprecipitated cytoplasmic Ku70 in H358 cells. After a treatment with gefitinib, the acetylation level of cytoplasmic Ku70 was below detection levels in our control conditions (Figure 3b, upper panel). However and as previously observed in Figure 3a, the gefitinib treatment enhanced the interaction between BAX and Ku70. This was demonstrated after reprobating the same blot with the anti-BAX antibody (bottom panel). In contrast, acetylation of Ku70 was markedly increased and detectable when H358 cells were treated with gefitinib and anti-

Areg siRNAs (upper panel). As expected, this hyperacetylation of Ku70 prevented BAX-Ku70 interaction, because we observed no detectable signal after BAX immunostaining (bottom panel). These results provide strong evidence that Areg inhibits the gefitinib-mediated acetylation of Ku70 and therefore enhances the sequestration of BAX by Ku70.

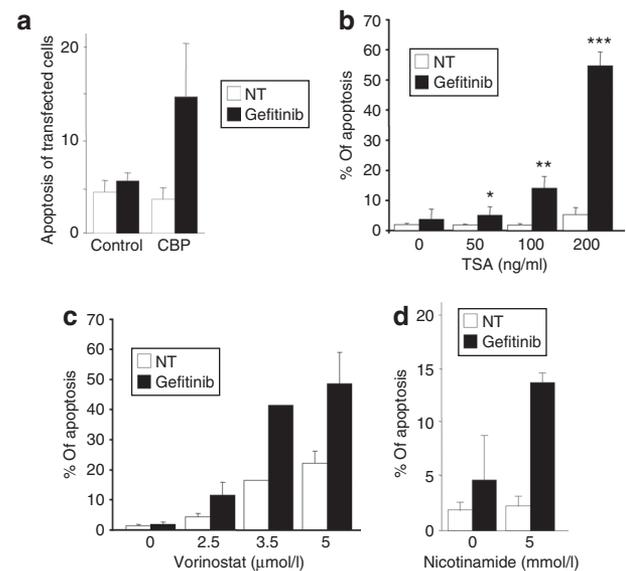
### Ku70 acetylation increases the sensitivity of NSCLC cells to gefitinib

*In vivo* acetylation of proteins results from a subtle equilibrium between the opposite activities of acetyltransferases and deacetylases. Ku70 is known to be acetylated by HAT such as CREB-binding protein (CBP), p300 and p300/CBP-associated factor, whereas it can be deacetylated by both classes I/II HDAC and class III/sirtuin deacetylases.<sup>11</sup> To assess the involvement of acetylation, we first examined gefitinib-induced apoptosis in H358 cells overexpressing CBP. Overexpression of CBP had no significant effect per se, but sharply increased the amount of apoptosis in gefitinib-treated H358 cells as compared to control-transfected cells (Figure 4a).

H358 cells were then treated with several HDAC inhibitors. Although concentrations of up to 200 ng/ml trichostatin A (TSA, classes I/II HDAC inhibitor) alone did not significantly induce apoptosis, its combination with gefitinib showed a very significant and dose-dependent induction of apoptosis (Figure 4b). Gefitinib, in the presence of 200 ng/ml TSA, was ten times more toxic than when used alone. Similarly, suberoylanilide hydroxamic acid (vorinostat, classes I/II HDAC inhibitor,



**Figure 3** Areg enhances BAX-Ku70 interaction and inhibits Ku70 acetylation. (a,b) H358 cells were transfected with control or amphiregulin (Areg) small-interfering RNAs and 0.5 μmol/l gefitinib was applied as indicated for 96 hours. (c) H322 cells were treated or not with 50 ng/ml Areg and 0.5 μmol/l gefitinib for 96 hours as indicated. (a,c) Endogenous BAX immunoprecipitation (IP) was performed from whole-cell extracts and subjected to immunoblotting with Ku70 and BAX antibodies. The values denote the relative intensity of Ku70 protein bands of treated samples to that of control cells, after being normalized to the respective BAX and represent the average ± SD of independent experiments (H358 *n* = 3; H322 *n* = 2). (b) Endogenous Ku70 IP was performed from cytosolic extracts and subjected to immunoblotting with antiacetylated proteins and BAX antibodies. The immunoblot was reprobated with Ku70 antibody to confirm the presence of an overlapping Ku70 band. The values denote the relative intensity of acetylated Ku70 bands of treated samples to that of control cells, after being normalized to the respective Ku70 and represent the average ± SD of three independent experiments. Cytosolic α-tubulin and nuclear histone H3 were used to show that cytoplasmic extracts were nuclear-free. IgG: irrelevant immunoglobulins, used as negative control. Inputs: cell lysates not subjected to immunoprecipitation, NT, non treated.



**Figure 4** Enhanced Ku70 acetylation sensitizes H358 cells to gefitinib. (a) H358 cells were transfected with a plasmid control encoding green fluorescent protein (GFP) or with a plasmid encoding CREB-binding protein-hemagglutinin (CBP-HA) and treated or not with 0.5 μmol/l gefitinib as indicated. The expression of GFP or CBP-HA was revealed by immunofluorescence 96 hours after transfection and apoptosis of transfected cells was analyzed after counting Hoechst-stained cells. (b-d) H358 cells were treated or not with (b) TSA, (c) vorinostat, (d) nicotinamide, and/or 0.5 μmol/l gefitinib. Apoptosis was scored after counting Hoechst-stained cells. Results are expressed as mean ± SD (*n* ≥ 3). \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, more significant than control, NT, untreated.

**Figure 4c**) or nicotinamide (class III/sirtuin deacetylases inhibitor, **Figure 4d**) increased gefitinib-induced apoptosis. There was no significant effect of vorinostat or nicotinamide alone. These results suggest that an increased acetylation by HAT overexpression or HDAC inhibition sensitizes the cells to gefitinib.

### TSA increases the gefitinib-mediated acetylation of Ku70

We then investigated whether increasing acetylation affected the gefitinib-mediated BAX-Ku70 interaction. The effect of TSA on cytoplasmic Ku70 was studied. TSA increased the acetylation of cytoplasmic Ku70 in gefitinib-treated cells (**Figure 5a**, upper panel). As expected, this increased acetylation of Ku70 was associated with a reduction of the BAX-Ku70 interaction (**Figure 5a**, middle panel). These results suggested that TSA sensitizes the cells to gefitinib's effect by enhancing Ku70 acetylation, leading to the subsequent release of BAX.

To consolidate this result, we constructed a K539R/K542R Ku70 mutant. Both lysines are known targets for acetylation, and govern BAX binding to Ku70. Their substitution by arginine amino acids prevents Ku70 acetylation.<sup>11,18,19</sup> A control (empty plasmid), or plasmids encoding for wild-type or Ku70 mutant

proteins, were cotransfected in H358 cells and the level of apoptosis in the transfected cells was measured. As expected, 0.5  $\mu\text{mol/l}$  gefitinib or 200 ng/ml TSA alone did not induce significant apoptosis in any of the transfected cells (**Figure 5b**). The combined gefitinib and TSA treatments induced 50% apoptosis in control- or Ku70 wild-type-transfected cells, whereas only 30% of the cells transfected with the mutant form of Ku70 were apoptotic ( $P < 0.05$ ) (**Figure 5b**). This experiment demonstrated that both lysines 539 and 542, necessary to the BAX-Ku70 interaction and Ku70 acetylation,<sup>18</sup> are crucial for apoptosis induced by gefitinib and TSA cotreatment.

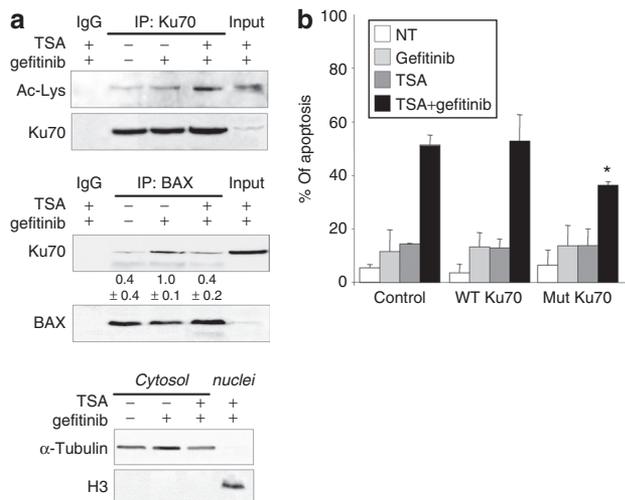
### Antitumor efficacy of dual targeting HDAC and EGFR *in vivo*

Results presented in **Figures 4** and **5** suggest that HDAC inhibitors counteract the protective effect of Areg and sensitize cells to gefitinib. To determine whether HDAC inhibitors are able to enhance the antitumor activity of gefitinib *in vivo*, we tested the effects of gefitinib, vorinostat, and their combination on the growth of H358 NSCLC xenograft tumors established in nude mice. Mice treated with a low concentration of gefitinib or vorinostat alone did not show reduced tumor growth as compared to control mice (**Figure 6a**). Mice treated with gefitinib and vorinostat combination treatment showed a strong inhibition of tumor growth as compared to control mice or to mice treated with gefitinib or vorinostat alone (**Table 1**). At the end of the study, the mean tumor volume in the combined-treatment group was 36% ( $P < 0.01$ ) of the mean volume in the control group. No major modification on the level of acetylation under vorinostat treatment was observed using an antiacetylated histone H3K9 antibody or an antiacetylated proteins antibody on total proteins extracts and western blot analysis (data not shown) or after immunolabeling of tumor sections at the end of this experiment (**Figure 6b**, upper panel). In tumors from control mice or from mice treated with vorinostat or gefitinib alone, >40% of tumor cells are actively proliferating and thus expressed elevated levels of the Ki67 nuclear protein, whereas only 16% of the cells were cycling in the combined-treatment group ( $P = 0.0039$ , **Figure 6b**, lower panel and histogram). Gefitinib, vorinostat or the combination of both treatments were associated with increased levels of cleaved-caspase-3 in the tumors (**Figure 6c**). These findings suggest that the combined treatment enhanced the antitumor activity of each drug *in vivo* by reducing the proliferation of tumor cells. The combination of both molecules does not increase the level of apoptosis observed with each treatment separately. Taken together, these results indicate that the antitumor activity of gefitinib is enhanced when vorinostat is also present.

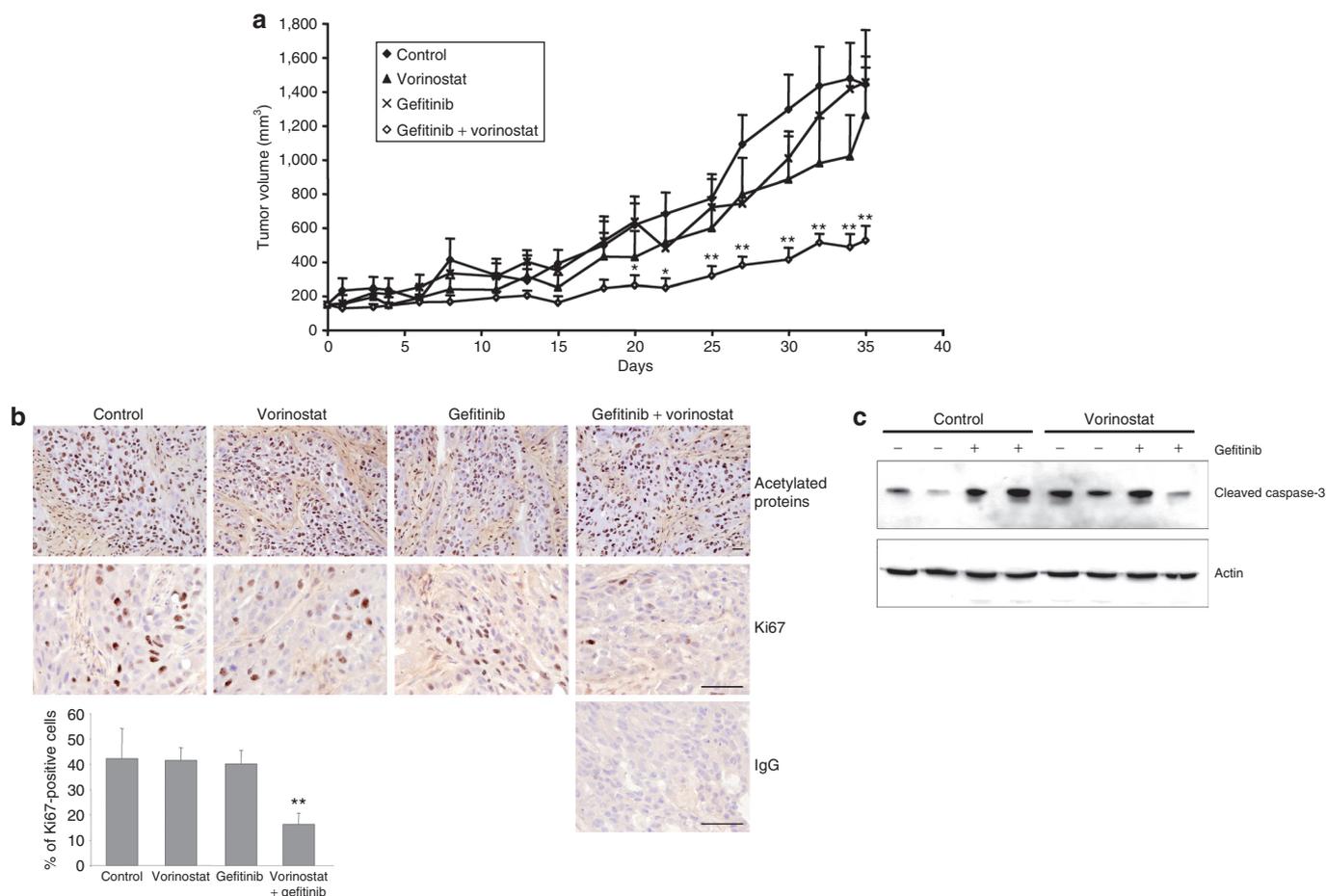
### DISCUSSION

In the presence of Areg, NSCLC cells resist apoptosis induced by EGFR-TKI treatment such as gefitinib through BAX inactivation.<sup>9</sup> In this study, we demonstrate that this effect is due to an acetylation-dependent mechanism leading to BAX sequestration by Ku70. We suggest a therapeutic approach to restore the EGFR-TKI sensitivity *in vitro* and *in vivo*.

We previously established that Areg inhibits BAX conformational activation and thus its translocation from the cytosol to the mitochondria in NSCLC cells.<sup>8</sup> Several groups have shown



**Figure 5** TSA-induced Ku70 acetylation regulates gefitinib-mediated apoptosis. **(a)** H358 cells were treated with 0.5  $\mu\text{mol/l}$  gefitinib and/or 200 ng/ml trichostatin A (TSA). Endogenous Ku70 immunoprecipitation (upper panel) was performed from cytosolic extracts and subjected to immunoblotting with antiacetylated proteins antibody. The immunoblot was reprobed with Ku70 antibody to confirm the presence of an overlapping Ku70 band. Endogenous BAX immunoprecipitation (middle panel) was performed from whole-cell extracts and subjected to immunoblotting with Ku70 and BAX antibodies. The values denote the relative intensity of Ku70 protein bands of treated samples to that of control cells, after being normalized to the respective BAX and represent the average  $\pm$  SD of three independent experiments. Cytosolic  $\alpha$ -tubulin and nuclear histone H3 were used to show that cytoplasmic extracts were nuclear-free (lower panel). IgG: irrelevant immunoglobulins. Inputs: cell lysates not subjected to immunoprecipitation. **(b)** H358 cells were cotransfected with pEGFP-C1 and with control-pBJ5 or pBJ5-Ku70 wild-type or pBJ5-Ku70 K539R/K542R expression plasmids. Gefitinib 0.5  $\mu\text{mol/l}$  and/or TSA 200 ng/ml were added for 96 hours. Apoptosis was determined after Hoechst staining and counting apoptotic cells per 100 GFP-positive cells. Results are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \* $P < 0.05$ , less significant than control, NT, untreated.



**Figure 6** Antitumoral activity of gefitinib and HDAC inhibitor combined treatment *in vivo*. **(a)** Effects of combined treatment with gefitinib and vorinostat on growth of H358 xenograft tumors in athymic nude mice. The mice were randomly assigned to one of four treatment groups. Group 1 (control mice) received vehicle, group 2 received gefitinib, group 3 received vorinostat, and group 4 received gefitinib and vorinostat. Gefitinib (5 mg/kg body weight) or vorinostat (100 mg/kg body weight) were administered orally 5 days/week. Tumor volumes were measured 3 times a week. Points, mean tumor volume ( $n = 8$ ); bars, SE. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , for comparisons between treated and control for each series of experiments. **(b)** Acetylated proteins and Ki67 nuclear protein detected by immunostaining on frozen tumor sections from control mice, mice treated with vorinostat, gefitinib or both gefitinib and vorinostat, as indicated. IgG, irrelevant antibody. Bars = 50  $\mu\text{m}$ . Histogram: the percentage of positive cells for Ki67 was determined after counting stained cells per 1,000 cells on a section. Results are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 6$  mice per group); \*\* $P = 0.0039$  for comparisons between combined treatment and control or single treatment. **(c)** Effect of gefitinib and vorinostat on the expression of activated-caspase-3 in H358 xenograft tumors, assessed by western blotting. Actin was used as loading control.

**Table 1** Synergistic indexes of combination treatment of gefitinib and vorinostat

Drug	Control	Vorinostat (treatment A)	Gefitinib (treatment B)	Vorinostat + gefitinib
Mean volume (mm <sup>3</sup> $\pm$ SE)	1,442 $\pm$ 513	1,262 $\pm$ 786	1,454 $\pm$ 869	524 $\pm$ 243
MGI <sup>a</sup>	1	0.88	1.01	0.89 <sup>b</sup> 0.36 <sup>c</sup> 2.47 <sup>d</sup>
<i>P</i> value <sup>e</sup>	—	0.468	0.663	0.0029

Growth inhibition rate on established subcutaneous tumor nodules in athymic nude mice treated with indicated concentrations of vorinostat, gefitinib or their combinations.

<sup>a</sup>Mean growth inhibition rate (MGI) = growth rate of treated group/growth rate of untreated group. <sup>b</sup>Expected MGI: growth inhibition rate of treatment A  $\times$  growth inhibition rate of treatment B. <sup>c</sup>Observed MGI: growth inhibition rate of combined treatment on treatments A and B. <sup>d</sup>Index: calculated by dividing the expected growth inhibition rate by the observed growth inhibition rate. An index over 1 indicates synergistic effect and less than 1 indicates less than additive effect. <sup>e</sup>*P* value was calculated by *t*-test compared to control treatment.

the involvement of Ku70 in BAX inactivation in various pathologies such as neuroblastoma,<sup>18</sup> leukemic cells,<sup>20</sup> genotoxic stress response,<sup>21</sup> or imatinib resistance.<sup>22,23</sup> Here, we demonstrate that Ku70 binds to and inhibits BAX activation in NSCLC cells in response to gefitinib.

In addition, we show that the Areg-mediated inactivation of BAX in the cytosol is the consequence of the inhibition of Ku70 acetylation (Figure 3). Accordingly, the knock down of Areg enhances gefitinib-induced Ku70 acetylation, leading to BAX release in its active, proapoptotic form. This important result suggests that Areg could play pivotal regulatory functions by influencing the acetylation of intracellular proteins.

Acetylation is emerging as an important mechanism by which many nonhistone proteins are regulated.<sup>24,25</sup> Cell stress causes CBP- and/or p300/CBP-associated factor-dependent Ku70 acetylation. In addition, we proved that HDAC inhibitors such

as TSA can increase Ku70 acetylation. In both case, this acetylation of Ku70 is leading to the release of the proapoptotic form of BAX,<sup>15</sup> which can translocate to the mitochondria, destabilize it and induce apoptosis.<sup>11,18,20,23</sup> We also observed that overexpression of CBP or a TSA treatment in H358 cells sharply increased gefitinib-induced apoptosis. In our model, HDAC inhibitors such as TSA increased Ku70 acetylation and inhibited the BAX-Ku70 interaction, sensitizing H358 cells to gefitinib-induced apoptosis. These data demonstrated the involvement of both acetylases and deacetylases in Areg-dependent gefitinib-induced apoptosis regulation. These results also indicate that disruption of HAT-HDAC equilibrium governs nonhistone protein acetylation such as Ku70, thereby affecting Areg-dependent gefitinib resistance.

Ku70 is targeted for deacetylation by both class I/II HDAC and class III/sirtuin deacetylases.<sup>11,18,26</sup> Accordingly, we observed an increased sensitivity to gefitinib under TSA, vorinostat and nicotinamide treatments. Thus, classes I/II and class III/sirtuin deacetylases participate in the regulation of Areg-induced resistance to apoptosis by regulating Ku70 acetylation. Interestingly, class IIB HDAC is involved in lung carcinogenesis.<sup>27</sup> Further experiments are needed to clearly identify which HDAC can be involved in this mechanism.

Our results suggested that HDAC inhibitors counteract the protective effect of Areg and sensitize cells to gefitinib by increasing the level of acetylated Ku70, thus inducing the release of active BAX from Ku70. This key result encourages the use of HDAC inhibitors as anticancer agents.<sup>28</sup> Indeed, HDACs are involved in several human cancers.<sup>29</sup> HDAC inhibitors were developed for cancer therapy and vorinostat was approved for treatment of cutaneous T cell lymphoma in 2006.<sup>30</sup> Recently, the HDAC inhibitor romidepsin has been shown to enhance the antitumor effect of EGFR-TKI erlotinib in NSCLC cell lines.<sup>31</sup> We investigated an *in vivo* study combining HDAC inhibitors and EGFR-TKI on mice bearing NSCLC tumors. For the first time to our knowledge, a oral combination of vorinostat and gefitinib showed a major effect on inhibition of tumor growth. In tumors extracted 35 days after the beginning of treatment, vorinostat and gefitinib combined treatment induced an important and additive cell growth arrest. In addition, the cumulative effect of the dual treatment on apoptosis was obvious *in vitro* but was not significantly more elevated *in vivo*.

The sub-optimal doses of gefitinib and vorinostat, determined in preliminary experiments (data not shown), are not associated with any documented side-effect, and no sign of toxicity was observed in the cotreated animals. Possible effect of vorinostat on the average level of protein acetylation in the tumor extracts after completion of the treatment was not detected by western blot or immunohistochemistry. This is in agreement with other studies, which also failed to establish a correlation between the acetylation status and the tumor response.<sup>32</sup> This result strongly supports the value of associating HDAC inhibitors and EGFR-TKI in NSCLC treatment, especially for EGFR-TKI-resistant patients. The molecular pathways activated *in vivo* by this combination of treatments, and especially the role of Ku70, still remain to be formally established.

In summary, our findings provide evidence that Areg mediates gefitinib resistance in NSCLC cells through an original acetylation-dependent pathway. Areg reduces Ku70 acetylation,

therefore strengthening the functional inhibition of BAX. This results in the inhibition of gefitinib toxicity in NSCLC cells. The involvement of acetylation mechanisms in gefitinib sensitivity should encourage the application of HDAC inhibitors as anticancer agents or in combination with EGFR-TKI treatments, especially in EGFR-TKI-resistant patients. Further studies are needed to validate whether the gefitinib treatment combined with HDAC inhibition could enhance the objective response and survival rates in NSCLC patients. Moreover, we demonstrated the therapeutic potential of Areg siRNAs combined with gefitinib treatment in NSCLC.<sup>9</sup> It could be interesting to combine a specific anti-Areg siRNAs treatment with gefitinib, in order to augment its therapeutic benefit.<sup>9</sup>

## MATERIALS AND METHODS

**Cell culture and drug treatments.** The human H358 and H322 NSCLC cell lines were from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and maintained in RPMI 1640 medium (Gibco, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Gefitinib was kindly provided by AstraZeneca France (Paris, France) and was prepared as 10 mmol/l stock solution in dimethyl sulfoxide and stored at -20°C. Recombinant human Areg was from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France) and stored at -80°C in dimethyl sulfoxide and dissolved in fresh medium just before use. TSA was from Sigma-Aldrich and prepared as 25 µg/ml stock solution, nicotinamide was from Sigma-Aldrich and prepared as 1 mol/l stock solution, and suberoylanilide hydroxamic acid or vorinostat was from Indofine Chemical Soc, (Hillsborough, NJ), prepared as 10 mmol/l stock solution and stored at -20°C. Cells were treated as indicated in figures legends.

**Transfections.** siRNAs targeting human Areg, human Ku70 and nonspecific control siRNAs were synthesized by MWG Biotech (Roissy, France). Sequences of siRNAs targeting Areg were 5'-CGA-ACC-ACA-AAU-ACC-UGG-CTT-3' and 5'-CCU-GGA-AGC-AGU-AAC-AUG-CTT-3'. Sequences of siRNAs targeting Ku70 were 5'-GAU-GCC-CUU-UAC-UGA-AAA-ATT-3' and 5'-UUC-UCU-UGG-UAA-CUU-UCC-CTT-3' and control siRNA sequence was 5'-CUU-ACG-CUC-ACU-ACU-GCG-ATT-3'. Transfection of duplex siRNAs was performed with Oligofectamine reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), following the manufacturer's instructions. SiRNAs were transfected into 60% confluent cells at the final concentration of 200 nmol/l. After transfection, the efficiency of Areg knockdown was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay as previously described<sup>16</sup> and the efficiency of Ku70 knockdown was assessed by western blotting.

Transient transfections were carried out on H358 cells cultured on Lab-Tek two wells. Cells were transfected using Fugene (Roche Diagnostics, Meylan, France) according to the manufacturer's protocol, with 1.5 µg of an expression vector encoding CBP-hemagglutinin or a control vector encoding green fluorescent protein (GFP). H358 cells were also transfected with control-pBJ5 or pBJ5-Ku70 wild-type (provided by D. Trouche) or pBJ5-Ku70 K539R/K542R (generated using a QuickChange site-directed mutagenesis kit, Stratagene), along with pEGFP-C1 expression vector (Clontech, St Germain en Laye, France), using JetPEI (PolyPlus Transfection, Strasbourg, France) and according manufacturer's instructions. Immunofluorescence was performed 96 hours after transfection.

**Apoptosis assays.** Cells were harvested and pooled. The morphological changes related to apoptosis were assessed by fluorescence microscopy after Hoechst 33342 (5 µg/ml, Sigma-Aldrich) staining of cells and the percent of apoptotic cells was scored after counting at least 500 cells. Active caspase-3 was detected by flow cytometry using phycoerythrin-conjugated

monoclonal active caspase-3 antibody kit (BD Pharmingen, Pont de Claix, France), following manufacturer's instructions. Analysis was performed on a Becton Dickinson FACScan flow cytometer with CellQuest Software (Becton Dickinson, Pont de Claix, France).

**Protein immunostaining by flow cytometry.** Activated-BAX immunostaining analysis was performed as previously described.<sup>8,33</sup> Briefly, fixed cells were first incubated with anti-activated-BAX antibody (N-20, 1:100; Santa Cruz Biotechnology, Tebu, France) or with irrelevant immunoglobulin G (IgG) (BD Pharmingen). Then washed cells were incubated with Alexa 488 anti-rabbit IgG (H+L) conjugate (1:1,000; Interchim, Montluçon, France). Analysis was performed on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) using Cellquest software. Green fluorescence was excited at 488 nm and detected at 500–550 nm.

**Immunofluorescence staining.** Cells cultured on Lab-Tek were transfected as indicated. 96 hours after transfection, fixed cells were incubated with anti-hemagglutinin.11 (1:1,000; Covance, Eurogentec). Second incubation was performed with Alexa 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) conjugate (1:500; Interchim, Montluçon, France). Cells were then counterstained with Hoechst 33342 and observed using an Olympus microscope.

**Subcellular fractionation and protein extraction.** Total cell lysates were obtained after washing cells twice in phosphate-buffered saline and incubated in radioimmuno precipitation assay lysis buffer (Tris-HCl 50 mmol/l pH 7.4, NaCl 150 mmol/l, Nonidet P-40 1%, sodium deoxycholate 0.5%, sodium dodecyl sulfate 0.1%) with proteases and phosphatases inhibitors (NaF 1 mmol/l, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mmol/l, PMSF 0.5 mmol/l, leupeptin 10 µg/ml, aprotinin 10 µg/ml and pepstatin 10 µg/ml) for 30 minutes on ice.

Cytosolic extracts for acetylation experiments were obtained as follows: cells were incubated with 50 ng/ml TSA overnight before 15 minutes incubation in hypotonic buffer (100 ng/ml TSA, Tris-HCl pH 7.5 10 mmol/l, KCl 10 mmol/l, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol/l, DTT 0.5 mmol/l) with protease and phosphatase inhibitors. Cells were then incubated 10 minutes with hypotonic buffer supplemented with NP40 1%. The supernatant contained the cytoplasmic proteins.

Fractions extracts were assessed for protein content using the Bio-Rad D C Protein Assay kit, and 20 µg of proteins were subjected to electrophoresis and analyzed by western blotting for BAX and Ku70 content. The relative purity of fractions was ascertained by western blotting using  $\alpha$ -tubulin (Sigma-Aldrich) as a marker of cytosol and histone H3 (Upstate, Molsheim, France) as a marker of nucleus.

**Immunoblotting and coimmunoprecipitation.** Endogenous BAX immunoprecipitations were performed using 1 mg protein from whole-cell extracts and 1 µg BAX antibody (BD Pharmingen) or irrelevant rabbit IgG for negative control and by incubating overnight at 4°C under gentle agitation. Cytosolic Ku70 immunoprecipitations were done using 4 mg protein and 1 µg Ku70 antibody (Santa Cruz Biotechnology) or irrelevant mouse IgG<sub>2b</sub> for negative control and by incubating overnight at 4°C under agitation. The immunocomplexes were collected using protein-G agarose (Sigma-Aldrich). The immunoprecipitates were resolved on sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis gels, followed by western blotting with acetylated protein (1/1,000; Abcam, Paris, France), Ku70 (1/1,000; Santa Cruz Biotechnology) or BAX (1/3,000; BD Pharmingen) antibodies. The immunoblot for acetylated protein was re-probed with Ku70 antibody to confirm the presence of an overlapping Ku70 band.

Western blotting was also done using anticlaved caspase-3 (1/1,000; Asp 175, Cell Signaling, St Quentin en Yvelines, France) antibodies. To ensure equal loading and transfer, membranes were also probed for actin using antiactin antibody (Sigma, 1/1,000). Western blotting was further processed by standard procedures and revealed by chemiluminescence (ECL; Amersham, Orsay, France).

The relative intensity, measured using ImageJ (NIH software), of acetylated Ku70 bands or total Ku70 of treated samples to that of control cells was normalized to the respective Ku70 or BAX, respectively.

**In vivo model.** The effect of the combination of gefitinib and vorinostat was measured on established subcutaneous tumor bearing mice. All the animal experiments were performed in agreement with the European Economic Community guidelines and the “Principles of laboratory animal care” (NIH publication N 86-23 revised 1985). The experimental protocol was submitted to ethical evaluation and the experiment received the accreditation number 0260. Human lung adenocarcinoma H358 cells were harvested from culture, and 20 × 10<sup>6</sup> cells in sterile phosphate-buffered saline were injected subcutaneously into the flank of female NMRI nude mice (6–8 weeks old, Janvier, Le Genest Saint Isle, France). When tumor diameters reached 5 mm, mice were randomized in four experimental groups (10 mice/group). Group 1 (control mice) received a vehicle (tween/glucose), group 2 received vorinostat, group 3 received gefitinib, and group 4 received both vorinostat and gefitinib. Five mg/kg/day of gefitinib and/or 100 mg/kg/day of vorinostat were administered orally in tween/glucose, 5 days a week. Tumor growth was quantified by measuring twice a week the tumors in two dimensions with a Vernier caliper. The volume was calculated as follows:  $a \times b^2 \times 0.4$ , where  $a$  and  $b$  are the largest and smallest diameters, respectively. Results are expressed as volume ± SEM. Mice bearing necrotic tumors or tumors ≥1.5 cm in diameter were euthanized immediately. On day 36, all mice were killed and tumors were collected before further analyses by western blotting and immunohistochemistry.

**Immunohistochemical staining.** Tumor sections of 7 µm thickness were fixed with 3.7% paraformaldehyde for 10 minutes at room temperature, then saturated for 5 minutes with 0.03% bovine serum albumin, incubated overnight at 4°C with rabbit antiacetylated lysine antibody (1/200; Cell Signaling) or with monoclonal mouse antihuman Ki67 (1/150; Dako, Trappes, France). Immunohistochemistry was further processed using the Histostain-Plus Bulk Kit (Invitrogen). The final reaction product was visualized with diaminobenzidine. After immunohistochemical reactions, sections were counterstained with hematoxylin. Negative controls were performed with the same sections incubated with irrelevant antibody (rabbit IgG 1/40,000 or mouse IgG 1/30,000).

**Statistical analyses.** Statistical significance of difference in treatment was analyzed by Mann–Whitney test. Means comparisons among groups and statistical significance of differences in tumor growth in the combination treatment group and in single-agent treatment groups were analyzed by ANOVA test. Statistics were done using Statview 4.1 software (Abacus Concept, Berkeley, CA). In all statistical analyses, two-sided  $P$  values < 0.05 were considered statistically significant.

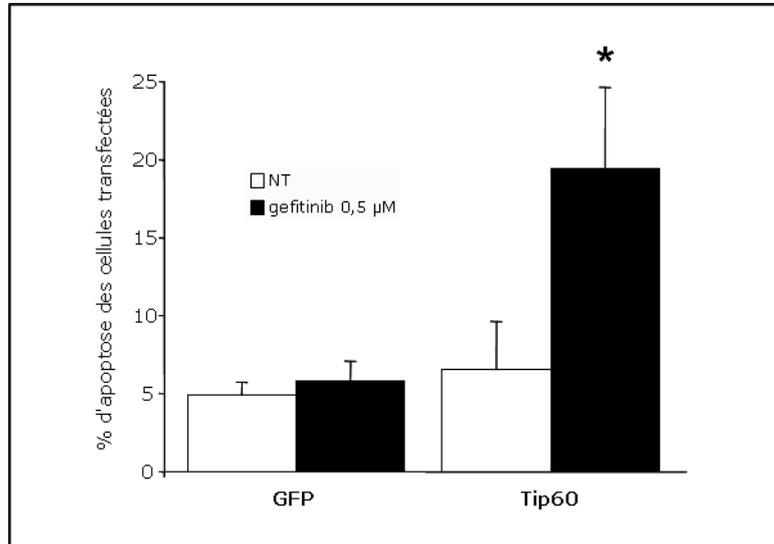
## ACKNOWLEDGMENTS

We thank AstraZeneca for gefitinib, D. Trouche (CNRS UMR5088, France) for Ku70 wild-type expression vector, Laetitia VanWanterghem and Corine Tenaud for technical assistance. This work was supported by grants and research fellowship from La Ligue contre le Cancer, comité de la Drôme; EpiPro program (InCa) and “projet libre INCa”, PL06\_025, to MCF and SK laboratories; ARECA program (ARC) to SK laboratory and with the help of a “subvention-libre” from the ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer).

## REFERENCES

- Garcia de Palazzo, IE, Adams, GP, Sundareshan, P, Wong, AJ, Testa, JR, Bigner, DD *et al.* (1993). Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* **53**: 3217–3220.
- Rusch, V, Baselga, J, Cordon-Cardo, C, Orazem, J, Zaman, M, Hoda, S *et al.* (1993). Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non-small cell lung cancers and adjacent benign lung. *Cancer Res* **53**(10 Suppl): 2379–2385.
- Fukuoka, M, Yano, S, Giaccone, G, Tamura, T, Nakagawa, K, Douillard, JY *et al.* (2003). Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J Clin Oncol* **21**: 2237–2246.
- Shepherd, FA, Rodrigues Pereira, J, Ciuleanu, T, Tan, EH, Hirsh, V, Thongprasert, S *et al.*; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005). Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **353**: 123–132.

5. Thatcher, N, Chang, A, Parikh, P, Rodrigues Pereira, J, Ciuleanu, T, von Pawel, J *et al.* (2005). Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet* **366**: 1527–1537.
6. Ishikawa, N, Daigo, Y, Takano, A, Taniwaki, M, Kato, T, Hayama, S *et al.* (2005). Increases of amphiregulin and transforming growth factor- $\alpha$  in serum as predictors of poor response to gefitinib among patients with advanced non-small cell lung cancers. *Cancer Res* **65**: 9176–9184.
7. Busser, B, Coll, JL and Hurbín, A (2008). The increasing role of amphiregulin in non-small cell lung cancer. *Pathol Biol* (epub ahead of print).
8. Hurbín, A, Coll, JL, Dubrez-Daloz, L, Mari, B, Aubergier, P, Brambilla, C *et al.* (2005). Cooperation of amphiregulin and insulin-like growth factor-1 inhibits Bax- and Bad-mediated apoptosis via a protein kinase C-dependent pathway in non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem* **280**: 19757–19767.
9. Busser, B, Sancey, L, Josseland, V, Niang, C, Favrot, MC, Coll, J-L *et al.* Amphiregulin promotes BAX inhibition and resistance to gefitinib in non-small-cell lung cancers. *Mol Ther*, this issue.
10. Scorrano, L and Korsmeyer, SJ (2003). Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* **304**: 437–444.
11. Cohen, HY, Lavu, S, Bitterman, KJ, Hekking, B, Imahiyerobo, TA, Miller, C *et al.* (2004). Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell* **13**: 627–638.
12. Gullo, C, Au, M, Feng, G and Teoh, G (2006). The biology of Ku and its potential oncogenic role in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1765**: 223–234.
13. Featherstone, C and Jackson, SP (1999). Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions? *Mutat Res* **434**: 3–15.
14. Tuteja, R and Tuteja, N (2000). Ku autoantigen: a multifunctional DNA-binding protein. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **35**: 1–33.
15. Witta, SE, Gemmill, RM, Hirsch, FR, Coldren, CD, Hedman, K, Ravdel, L *et al.* (2006). Restoring E-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines. *Cancer Res* **66**: 944–950.
16. Hurbín, A, Dubrez, L, Coll, JL and Favrot, MC (2002). Inhibition of apoptosis by amphiregulin via an insulin-like growth factor-1 receptor-dependent pathway in non-small cell lung cancer cell lines. *J Biol Chem* **277**: 49127–49133.
17. Desagher, S, Osen-Sand, A, Nichols, A, Eskes, R, Montessuit, S, Lauper, S *et al.* (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* **144**: 891–901.
18. Subramanian, C, Otipari, AW Jr, Bian, X, Castle, VP and Kwok, RP (2005). Ku70 acetylation mediates neuroblastoma cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 4842–4847.
19. Subramanian, C, Jarzembowski, JA, Otipari, AW Jr, Castle, VP and Kwok, RP (2007). CREB-binding protein is a mediator of neuroblastoma cell death induced by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A. *Neoplasia* **9**: 495–503.
20. Sutheesophon, K, Kobayashi, Y, Takatoku, MA, Ozawa, K, Kano, Y, Ishii, H *et al.* (2006). Histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) induces apoptosis in leukemic cells by facilitating mitochondrial translocation of Bax, which is enhanced by the proteasome inhibitor bortezomib. *Acta Haematol* **115**: 78–90.
21. Mazumder, S, Plesca, D, Kinter, M and Almasan, A (2007). Interaction of a cyclin E fragment with Ku70 regulates Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* **27**: 3511–3520.
22. Ju, DS, Kim, MJ, Bae, JH, Song, HS, Chung, BS, Lee, MK *et al.* (2007). Camptothecin acts synergistically with imatinib and overcomes imatinib resistance through Bcr-Abl independence in human K562 cells. *Cancer Lett* **252**: 75–85.
23. Lee, SM, Bae, JH, Kim, MJ, Lee, HS, Lee, MK, Chung, BS *et al.* (2007). Bcr-Abl-independent imatinib-resistant K562 cells show aberrant protein acetylation and increased sensitivity to histone deacetylase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* **322**: 1084–1092.
24. Spange, S, Wagner, T, Heinzl, T and Krämer, OH (2009). Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol* **41**: 185–198.
25. Minucci, S and Pelicci, PG (2006). Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* **6**: 38–51.
26. Sundaresan, NR, Samant, SA, Pillai, VB, Rajamohan, SB and Gupta, MP (2008). SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70. *Mol Cell Biol* **28**: 6384–6401.
27. Kamemura, K, Ito, A, Shimazu, T, Matsuyama, A, Maeda, S, Yao, TP *et al.* (2008). Effects of downregulated HDAC6 expression on the proliferation of lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **374**: 84–89.
28. Bolden, JE, Peart, MJ and Johnstone, RW (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* **5**: 769–784.
29. Yang, XJ and Seto, E (2007). HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* **26**: 5310–5318.
30. Grant, S, Easley, C and Kirkpatrick, P (2007). Vorinostat. *Nat Rev Drug Discov* **6**: 21–22.
31. Zhang, W, Peyton, M, Xie, Y, Soh, J, Minna, JD, Gazdar, AF *et al.* (2009). Histone deacetylase inhibitor romidepsin enhances anti-tumor effect of erlotinib in non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines. *J Thorac Oncol* **4**: 161–166.
32. Prince, HM, Bishton, MJ and Harrison, SJ (2009). Clinical studies of histone deacetylase inhibitors. *Clin Cancer Res* **15**: 3958–3969.
33. Dubrez, L, Coll, JL, Hurbín, A, Solary, E and Favrot, MC (2001). Caffeine sensitizes human H358 cell line to p53-mediated apoptosis by inducing mitochondrial translocation and conformational change of BAX protein. *J Biol Chem* **276**: 38980–38987.



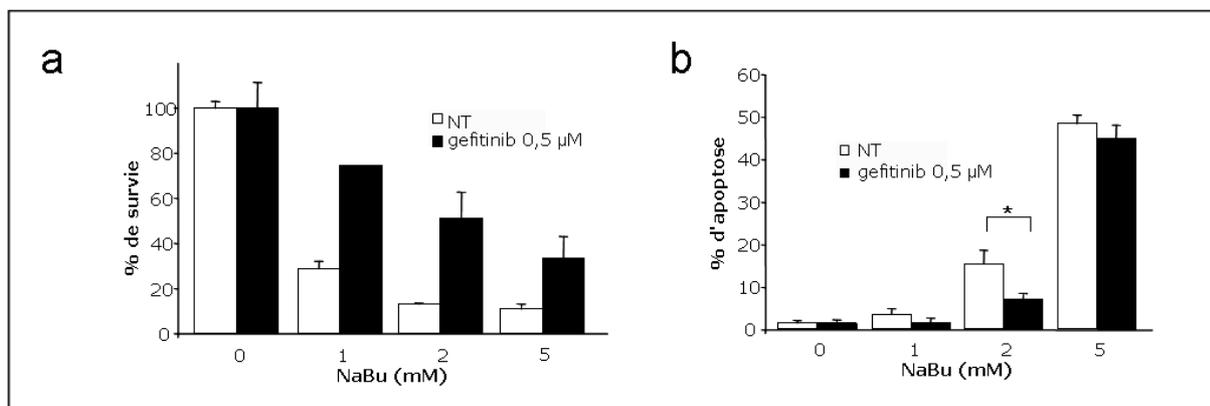
**Figure 25. Implication de Tip60 dans la résistance au gefitinib**

Les cellules H358 cultivées en Lab-tek® sont transfectées en présence de Fugène® avec 1,5 µg de plasmide contrôle codant pour l'eGFP-C1 ou pour Tip60-HA, en présence ou non de gefitinib à 0,5 µM. L'expression de la GFP (Green Fluorescent Protein) ou de Tip60-HA (immunofluorescence anti-HA) est analysée par microscopie de fluorescence 96 h après transfection, et l'apoptose est quantifiée après comptage de 100 cellules transfectées, marquées au Hoechst 33342. Les histogrammes représentent la moyenne ± écart-type de 4 expériences indépendantes. \*  $p < 0.05$ , significatif par rapport au contrôle.

## 2.3 Résultats complémentaires

### *a) Implication des HAT dans la résistance au gefitinib*

Nous avons montré que l'histone acétyltransférase (HAT) CBP est impliquée dans l'acétylation de Ku70 (voir **Figure 4a de l'article 2**). Nous avons complété l'identification des HAT impliquées dans la résistance au gefitinib en analysant le rôle de Tip60. Tip60 est une HAT dont l'expression est perdue dans 50% des cancers bronchiques (Thèse Van Den Broeck, 3 sept. 2009). De plus, Tip60 possède une activité cruciale dans le déclenchement de l'apoptose (Sapountzi, *et al.*, 2006, Tang, *et al.*, 2006). La surexpression transitoire de Tip60 n'a aucun effet par elle-même, mais elle augmente l'apoptose des cellules H358 en présence de gefitinib (**Figure 25**). Ce résultat suggère que Tip60 pourrait intervenir dans la résistance au gefitinib.



### Figure 26. Implication des HDAC dans la résistance au gefitinib

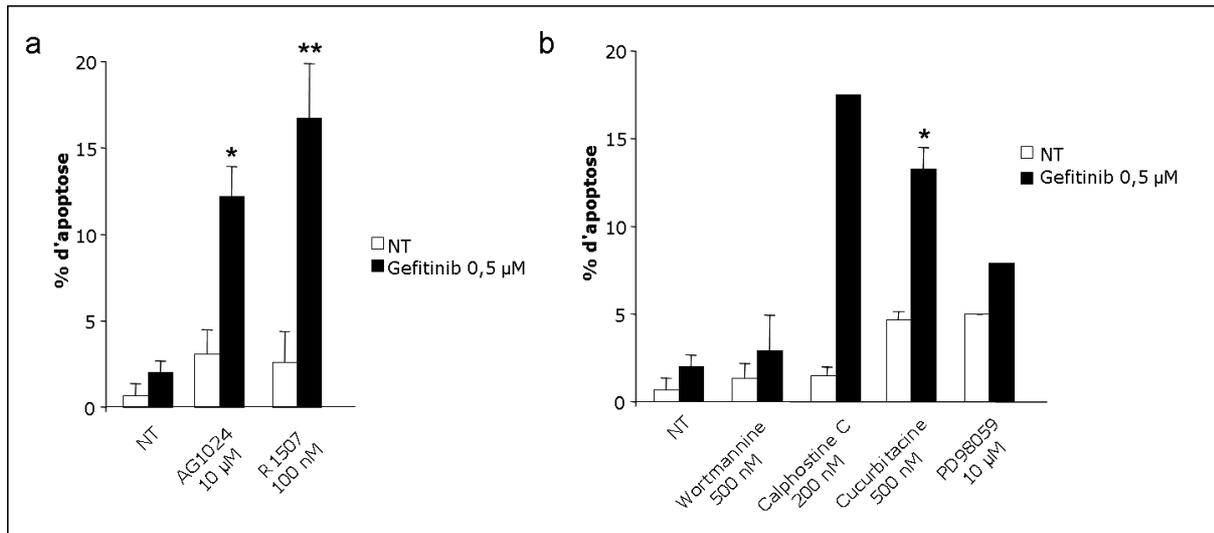
(a-b) Les cellules H358 sont traitées par du butyrate de sodium (NaBu) en présence ou non de gefitinib à 0,5 μM pendant 96 heures. La survie cellulaire a été évaluée par un test d'exclusion cellulaire au bleu trypan (a) et l'apoptose a été quantifiée après marquage des noyaux au Hoechst 33342 (b). Les histogrammes représentent la moyenne ± écart-type de n expériences indépendantes. Les statistiques sont réalisées après n=4 expériences indépendantes. \*  $p < 0.05$ , significatif par rapport au contrôle.

***b) Implication des HDAC dans la résistance au gefitinib***

Les histone déacétylases (HDAC) totalisent une quinzaine de membres répartis en 3 classes selon leur homologie, leurs substrats et leur sensibilité à certains inhibiteurs. La classe I contient les HDAC-1, -2, -3 et -8, qui présentent une activité déacétylase exclusivement nucléaire. La classe II comprend les HDAC-4, -5, -6, -7, -9, -10 et -11. HDAC-6, -10 et -11 ont deux sites catalytiques et forment la classe IIb. Ces deux classes sont zinc-dépendantes et sont sensibles aux HDACi comme la TSA ou le vorinostat. Le butyrate de sodium (NaBu) est un inhibiteur spécifique des HDAC de classe I et II, à l'exception des HDAC de la classe IIb HDAC-6 et HDAC-10. Enfin, la classe III contient les sirtuines qui sont dépendantes du cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide (NAD<sup>+</sup>) (Schrumpp, 2009) et sont spécifiquement inhibées par le nicotinamide (NAM).

Nous avons montré que la TSA et le vorinostat ainsi que le NAM sensibilisent les cellules H358 au gefitinib (voir **Figure 4b-d de l'article 2**) suggérant un rôle des HDAC de classe I, II et III dans la résistance au gefitinib. Afin d'identifier les HDAC impliquées dans le mécanisme de résistance au gefitinib, nous avons également traité les cellules H358 par du gefitinib en présence de butyrate de sodium (NaBu).

Le NaBu diminue la survie des cellules H358 (**Figure 26a**) alors que le gefitinib les protège de la toxicité induite par le NaBu. De même, le NaBu induit l'apoptose des cellules H358 (**Figure 26b**), et le gefitinib les protège de l'apoptose induite par le NaBu à 1 et 2 mM, mais pas à 5 mM. Ces données suggèrent que le NaBu a des effets anti-prolifératifs et proapoptotiques sur les cellules indépendamment de la résistance au gefitinib. Les effets observés avec la TSA/vorinostat mais pas avec le NaBu sur la résistance au gefitinib suggèrent que les HDAC-6 et -10 pourraient jouer un rôle important dans le mécanisme de résistance à l'apoptose induite par le gefitinib.



**Figure 27. Identification d'autres partenaires impliqués dans la voie de résistance au gefitinib**

Les cellules H358 sont traitées en présence ou non de gefitinib (0,5 µM) et (a) d'AG1024 (inhibiteur de la tyrosine kinase de l'IGF1-R, 10 µM), de R1507 (anticorps monoclonal anti-IGF1-R, 100 nM) ou (b) de wortmannine (inhibiteur des PI3K, 500 nM), de calphostine C (inhibiteur des PKC, 200 nM), de cucurbitacine I (inhibiteur de STAT3, 500 nM) ou de PD98059 (inhibiteur des MAPK p42/44 ou ERK1/2, 10 µM).

L'apoptose est quantifiée après comptage des cellules marquées au Hoechst 33342, 96 heures après traitement. Les histogrammes représentent la moyenne  $\pm$  écart-type de  $n$  expériences indépendantes. Les statistiques sont réalisées après  $n \geq 3$  expériences indépendantes, où  $n=3$  (AG1024),  $n=4$  (R1507) et  $n=3$  (cucurbitacine). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , significatif par rapport au contrôle.

**c) Autres intermédiaires intervenant dans la voie de résistance**

Nous observons l'hétérodimérisation de l'EGFR avec l'IGF1-R en réponse au gefitinib dans les cellules H358 (voir **supplementary data S1 de l'article 1**), suggérant l'implication de l'IGF1-R dans le mécanisme de résistance au gefitinib que nous décrivons. Afin de confirmer ce rôle, nous avons évalué l'apoptose induite par le gefitinib en présence d'inhibiteurs de l'IGF1-R. L'AG1024 (inhibiteur de la tyrosine kinase de l'IGF1-R) ou le R-1507 (anticorps monoclonal anti-IGF1-R) n'ont pas d'effets seuls mais induisent tous deux une forte apoptose en présence de gefitinib (**Figure 27a**). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'IGF1-R sensibilise les cellules au gefitinib et que la résistance au gefitinib passe par le recrutement de l'IGF1-R dans les cellules H358.

Nous avons ensuite cherché à caractériser les voies de signalisation en aval qui participent à la résistance au gefitinib. Les PI3K et les MAPK sont les voies intracellulaires majeures qui transmettent des signaux antiapoptotiques des récepteurs membranaires jusqu'au noyau (Hynes and MacDonald, 2009). La voie STAT3 est également impliquée dans la croissance cellulaire après stimulation de l'EGFR, y compris par l'AREG (Berasain, *et al.*, 2005), et STAT3 semble être corrélée aux mutations de l'EGFR qui interviennent dans la sensibilité aux EGFR-TKI (Haura, *et al.*, 2005). C'est pourquoi une inhibition de STAT3 est même envisagée comme stratégie thérapeutique. Nous avons montré que les PKC sont impliquées dans l'inhibition de l'apoptose médiée par l'AREG (Hurbin, *et al.*, 2005).

Afin de déterminer laquelle de ces protéines de signalisation est responsable de l'inhibition de l'apoptose induite par le gefitinib, des inhibiteurs spécifiques ont été utilisés en combinaison avec le gefitinib (**Figure 27b**). L'incubation des cellules H358 en présence de l'inhibiteur des PI3K wortmannine n'induit pas d'apoptose et n'affecte pas la résistance au gefitinib. L'inhibiteur des MAPK p42/p44 PD98059 induit une faible augmentation de l'apoptose mais ne semble pas affecter la réponse au gefitinib. Par contre, la calphostine C qui inhibe les PKC rétablit l'apoptose induite par le gefitinib sans induire d'apoptose par elle-même. La cucurbitacine I, inhibiteur de STAT3, induit l'apoptose des cellules H358 et les sensibilise fortement au gefitinib. Ces données suggèrent que les PI3K et les MAPK n'interviennent pas dans la résistance au gefitinib des cellules H358. En revanche, l'inhibition de l'apoptose induite par le gefitinib semble impliquer les PKC et STAT3. Ces résultats sont préliminaires et restent à confirmer.

## 2.4 Conclusion

Dans cette étude, nous démontrons que l'AREG met en jeu une voie de résistance au gefitinib originale, qui dépend de l'acétylation de Ku70. L'AREG réduit l'acétylation de Ku70, ce qui favorise l'inactivation de Bax et résulte en l'inhibition de l'action toxique du gefitinib dans les cellules de CBNPC. La voie mise en jeu par l'AREG semble impliquer l'IGF1-R, les PKC et STAT3, mais cela reste à confirmer formellement. De plus, il nous reste à déterminer quelles HAT et HDAC interviennent.

Les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* montrent que les HDACi potentialisent l'activité antitumorale du gefitinib et encouragent l'emploi des HDACi comme agents anti-cancéreux ou en association avec les EGFR-TKI, en particulier chez les patients résistants aux TKI.

# **Discussion et Perspectives**



## **I. Un nouveau mécanisme de résistance au gefitinib : le rôle prépondérant de l'AREG**

### **1. L'AREG : un acteur de la résistance au gefitinib**

L'AREG joue un rôle autocrine anti-apoptotique dans plusieurs pathologies comme les carcinomes du sein (De Luca, *et al.*, 1999) du foie (Castillo, *et al.*, 2006) et du poumon (Hurbin, *et al.*, 2005, Hurbin, *et al.*, 2002).

Elle a également été décrite comme participant à la résistance à certains traitements. Par exemple dans les cancers du sein, l'AREG est capable de conférer une résistance à la chimiothérapie conventionnelle comme le cisplatine en activant la voie PI3K-AKT (Eckstein, *et al.*, 2008), mais aussi de conférer une résistance à un traitement d'hormonothérapie anticancéreuse comme l'exemestane, en activant la voie des MAPK (Wang, *et al.*, 2008). Nos résultats identifient l'AREG comme une protéine également capable de conférer la résistance à l'apoptose induite par le gefitinib dans les CBNPC.

En 2004, l'équipe de Nakamura a recherché des protéines capables de prédire la sensibilité au gefitinib par une analyse d'expression génique sur micropuce à ADNc (Kakiuchi, *et al.*, 2004). A partir de biopsies de tumeurs du poumon non résécables, les auteurs ont comparé les profils d'expression des gènes de tumeurs de patients répondant à un traitement par gefitinib à ceux de patients non-répondeurs. Leur étude identifie 51 gènes qui présentent une expression différentielle entre des patients répondeurs et non-répondeurs au gefitinib, parmi lesquels 5 sont des protéines impliquées dans la signalisation de l'EGFR, dont le TGF- $\alpha$ , ADAM9 (Izumi, *et al.*, 1998), et l'AREG. Pour la première fois, l'AREG est ainsi proposée comme marqueur potentiel de résistance au gefitinib (Hirsch and Witta, 2005). Enfin, en 2005, de fortes concentrations d'AREG sérique sont retrouvées chez les patients porteurs de CBNPC de stade avancé non-répondeurs au gefitinib (Ishikawa, *et al.*, 2005), suggérant un rôle de l'AREG dans la résistance aux EGFR-TKI. Nos travaux démontrent l'implication de l'AREG dans cette résistance.

Trois études ont également corrélé la présence des ligands de l'EGFR dont l'AREG à une résistance aux EGFR-TKI. En effet, les ligands de l'EGFR atténuent l'effet anticancéreux des molécules qui ciblent et inhibent spécifiquement les récepteurs EGFR ou HER2, dans des lignées de carcinomes gastrique et mammaire (Motoyama, *et al.*, 2002) et les ligands de l'EGFR rendent le cancer du sein résistant aux EGFR-TKI (Ferrer-Soler, *et al.*, 2007). De plus, l'augmentation du niveau d'expression des ligands de l'EGFR, dont l'AREG, est corrélée à la résistance au cetuximab dans le cancer du poumon (Li, *et al.*, 2009).

Nos travaux et ceux de la littérature permettent de proposer l'AREG comme biomarqueur sérique de résistance au gefitinib dans le CBNPC de stade avancé (Masago, *et al.*, 2008).

Inversement, l'AREG est parfois décrite comme un biomarqueur de sensibilité pour des thérapeutiques ciblées. L'AREG est par exemple associée à une meilleure sensibilité au dasatinib (inhibiteur des tyrosine kinases BCR/ABL et Src) dans le cancer de la prostate (Wang, *et al.*, 2007). Dans les cancers colorectaux, Khambata-Ford montre que l'expression d'AREG et une mutation de K-RAS sont des marqueurs prédictifs d'un contrôle de la maladie chez des patients porteurs de cancer colorectal métastatique traité par cetuximab (Khambata-Ford, *et al.*, 2007). L'AREG est également corrélée à une sensibilité aux EGFR-TKI dans les cancers de la tête et du cou (Rogers, *et al.*, 2009) et l'analyse de la sensibilité aux EGFR-TKI des CBNPC ainsi que les cancers de la tête et du cou présentant un EGFR de type sauvage a été corrélée à la production autocrine des ligands de l'EGFR, dont l'AREG (Yonesaka, *et al.*, 2008). Dans cette étude, il apparaît que les lignées sensibles au gefitinib et au cetuximab sont celles qui produisent de l'AREG. De même l'analyse immunohistochimique réalisée sur 24 CBNPC présentant un EGFR sauvage a révélé que les patients présentant une maladie stable sous gefitinib et/ou erlotinib produisaient de l'AREG localement (Yonesaka, *et al.*, 2008). Ce résultat est contradictoire avec nos données. Cependant, dans cette étude, l'apoptose induite par les EGFR-TKI n'a pas été étudiée. De plus, les 24 tumeurs de CBNPC appartiennent à différents sous-types histologiques (14 adénocarcinomes, 6 adénocarcinomes à composante brochioloalvéolaire, 2 carcinomes épidermoïdes et 2 cancers non caractérisés) rendant peut-être difficile l'établissement de corrélations fiables compte tenu de la grande hétérogénéité génétique de ces tumeurs. Enfin, le taux d'AREG sérique n'a pas été étudié, comme le suggère Ishikawa (Ishikawa, *et al.*, 2005). Deux autres études ont cherché à identifier les gènes associés à une sensibilité du CBNPC au gefitinib (Coldren, *et al.*, 2006, Zembutsu, *et al.*, 2003) sans réussir à identifier l'AREG ou tout autre ligand de l'EGFR comme étant corrélé à une bonne réponse au gefitinib,

confirmant que l'AREG n'est pas systématiquement liée à une sensibilité au gefitinib dans les CBNPC.

En résumé, selon le type de cancer étudié et/ou les lignées cellulaires utilisées, l'AREG peut être considérée comme un biomarqueur de résistance ou de sensibilité aux thérapies ciblées. Dans notre modèle, nous démontrons son rôle majeur dans l'inhibition de l'apoptose induite par le gefitinib dans le CBNPC.

## **2. Mécanisme d'action de l'AREG**

### **2.1. Expression de l'AREG et mode d'action autocrine / paracrine / endocrine**

L'AREG est un facteur de croissance synthétisé sous forme de précurseur transmembranaire. Une métalloprotéase (ADAM-17 ou TACE) le clive et libère l'AREG soluble dans le milieu extracellulaire. L'AREG est alors disponible pour agir localement (mode d'action autocrine et/ou paracrine) mais également à distance puisque l'AREG est retrouvée dans la circulation générale (mode d'action endocrine) en quantités variables selon l'état de santé du patient, son âge, et son sexe. On relève ainsi une double origine de l'AREG utilisable par une tumeur qui peut, soit la synthétiser *in situ* pour son propre besoin et s'affranchir d'un apport extérieur dépendant des autres tissus, soit la capter dans la circulation sanguine (voir liste des tissus capables de synthétiser l'AREG en **Annexe V**).

Dans notre étude, l'AREG confère la résistance au gefitinib quelle que soit son origine, à la fois lorsqu'elle est autoproduite par la tumeur (lignée H358 *in vitro* et en xénogreffe), mais aussi lorsque l'AREG est apportée dans le milieu de culture de cellules qui n'en produisent pas (cellules H322 et H3255). Nous pouvons ainsi conclure que le lieu de production n'intervient pas dans notre modèle, et que l'AREG, qu'elle soit synthétisée *in situ* ou à distance, joue le même rôle dans la résistance au gefitinib. Ceci corrobore les résultats d'Ishikawa qui montre que l'AREG présente dans la circulation sanguine peut conférer une résistance au gefitinib chez des patients porteurs de CBNPC (Ishikawa, *et al.*, 2005). Ainsi, un tissu non producteur d'AREG peut utiliser l'AREG circulante pour résister aux traitements EGFR-TKI.

De plus, l'utilisation de l'AREG par les tumeurs peut aussi constituer un mécanisme mis en place par la cellule tumorale pour échapper au traitement.

## **2.2. Mécanisme d'inhibition de l'apoptose : inactivation de BAX par Ku70**

L'action proapoptotique du gefitinib est liée aux molécules de la famille Bcl-2 (Costa, *et al.*, 2007, Cragg, *et al.*, 2007), y compris Bax, comme cela a été montré dans des cellules d'adénocarcinome de vessie (Ariyama, *et al.*, 2006). D'autre part, l'erlotinib induit l'apoptose des cellules H3255 *via* Bax (Ling, *et al.*, 2008). Nos travaux montrent que l'AREG est directement responsable de l'inhibition de l'apoptose induite par le gefitinib. L'AREG diminue le niveau d'expression de Bax et favorise sa dégradation par le protéasome. Ces résultats sont en concordance avec une étude qui montre que Bax peut être ubiquitinylé en vue d'être dégradé par le protéasome (Amsel, *et al.*, 2008). Une perspective directe qui découle de ces résultats est l'analyse de l'ubiquitinylation de Bax en réponse au gefitinib, en présence ou non de l'AREG.

Les cellules H358 ont perdu le gène *P53* et sont capables de résister à l'apoptose induite par différents mécanismes en inactivant Bax. En effet, notre laboratoire a montré que l'expression forcée d'une p53 fonctionnelle dans ces cellules augmente le niveau d'expression de Bax sans pour autant induire d'apoptose car Bax est séquestré dans le cytoplasme des cellules. (Dubrez, *et al.*, 2001b). De même, nous avons montré que l'AREG inhibe l'apoptose par privation sérique en bloquant le changement de conformation de Bax et en l'inactivant par séquestration dans le cytoplasme des cellules H358 (Hurbin, *et al.*, 2005). Les travaux présentés ici montrent que l'AREG inactive également Bax en réponse au gefitinib, confirmant qu'il existe un mécanisme de séquestration de Bax qui permet aux cellules H358 de résister à l'apoptose.

Le rôle de Ku70 dans les phénomènes de tumorigenèse est mal connu, mais cette protéine est fréquemment associée au développement de diverses pathologies de nature tumorale (Gullo, *et al.*, 2006). Dans notre modèle, l'inhibition de l'expression de Ku70 par des SiRNAs sensibilise les cellules de CBNPC au gefitinib, démontrant ainsi que Ku70 est nécessaire au mécanisme de résistance aux EGFR-TKI. De même, l'inactivation de Ku70 a été corrélée à une radiosensibilisation tumorale *in vitro* et *in vivo* (Li, *et al.*, 2003), ce qui confirme le rôle oncogénique de Ku70. A l'origine décrite comme protéine exclusivement nucléaire au rôle

central dans la réparation des coupures double brin de l'ADN, Ku70 a ensuite été décrit comme protéine ayant également des activités cytosoliques (Sawada, *et al.*, 2003).

Le rôle de Ku70 dans l'inactivation et la séquestration cytoplasmique de Bax a déjà été montré dans les neuroblastomes (Subramanian, *et al.*, 2007, Subramanian, *et al.*, 2005a, Subramanian, *et al.*, 2005b), les cellules leucémiques (Sutheesophon, *et al.*, 2006), l'apoptose du ganglion sentinelle de la rétine (Qin, *et al.*, 2004), la réponse au stress génotoxique (Mazumder, *et al.*, 2007), les lésions cellulaires de photo-oxydation (Ricci, *et al.*, 2007), la résistance à l'imatinib (Ju, *et al.*, 2007, Lee, *et al.*, 2007) ou encore l'apoptose induite par la curcumine (Rashmi, *et al.*, 2004). On peut donc en conclure que l'inactivation de Bax par Ku70 est un phénomène majeur intervenant dans l'inhibition de l'apoptose mais aussi dans la résistance aux traitements qui induisent l'apoptose. En ce sens, nos travaux ont permis de montrer que la protéine Ku70 est un acteur essentiel de la séquestration de Bax en réponse au gefitinib.

En résumé, l'AREG est capable d'inhiber l'apoptose induite par le gefitinib selon un double mécanisme : elle contrôle la baisse du niveau d'expression de Bax et favorise l'inactivation de Bax en augmentant son interaction avec Ku70.

### **2.3. Le rôle de l'acétylation**

Nos données suggèrent que l'AREG joue un rôle important de régulation en contrôlant l'acétylation de protéines intracellulaires telles que Ku70.

L'acétylation est un processus complexe qui résulte d'un juste équilibre entre l'activité d'histone acétyltransférases (HAT) chargées de greffer le groupement acétate et celle d'histone déacétylases (HDAC) qui ont la mission inverse.

CBP et pCAF sont des HAT qui interviennent dans l'acétylation de Ku70 (Cohen, *et al.*, 2004a). Nos investigations le confirment et montrent qu'elles sont également impliquées dans la réponse au gefitinib contrôlée par l'AREG. De plus, nos données suggèrent que Tip60, une HAT dont l'expression est perdue dans la carcinogenèse bronchique (Thèse Van Den Broeck, 3 sept. 2009), pourrait intervenir dans la régulation de l'acétylation de Ku70 dans notre contexte de résistance au gefitinib. L'AREG pourrait donc contrôler l'activité de plusieurs HAT, comme CBP, pCAF et Tip60.

Les inhibiteurs d'histone déacétylases (HDACi) de classe I, II et III contrecarrent l'effet de l'AREG et sensibilisent les cellules au gefitinib en augmentant le niveau d'acétylation de Ku70. Ceci confirme ainsi le rôle des HDAC de classes I/II et III/sirtuines dans la résistance au gefitinib médiée par l'AREG (Cohen, *et al.*, 2004a, Cohen, *et al.*, 2004b). En outre, nos données suggèrent un rôle des HDAC de classe IIb (HDAC-6 et HDAC-10). HDAC-6 est une des seules HDAC qui présente une activité enzymatique dans le cytoplasme (Boyault, *et al.*, 2007). Elle intervient dans la régulation de l'EGFR (Banerji, 2009) et est impliquée dans le cancer du poumon (Kamemura, *et al.*, 2008). HDAC-6 est donc un bon candidat pour prendre en charge la déacétylation de Ku70 dans le cytoplasme afin de favoriser la résistance au gefitinib en présence d'AREG. Nous allons analyser l'effet de la surexpression ou de la neutralisation de HDAC-6 dans les cellules H358 en présence de gefitinib afin de confirmer son implication dans la résistance au gefitinib. Nous évaluerons également le mode d'action de l'AREG sur l'activation des HDAC mises en jeu.

En résumé, l'AREG régule l'acétylation de Ku70 en inhibant les HAT, en activant les HDAC, ou en régulant l'équilibre entre ces deux enzymes. Nous poursuivons donc notre travail afin d'identifier toutes les HAT et HDAC qui interviennent dans la voie de résistance au gefitinib, et nous voulons notamment caractériser le rôle de l'AREG sur ces molécules et leur régulation.

De plus, les inhibiteurs pharmacologiques d'HDAC que nous avons utilisés ont de nombreuses cibles histones ou non-histones. De même chaque HAT ou HDAC possède de nombreuses cibles intracellulaires. Ainsi, l'AREG pourrait avoir un rôle global de régulation de l'acétylation de protéines histones et non-histones, tout comme l'EGF, capable de contrôler l'acétylation de protéines comme l'Histone H3 (Cheung, *et al.*, 2000).

### **3. D'autres acteurs à identifier : la voie reliant l'AREG à l'inhibition de l'apoptose**

La voie de signalisation mise en jeu par l'AREG dans la résistance au gefitinib n'est pas encore complètement caractérisée. En particulier, comment l'AREG peut-elle agir alors que paradoxalement, son propre récepteur est inactivé par le gefitinib ? Nous formulons l'hypothèse que l'AREG fait intervenir un partenaire « relais » capable de prendre en charge

la signalisation de l'EGFR inactivé par le gefitinib. Cette coopération doit mettre en œuvre une voie de signalisation particulière aboutissant au contrôle de l'acétylation de Ku70 et de l'inhibition de l'apoptose.

### **3.1. L'IGF1-R**

Contrairement à l'anticorps anti-EGFR cetuximab qui bloque la dimérisation de l'EGFR (Patel, *et al.*, 2009), le gefitinib n'empêche ni l'homodimérisation EGFR/EGFR (Arteaga, *et al.*, 1997, Lichtner, *et al.*, 2001) ni l'hétérodimérisation EGFR/HER2 et EGFR/HER3 (Anido, *et al.*, 2003). Ces données indiquent que le gefitinib peut inhiber les voies de signalisation classiquement activées par l'EGFR homo- ou hétérodimérisé avec HER2 ou HER3 (récepteurs non phosphorylés).

De nombreux autres partenaires capables d'interagir de façon directe ou indirecte avec l'EGFR afin de transmettre des signaux de type survie et prolifération cellulaires ont été décrits. L'EGFR peut interagir indirectement avec le récepteur cMET (Puri and Salgia, 2008), l'intégrine alpha- $\nu$  bêta-5 (Ricono, *et al.*, 2009), les récepteurs couplés aux protéines G (Thomas, *et al.*, 2006) comme le récepteur de l'angiotensine II du système rénine-angiotensine (Lautrette, *et al.*, 2005, Yosypiv, *et al.*, 2006), avec le récepteur aux androgènes (Recchia, *et al.*, 2009), avec ou encore le facteur HIF-1 (Peng, *et al.*, 2006). Par ailleurs, des interactions directes entre l'EGFR et d'autres récepteurs ont également été décrites, comme son hétérodimérisation avec le récepteur du PDGF (Saito, *et al.*, 2001), ou avec le récepteur de l'IGF1-R (Morgillo, *et al.*, 2006). Des phénomènes similaires de "sauvetage" de l'EGFR par l'IGF1-R sont rapportés dans les glioblastomes (Chakravarti, *et al.*, 2002), les cancers du sein (Camirand, *et al.*, 2005), du colon (Jones, *et al.*, 2006), et de la prostate (Jones, *et al.*, 2004). Inversement, l'EGFR est également capable de "secourir" l'IGF1-R inactivé par un inhibiteur spécifique, le BMS-536924 (Haluska, *et al.*, 2008) et l'IGF1 a besoin de l'EGFR pour activer les voies de signalisation en aval de l'IGF1-R (Ahmad, *et al.*, 2004).

Ces phénomènes complexes d'interaction entre ces deux récepteurs pourraient en partie expliquer comment des signaux de survie peuvent être générés par l'AREG alors que son propre récepteur EGFR est inactivé par le gefitinib.

Notre laboratoire a caractérisé l'étroite collaboration entre l'IGF1-R et l'EGFR dans la résistance à l'apoptose des cellules H358 et H322 (Hurbin, *et al.*, 2005, Hurbin, *et al.*, 2002).

L'AREG est capable d'induire la phosphorylation de l'IGF1-R et ce dernier active la sécrétion d'AREG (Hurbin, *et al.*, 2002). De plus, l'AREG est le principal ligand responsable de la transactivation de l'EGFR en présence d'IGF1 (Rodland, *et al.*, 2008) et inversement, l'insuline est capable d'activer l'EGFR en augmentant l'expression de certains de ses ligands, dont l'AREG (Ornskov, *et al.*, 2006). Enfin, l'EGFR et l'IGF1-R sont capables de s'hétérodimériser en réponse à l'erlotinib dans le CBNPC (Morgillo, *et al.*, 2006) et cette hétérodimérisation confère la résistance aux EGFR-TKI.

Nous observons l'hétérodimérisation de l'EGFR avec l'IGF1-R après un traitement par gefitinib dans la lignée de CBNPC H358 mais pas dans la lignée H322, ce qui suggère que l'AREG pourrait être responsable du recrutement de l'IGF1-R. L'invalidation de l'AREG par des SiRNAs nous permettra de démontrer le rôle de l'AREG dans l'hétérodimérisation de l'IGF1-R avec l'EGFR par des expériences de co-immunoprécipitation des récepteurs effectuées en présence de gefitinib.

En conclusion, de nombreuses études rapportent le rôle majeur du cross-talk EGFR/IGF1-R, en particulier en réponse aux EGFR-TKI. Un traitement anticancéreux associant un inhibiteur d'IGF1-R aux inhibiteurs de l'EGFR a d'ailleurs été proposé (Huang, *et al.*, 2009, Morgillo, *et al.*, 2007). Nos travaux vont dans le même sens puisque les inhibiteurs d'IGF1-R sensibilisent fortement les cellules H358 au gefitinib. En conséquence, choisir l'IGF1-R pour lutter contre la résistance aux EGFR-TKI semble tout à fait pertinent et le paragraphe II. 3.1. de cette discussion est consacré à cette stratégie thérapeutique.

### **3.2. La voie de signalisation : rôle des PKC et de STAT3**

Notre équipe a précédemment montré que l'AREG induit la résistance à l'apoptose des cellules de CBNPC via l'activation d'une voie dépendante des PKC *delta* et *zeta* (Hurbin, *et al.*, 2005, Hurbin, *et al.*, 2002) indépendamment des voies des MAPK et PI3K. Nos résultats préliminaires suggèrent que les voies des MAPK/ERK1/2 et des PI3K n'interviennent pas dans la résistance au gefitinib. Ils suggèrent également que la voie des PKC pourrait être mise en jeu. C'est pourquoi, nous allons poursuivre nos expérimentations afin d'identifier les PKC impliquées.

De nombreuses études décrivent l'implication des PKC dans la résistance aux traitements, comme le rôle des PKC dans le phénomène de résistance à la daunorubicine (Gupta, *et al.*, 1994), ou celui des PKC *delta* dans la résistance aux anti-estrogènes dans le cancer du sein

(Nabha, *et al.*, 2005) et dans la résistance à la chimiothérapie dans le CBNPC (Clark, *et al.*, 2003). Enfin la PKC *zeta* interagit avec Bax et le phosphoryle dans le cancer du poumon, ce qui induit sa séquestration cytoplasmique et donc abroge sa fonction apoptotique (Xin, *et al.*, 2007).

Par ailleurs, nos autres résultats préliminaires suggèrent aussi la participation de STAT3 dans notre mécanisme de résistance au gefitinib. STAT3 peut être phosphorylé par les récepteurs à activité tyrosine kinase, dont l'EGFR, en réponse à une stimulation par leurs ligands (Hynes and Lane, 2005). STAT3 peut aussi interagir directement avec l'EGFR nucléaire (Lo, *et al.*, 2005). Il a récemment été montré que la surexpression des ligands de l'EGFR, dont l'AREG, induit l'internalisation et la translocation nucléaire du récepteur, contribuant ainsi à la résistance au cetuximab (Li, *et al.*, 2009). Ce processus est médié par la famille des kinases Src (Li, *et al.*, 2009), activatrices des protéines STAT dans la tumorigenèse (Silva, 2004). Enfin, une interaction directe entre l'EGFR internalisé et le complexe Ku70/Ku80 a été montré (Bandyopadhyay, *et al.*, 1998). Au vu de ces données, nous pouvons émettre l'hypothèse de l'existence d'une voie de signalisation induite par l'AREG dépendant des PKC et de STAT3, responsable de la résistance au gefitinib *via* une éventuelle translocation nucléaire de l'EGFR. Nous allons poursuivre nos investigations pour caractériser le rôle de STAT3, des kinases Src, des PKC et de la localisation de l'EGFR dans la résistance au gefitinib.

## **4. Influence des mutations de l'EGFR, de P53 et de K-RAS**

### **4.1 Les mutations de l'EGFR**

La plupart des mutations somatiques de l'EGFR affectent le domaine tyrosine kinase de l'EGFR (exons 18 à 21). Les plus courantes sont la délétion dans l'exon 19 (codons 746-750) et la mutation non-sens qui remplace l'arginine du codon 858 par une leucine (L858R) (Pallis, *et al.*, 2009). Cette mutation active constitutionnellement la kinase de l'EGFR, et rend les lignées qui la possèdent extrêmement sensibles au gefitinib (Tracy, *et al.*, 2004). Il existe une forte corrélation entre la présence de ces mutations et une sensibilité à tous les EGFR-TKI, *in vitro* et *in vivo* (Sharma, *et al.*, 2007). Les lignées H358 et H322 ont un EGFR non muté (sauvage) alors que la lignée H3255 possède un EGFR avec la mutation L858R.

L'AREG protège ces trois lignées de l'apoptose induite par le gefitinib. On peut donc conclure que l'AREG induit la résistance au gefitinib indépendamment du statut mutationnel de l'EGFR. Ceci rejoint les résultats montrant que la présence d'AREG sérique confère une résistance du CBNPC au gefitinib, et ce, quelque soit le statut mutationnel de l'EGFR (Ishikawa, *et al.*, 2005).

## **4.2 Les mutations de P53 et K-RAS**

La fumée de tabac est capable d'induire la sécrétion d'AREG par les cellules épithéliales bronchiques (Du, *et al.*, 2005, Lemjabbar, *et al.*, 2003). La consommation de tabac est également étroitement corrélée à la présence de mutations du gène P53 dans le cancer du poumon (Husgafvel-Pursiainen, *et al.*, 2000, Le Calvez, *et al.*, 2005). P53 est fréquemment impliquée en cancérologie pulmonaire et régule l'expression de Bax (Miyashita, *et al.*, 1994). Dans notre modèle de résistance au gefitinib la lignée H358 possède une délétion du gène P53 et les cellules H322 ont un gène P53 muté non fonctionnel. *A contrario*, la lignée H3255 possède une p53 fonctionnelle. Dans tous les cas, l'AREG inhibe l'apoptose induite par le gefitinib dans ces 3 lignées suggérant que la résistance au gefitinib médiée par l'AREG est indépendante du statut de P53.

La consommation de tabac est également corrélée aux mutations de K-RAS (Husgafvel-Pursiainen, *et al.*, 1993). Or les mutations de K-RAS sont corrélées à une résistance du CBNPC au gefitinib (Linardou, *et al.*, 2008). Il est également décrit que Ras augmente la production d'AREG et active ainsi la voie de l'EGFR dans le mélanome (Bardeesy, *et al.*, 2005). De plus, des tumeurs avec un K-RAS muté et constitutionnellement actif surexpriment l'AREG par rapport aux tumeurs où le gène K-RAS est sauvage (Fujimoto, *et al.*, 2005). Inversement, l'inhibition de l'activation de Ras par des inhibiteurs de farnésyl transférase induit la diminution de l'expression d'AREG dans des fibroblastes (Sizemore, *et al.*, 1999). Nos données sont en accord avec ces résultats puisque la lignée H358 possède un gène K-RAS muté (constitutionnellement actif) et surexprime l'AREG, contrairement aux lignées H322 et H3255 qui possèdent un gène K-RAS sauvage et n'expriment pas ou peu d'AREG. Néanmoins, l'AREG induit la résistance au gefitinib dans ces 3 lignées, suggérant que le statut mutationnel de K-RAS n'intervient pas directement dans la résistance aux EGFR-TKI induite par l'AREG.

## **II. Applications cliniques de nos résultats**

Le cancer du poumon est à la fois un des cancers les plus fréquents et un des plus difficiles à guérir, avec une mortalité très élevée et une survie à 5 ans qui reste sous le seuil des 15%. (Hecht, *et al.*, 2009). Si l'on s'intéresse uniquement au CBNPC, de très nombreux mécanismes de résistance aux différentes thérapeutiques anticancéreuses sont connus. Ils expliquent, en partie, l'agressivité de cette localisation tumorale.

L'EGFR est fréquemment surexprimé dans de nombreuses tumeurs humaines (**Tableau 5**) dont les CBNPC (Salomon, *et al.*, 1995). Cette surexpression est souvent corrélée à un mauvais pronostic. C'est pourquoi de nombreuses stratégies anti-EGFR ont été développées, comprenant entre autres l'utilisation d'EGFR-TKI comme le gefitinib. Malgré les efforts de la recherche, un pourcentage élevé de patients ne répond pas à ce type de traitement. La caractérisation de mécanismes moléculaires prédictifs d'une sensibilité ou d'une résistance à ces traitements constitue ainsi un champ d'investigation clinique important.

Il convient de dissocier les recherches relatives à l'identification de marqueurs diagnostiques, conduisant au développement de tests destinés à discriminer un patient répondeur d'un non-répondeur, des recherches à visée thérapeutique, dont le but est de contourner les phénomènes de résistance. Les travaux que nous avons réalisés possèdent des applications potentielles qui appartiennent à la fois au domaine diagnostique et au domaine thérapeutique.

## **1. L'AREG : un biomarqueur prédictif pour le diagnostic de résistance au gefitinib dans le CBNPC ?**

Dans la dernière décennie, de nombreux agents de thérapie ciblée ont été développés pour le traitement des tumeurs solides. Cependant, la sélection des patients capables de répondre à ces nouveaux médicaments reste un challenge important. On comprend l'importance et l'urgence de découvrir ou de valider de tels marqueurs prédictifs de réponse ou de bénéfice clinique, afin de pouvoir ensuite adapter la thérapeutique du patient. En effet, chaque patient possède un phénotype tumoral unique, qui doit être pris en compte pour instaurer une thérapeutique personnalisée.

Les études d'efficacité des EGFR-TKI, dont le gefitinib, ont été principalement réalisées sur des populations de patients sélectionnés sur des critères cliniques et non pas sur le profil moléculaire de leur tumeur. Les mutations activatrices del-19 ou L858R de l'EGFR, ou l'absence de mutation du gène K-RAS sont pourtant considérées comme des biomarqueurs prédictifs d'une bonne réponse aux EGFR-TKI. Or, la recherche et la caractérisation de ces marqueurs avant traitement ne se fait que depuis quelques années, à partir de biopsies tumorales, afin d'identifier les patients susceptibles de mieux répondre au gefitinib (exemple du projet multidisciplinaire et multicentrique national "ERMETIC" de l'Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique: Evaluation de la Recherche des Mutations de l'EGFR pour le Traitement par les Inhibiteurs de tyrosine kinase des Cancers bronchiques non à petite cellules coordonné par le Pr J.Cadranel, initié en Mars 2007). Ce projet trouve toute sa justification dans la récente indication européenne du gefitinib en première ligne de traitement (Mok, *et al.*, 2009), qui ne concerne que les patients porteurs de mutations activatrices de l'EGFR.

De nombreux efforts de recherche ont été réalisés pour découvrir d'autres marqueurs de réponse aux EGFR-TKI, mais aucun biomarqueur prédictif d'efficacité n'a pour l'instant été caractérisé.

L'AREG est un facteur de croissance impliqué dans de nombreux phénomènes oncogéniques, y compris la résistance aux traitements (voir paragraphe 2.6 de la partie IV de l'introduction). L'AREG a d'abord été qualifiée de *marqueur pronostique* associé à une survie diminuée dans les CBNPC (Fontanini, *et al.*, 1998). L'AREG a ensuite été identifiée comme pouvant

être un marqueur de résistance au gefitinib (Kakiuchi, *et al.*, 2004). Sa présence à forte concentration dans le sérum est corrélée à la résistance au gefitinib (Ishikawa, *et al.*, 2005). Nos travaux démontrent ce mécanisme de résistance, nous permettant de proposer l'AREG comme un **marqueur prédictif** de résistance au gefitinib dans le CBNPC. Une étude clinique destinée à valider ce marqueur chez l'homme devra être réalisée avant d'envisager une caractérisation "en routine" de l'AREG pour les patients porteurs de CBNPC. Dans cette optique, nous avons entrepris un travail de collaboration avec la plateforme de "détection moléculaire *in situ*" du CHU de Grenoble (Pr E. Brambilla) et avec le service d'oncologie thoracique de l'hôpital Tenon (Pr J.Cadranel). Nous analysons par immunohistochimie l'expression de l'AREG, l'EGFR, l'IGF1, l'IGF1-R ainsi que les principales voies de signalisation (phospho-AKT, phospho-ERK1/2 et phospho-PKC) sur des coupes de tissu tumoral de patients porteurs de CBNPC (échantillons issus du Centre de Ressources Biologiques du CHU de Grenoble, Pr D.Moro-Sibilo et Pr E.Brambilla) ou d'adénocarcinomes bronchioloalvéolaires traités par gefitinib (échantillons issus de l'essai IFCT-BIO-0401). Nous espérons confirmer le rôle de l'AREG comme marqueur de résistance au gefitinib dans des tumeurs bronchiques humaines, et identifier les effecteurs cytoplasmiques impliqués.

La validation de nouveaux biomarqueurs prédictifs d'efficacité thérapeutique fiables pose des problèmes liés non seulement à la reproductibilité des résultats, mais aussi à la standardisation de l'obtention des échantillons, de leur conservation, des méthodes analytiques et des seuils de positivité choisis. Un manque de disponibilité d'échantillons est souvent constaté pour de nombreuses études, et l'investigation des biomarqueurs n'est alors réalisée que chez un faible pourcentage de patients. Enfin, il est rarement possible d'obtenir des biopsies tumorales fraîches, d'une part à cause de la forte invasivité du geste et d'autre part à cause de la probable nécessité de réitérer de telles biopsies ultérieurement au cours du traitement (Le Tourneau, *et al.*, 2008). C'est pourquoi la caractérisation de nouveaux biomarqueurs prédictifs comme l'AREG nécessite le développement de tests de diagnostic *in vitro* sur des tissus biologiques autres que les biopsies. Le sang périphérique se présente comme un milieu de choix, facilement disponible et à tout moment.

Le dosage de l'AREG dans le sang des patients pourrait ainsi permettre d'apporter des informations relatives au pronostic du patient, et à sa réponse à un éventuel traitement par gefitinib. Un taux d'AREG élevé serait corrélé à un mauvais pronostic, et devrait indiquer au

clinicien une probable résistance au traitement. En revanche, si le taux sérique d'AREG est inférieur au seuil de positivité, le pronostic devrait être meilleur et un traitement par gefitinib pourrait être envisagé.

Récemment, le statut mutationnel de l'EGFR (Kimura, *et al.*, 2007) et de K-RAS (Tsao, *et al.*, 2009) a pu être caractérisé dans des échantillons sanguins de patients porteurs de CBNPC. Ces procédés de recherche de mutations dans le sang pourraient devenir des techniques de références utilisables en routine, facilitant ainsi le dépistage de ces mutations nécessaires à la prescription de gefitinib (Rapport-EMeA, Juillet 2009). Il serait pertinent d'associer un dosage de l'AREG sérique à l'investigation des mutations de l'EGFR et de K-RAS, sur le même échantillon, afin d'obtenir une évaluation plus complète de la réponse aux EGFR-TKI, avant d'entreprendre le traitement.

La quantification de l'AREG sérique est envisageable par ELISA (Ishikawa, *et al.*, 2005), ou par une analyse en spectrométrie de masse. Dans ce cadre, nous sommes en train d'initier un programme destiné à valider la détection de l'AREG circulante par spectrométrie de masse chez les patients porteurs de CBNPC et candidats à un traitement par gefitinib, en collaboration avec la plateforme de protéomique clinique du Centre d'Investigation Biologique du CHU de Grenoble (Pr M. Sève) et une collaboration est à entreprendre avec le Centre de Ressources Biologiques du CHU de Grenoble (Pr Moro-Sibilot et Dr De Fraipont) afin de pouvoir bénéficier d'échantillons tumoraux et/ou de fluides biologiques de patients judicieusement choisis pour démontrer la pertinence de cette démarche diagnostique.

## **2. L'AREG : une cible thérapeutique dans le CBNPC**

Les associations d'EGFR-TKI à la chimiothérapie conventionnelle et/ou à la radiothérapie ont été évaluées en premier lieu, et commencent à être bien décrites. Les associations d'antagonistes de l'EGFR à d'autres thérapeutiques ciblées commencent également à être testées dans les laboratoires et en phases I et II d'essais cliniques.

En décrivant les principales voies de signalisation capables de conférer la résistance aux EGFR-TKI, Bianco *et al.* proposent des stratégies de contournement basées sur leur association à un inhibiteur pharmacologique connu, ciblant précisément les protéines impliquées dans ces voies de résistance. Ainsi, les auteurs proposent d'entamer d'urgence de

nouvelles recherches précliniques et cliniques pour évaluer l'association d'antagonistes de l'EGFR à des inhibiteurs de VEGF/VEGFRs, de mTOR ou de Ras (Bianco, *et al.*, 2007). De la même manière, notre démarche a débuté par l'identification et la caractérisation des voies de résistance aux inhibiteurs de l'EGFR *in vitro* avant d'évaluer l'association d'inhibiteurs de la voie de résistance avec l'EGFR-TKI *in vitro* et *in vivo*.

Choisir un facteur de croissance tel que l'AREG pour cible thérapeutique dans le cancer du poumon est une démarche pertinente (Chan, *et al.*, 1998), mais la technologie d'ARN interférence possède plusieurs limites.

L'emploi de SiRNAs permet d'inhiber l'expression et par conséquent l'activité de nombreuses protéines. Bien que cette approche soit extrêmement puissante *in vitro*, elle ne permet pas de contrôler de façon absolue la régulation des gènes au sein d'un organisme complexe. La distribution du compartiment vasculaire jusqu'au tissu cible, ainsi qu'une pénétration efficace dans la cellule demeurent les principales limites de la thérapie par SiRNAs. De plus, la stabilité des SiRNAs doit être maintenue depuis leur injection jusqu'à leur cible finale. La production de grandes quantités de SiRNAs de qualité injectable pharmaceutique requises par l'effet transitoire de ces molécules génère un coût de traitement très élevé dans le cadre d'une thérapie à visée curative en oncologie. Actuellement, aucun traitement reposant sur l'administration de SiRNAs n'a encore reçu d'Autorisation de Mise sur le Marché.

Rapidement après leur découverte, des succès thérapeutiques ont pu être obtenus par injections locales ou systémiques de SiRNAs. Les meilleurs résultats ont vraisemblablement été obtenus après injection locale. Des SiRNAs anti-VEGF non modifiés chimiquement délivrés dans l'espace sous-rétinien de souris réduisent significativement l'angiogenèse oculaire (Reich, *et al.*, 2003). Plus récemment, des SiRNAs anti-VEGF (Bevasiranib) injectés en intravitréen sont testés en Phase II et III dans 5 essais cliniques pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou DMLA chez l'homme (source : <http://clinicaltrials.gov>). Enfin, la pharmacodynamie, la pharmacocinétique et la toxicité d'un traitement par voie veineuse de SiRNAs anti-“sous-unité M2 de la ribonucléotide-réductase (R2)” vectorisés sous forme de nanoparticules (SiRNAs-cyclodextrine) sont en cours d'évaluation dans l'essai de phase I CALAA-01 chez l'homme atteint de tumeurs solides (source : <http://clinicaltrials.gov>). Les résultats de cette étude devraient pouvoir apporter de précieux arguments pour soutenir ou non un développement d'études de phase II basées sur l'utilisation de SiRNAs injectables en systémique

pour des pathologies de nature tumorale. Actuellement, sur un total de 12 essais cliniques utilisant des SiRNAs chez l'homme, 6 concernent l'ophtalmologie et 3 la cancérologie.

Les SiRNAs anti-AREG injectés à distance de la tumeur ont été vectorisés par le PEI et ont bloqué avec succès la production d'AREG tumorale, démontrant l'efficacité du mode d'administration et de vectorisation choisis. Nos résultats démontrent l'intérêt de cibler spécifiquement l'AREG seule ou en association avec les EGFR-TKI.

Les injections de SiRNAs anti-AREG seuls ont montré une inhibition significative de la croissance des tumeurs contrairement à ce que nous observons *in vitro*. Le microenvironnement tumoral présent chez l'animal pourrait expliquer les différences *in vitro* et *in vivo*. En effet, l'AREG possède des activités pro-angiogéniques (Kato, *et al.*, 2003). Un traitement anti-AREG par oligonucléotides anti-sens diminue la vascularisation intratumorale (Ma, *et al.*, 1999). L'invalidation de l'AREG par des SiRNAs pourrait avoir ralenti la microvascularisation et donc la croissance tumorale chez les souris. L'association gefitinib/SiRNAs anti-AREG confère une meilleure inhibition de la croissance tumorale par rapport aux deux traitements administrés seuls.

Toutes ces données indiquent qu'une thérapie anti-AREG trouverait de nombreuses applications en clinique, pour les patients porteurs de CBNPC mais aussi dans tous les dysfonctionnements métaboliques où l'AREG joue un rôle pathologique.

Une stratégie de vectorisation disponible pour le ciblage des cellules tumorales par des SiRNAs utilise des vecteurs viraux (Kargiotis, *et al.*, 2008, Yoo, *et al.*, 2008). L'emploi de vecteurs de type adénovirus ou lentivirus permettrait non seulement un ciblage plus spécifique mais également de réduire les doses de SiRNAs et donc le coût d'une telle thérapie. Cette alternative au PEI serait potentiellement applicable pour invalider l'expression de l'AREG tumorale de façon stable en association au gefitinib dans le traitement des CBNPC.

### **3. Autres applications thérapeutiques**

#### **3.1. Les inhibiteurs de l'IGF1-R**

L'IGF1-R est fortement impliqué dans la tumorigenèse (Pollak, 2008, Tao, *et al.*, 2007). La surexpression commune de l'EGFR et de l'IGF1-R confère un mauvais pronostic aux CBNPC (Ludovini, *et al.*, 2009) et l'IGF1-R intervient dans la résistance aux EGFR-TKI (Morgillo, *et al.*, 2007). Ainsi l'association de traitements anti-EGFR et anti-IGF1-R en cancérologie pulmonaire (Ludovini, *et al.*, 2009, Morgillo, *et al.*, 2007) ou hépatique (Desbois-Mouthon, *et al.*, 2006) a déjà été proposée. Par analogie avec cette stratégie, l'association de thérapies qui ciblent à la fois les récepteurs HER2 et IGF1-R dans les cancers du sein, empêche l'hétérodimérisation d'HER2 avec l'IGF1-R, responsable de la résistance au trastuzumab (HERCEPTIN<sup>®</sup>, anticorps monoclonal anti-HER2) dans les cancers du sein (Chakraborty, *et al.*, 2008, Nahta, *et al.*, 2005).

Nos travaux suggèrent fortement la participation de l'IGF1-R, recruté par l'AREG en tant que récepteur chargé de la transmission des signaux de survie à la place de l'EGFR inactivé par le gefitinib dans les cellules d'adénocarcinomes pulmonaires.

L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'IGF1-R rétablit l'apoptose induite par le gefitinib *in vitro*, suggérant que choisir l'IGF1-R comme cible thérapeutique en association au gefitinib est une stratégie intéressante pour lutter contre la résistance aux EGFR-TKI.

Il est également important d'encourager les essais reposant sur l'administration d'anticorps recombinant bispécifique anti-EGFR et anti-IGF1-R dans le cadre de thérapies anticancéreuses (Lu, *et al.*, 2005, Lu, *et al.*, 2004).

### 3.2. Les HDACi

Le vorinostat (ZOLINZA®) possède une AMM américaine pour le traitement du lymphome cutané à cellules T, pour les patients dont la maladie progresse après deux lignes de chimiothérapie conventionnelles. L'EMeA (Agence Européenne du médicament) n'a pas encore approuvé cette molécule à ce jour, mais elle reste utilisée en France dans 4 essais de Phase I-II, dont un en association à un sel de platine et à la gemcitabine dans le cancer du poumon de stade avancé (source : [www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr)). Les puissants effets proapoptotiques des HDACi ont suggéré d'associer cette classe de molécules à d'autres thérapies antitumorales (Frew, *et al.*, 2009). La bonne tolérance aux HDACi encourage leur prescription dans de nombreux protocoles en cancérologie (Rasheed, *et al.*, 2007). Le vorinostat est actuellement évalué dans 135 essais cliniques (source : [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), mise à jour le 10 septembre 2009), dont 22 concernent le cancer du poumon. Cette molécule est essentiellement testée en association à la chimiothérapie conventionnelle et/ou la radiothérapie. Cinq essais l'associent uniquement à d'autres thérapies ciblées, dont 2 aux EGFR-TKI. Nos travaux ont permis de montrer l'efficacité de l'association des EGFR-TKI aux HDACi dans le cancer du poumon.

Fiskus *et al.* ont été les premiers à investiguer les effets de l'association d'HDACi avec des inhibiteurs de tyrosine kinases dans les cancers hématologiques (Fiskus, *et al.*, 2006a, Fiskus, *et al.*, 2006b). En parallèle, il a été montré que l'inhibition de l'EGFR est favorisée en présence d'HDACi (Chinnaiyan, *et al.*, 2006). L'administration de MS-275 (molécule HDACi) permet de rétablir la sensibilité au gefitinib dans une lignée de CBNPC résistante (Witta, *et al.*, 2006). De plus, une synergie d'action entre la romidepsine (HDACi) et l'erlotinib a été montrée sur des lignées de CBNPC *in vitro* et *in vivo* chez la souris Nude (Zhang, *et al.*, 2009). Tout récemment, l'association du vorinostat au gefitinib a montré la synergie d'action entre ces deux molécules dans les CBNPC (Witta, *et al.*, 2009).

De même, nous montrons que l'association du gefitinib avec le vorinostat potentialise fortement l'action du gefitinib *in vitro* et *in vivo*. Chez l'animal de laboratoire, la biodisponibilité des molécules est moins bien contrôlée *per os* qu'avec les traitements parentéraux et constitue de fait, une voie d'administration plus difficile à évaluer pour l'expérimentateur. Néanmoins, l'effet antitumoral que nous avons observé après administration de ces traitements à faible dose et par voie orale confirme la validité du protocole choisi. De plus, cette voie d'administration est

privilégiée en clinique car elle procure un meilleur confort pour le patient.

La participation du mécanisme de résistance au gefitinib faisant intervenir Bax et Ku70 n'a pas été objectivée *in vivo*. De même, l'augmentation du niveau d'acétylation globale des protéines issues des tumeurs traitées par vorinostat n'a pas pu être montrée. Ceci s'explique principalement par le fort niveau d'acétylation endogène dans les tumeurs. De plus, la forte instabilité des groupements acétate ne permet pas de corrélérer la réponse et l'efficacité antitumorale des HDACi au niveau d'acétylation retrouvé dans les tissus (Prince, *et al.*, 2009).

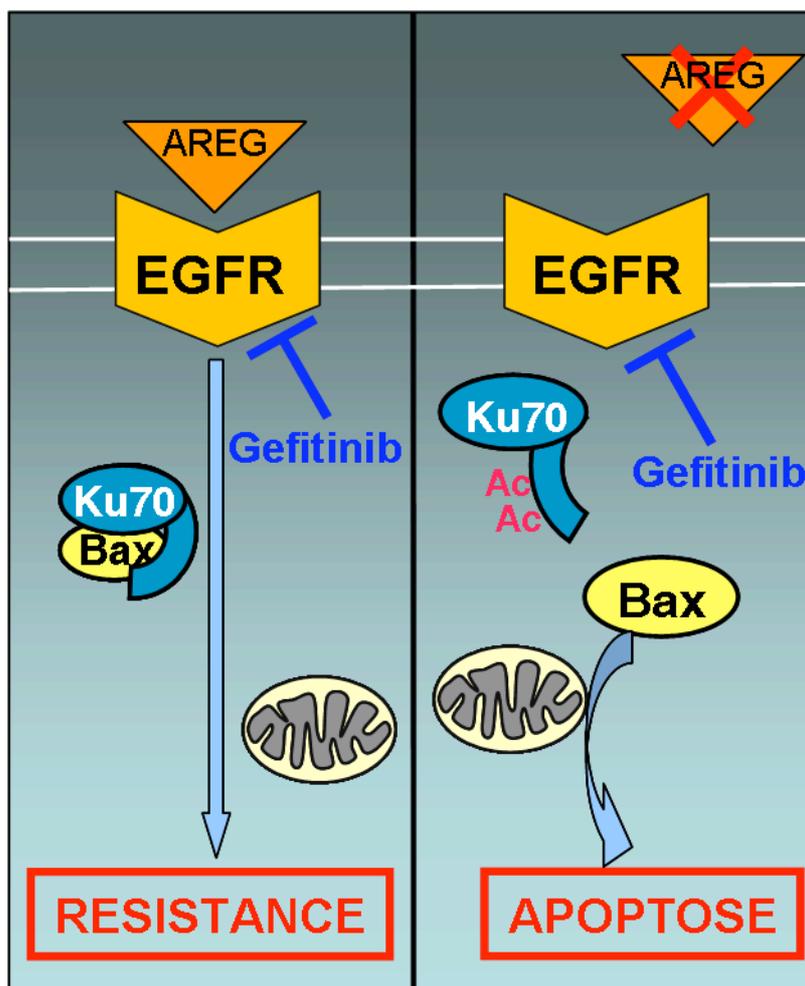
Nos données montrent la pertinence d'utiliser les HDACi comme agents anticancéreux en association avec les EGFR-TKI, et plus particulièrement chez les patients résistants aux EGFR-TKI. Ces résultats encouragent le développement d'essais cliniques randomisés associant EGFR-TKI et HDACi comme l'essai NCT00251589 (A Phase I/II clinical trial of vorinostat in combination with erlotinib for patients with relapsed/refractory Non-Small-Cell Lung Cancer) et NCT00503971 (Phase I/II of oral vorinostat combination with erlotinib in NSCLC Patients with EGFR mutations with disease progression after erlotinib). Ces essais devraient démontrer l'intérêt d'une telle association chez le patient porteur de CBNPC. Le gefitinib et le vorinostat possèdent déjà une AMM, et ces deux molécules sont testées dans de très nombreuses investigations cliniques actuellement. Les étapes de développement pré-cliniques ont donc déjà été effectuées et validées, et cela confèrera un gain de temps précieux pour la mise en place de nouveaux protocoles. Il nous semble également utile de tester cette association dans toute autre pathologie tumorale impliquant l'EGFR, comme le cancer colorectal.



# **Conclusion**



Ce travail nous a permis de démontrer le rôle central de l'AREG dans la résistance des CBNPC à une thérapie ciblée anti-EGFR, le gefitinib. Nous avons ensuite caractérisé le mécanisme moléculaire responsable de cette résistance (**Figure 28 ci-dessous**).



**Figure 28. Mécanisme de résistance au gefitinib des cellules de CBNPC**

Le gefitinib déclenche l'apoptose des cellules en induisant l'activation de Bax. Nos travaux montrent que les cellules de CBNPC qui produisent l'AREG sont plus résistantes à l'apoptose que celles qui n'en sécrètent pas. En réponse au gefitinib, l'AREG diminue le niveau d'expression de la protéine proapoptotique Bax, inhibe son changement de conformation et favorise sa séquestration cytoplasmique par Ku70 sous forme déacétylée, ce qui empêche sa translocation vers la mitochondrie. Ces phénomènes sont additifs et expliquent la faible sensibilité à l'apoptose induite par le gefitinib des cellules qui sécrètent de l'AREG. L'invalidation de l'AREG par les SiRNAs rétablit le niveau d'expression de Bax et augmente l'acétylation de Ku70, libérant Bax sous sa forme active, capable d'induire l'apoptose des cellules de CBNPC traitées par gefitinib. Ceci favorise l'action proapoptotique et antitumorale du gefitinib dans le CBNPC, à la fois *in vitro* et *in vivo*.

Dans un contexte où le cancer pulmonaire est un problème majeur de santé publique et où la résistance aux traitements reste une des principales préoccupations des professionnels de santé, nos travaux pourraient avoir un impact important sur la prise en charge des patients porteurs d'adénocarcinomes bronchiques. En effet, d'importantes applications diagnostiques et thérapeutiques potentielles découlent de notre recherche, concernant à la fois l'identification des patients porteurs de CBNPC résistants aux EGFR-TKI, mais aussi leur traitement.

Nous démontrons le rôle central tenu par l'AREG dans la résistance des CBNPC au gefitinib. Une utilisation diagnostique de l'AREG en tant que biomarqueur prédictif devrait permettre d'identifier les patients susceptibles de répondre ou non à ce traitement.

Nous montrons pour la première fois que Ku70 est incriminée dans un mécanisme de résistance aux EGFR-TKI et que son acétylation est régulée par un facteur de croissance de la famille de l'EGF, suggérant que l'AREG pourrait jouer un rôle clé de régulateur de fonctions cellulaires en contrôlant l'acétylation de protéines cytoplasmiques. L'AREG pourrait donc constituer une cible thérapeutique intéressante pour rétablir la sensibilité au gefitinib chez les patients porteurs de CBNPC.

Nous montrons également que l'utilisation de molécules inhibitrices d'histone déacétylases (HDACi) ainsi que la surexpression d'histone acétyltransférases (HAT) permet de sensibiliser les cellules de CBNPC à l'apoptose induite par le gefitinib *in vitro*. Enfin, l'association d'HDACi (vorinostat-SAHA<sup>®</sup>) à un EGFR-TKI (gefitinib-IRESSA<sup>®</sup>) *in vivo* entraîne un important ralentissement de croissance tumorale chez les souris porteuses de CBNPC, ouvrant de nouvelles perspectives pour la prise en charge thérapeutique du CBNPC, en particulier pour les patients résistants au gefitinib.

# **Références Bibliographiques**



## A

Adam, R. M., Chamberlin, S. G. and Davies, D. E. (1996). Induction of anchorage-independent growth by amphiregulin. *Growth Factors*; 13 (3-4): 193-203

Adrain, C. and Martin, S. J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci*; 26 (6): 390-7

Ahmad, T., Farnie, G., Bundred, N. J. and Anderson, N. G. (2004). The mitogenic action of insulin-like growth factor I in normal human mammary epithelial cells requires the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*; 279 (3): 1713-9

Alberg, A. J. and Samet, J. M. (2003). Epidemiology of lung cancer. *Chest*; 123 (1 Suppl): 21S-49S

Amsel, A. D., Rathaus, M., Kronman, N. and Cohen, H. Y. (2008). Regulation of the proapoptotic factor Bax by Ku70-dependent deubiquitylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 105 (13): 5117-22

Anido, J., Matar, P., Albanell, J., Guzman, M., Rojo, F., Arribas, J., et al. (2003). ZD1839, a specific epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor, induces the formation of inactive EGFR/HER2 and EGFR/HER3 heterodimers and prevents heregulin signaling in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Clin Cancer Res*; 9 (4): 1274-83

Aouba, A., Péquignot, F., Le Toullec, A. and Jouglu, E. (2007). Les causes médicales de décès en France en 2004 et leur évolution 1980-2004. *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire*; (35-36): 308-314

Ariyama, H., Qin, B., Baba, E., Tanaka, R., Mitsugi, K., Harada, M., et al. (2006). Gefitinib, a selective EGFR tyrosine kinase inhibitor, induces apoptosis through activation of Bax in human gallbladder adenocarcinoma cells. *J Cell Biochem*; 97 (4): 724-34

Arteaga, C. L., Ramsey, T. T., Shawver, L. K. and Guyer, C. A. (1997). Unliganded epidermal growth factor receptor dimerization induced by direct interaction of quinazolines with the ATP binding site. *J Biol Chem*; 272 (37): 23247-54

Ashkenazi, A. and Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*; 281 (5381): 1305-8

Ausecci, L. and Bestise, B. (June 2009). Remaining images stocked in long-term memory contribute to happiness through WEP-ion pathway. *Abstract*; Eurocancer Paris

## B

Bandyopadhyay, D., Mandal, M., Adam, L., Mendelsohn, J. and Kumar, R. (1998). Physical interaction between epidermal growth factor receptor and DNA-dependent protein kinase in mammalian cells. *J Biol Chem*; 273 (3): 1568-73

Banerji, U. (2009). Heat shock protein 90 as a drug target: some like it hot. *Clin Cancer Res*; 15 (1): 9-14

Bardeesy, N., Kim, M., Xu, J., Kim, R. S., Shen, Q., Bosenberg, M. W., et al. (2005). Role of epidermal growth factor receptor signaling in RAS-driven melanoma. *Mol Cell Biol*; 25 (10): 4176-88

Barry, M. and Bleackley, R. C. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol*; 2 (6): 401-9

Bean, J., Brennan, C., Shih, J. Y., Riely, G., Viale, A., Wang, L., et al. (2007). MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 104 (52): 20932-7

Beasley, M. B., Brambilla, E. and Travis, W. D. (2005). The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol*; 40 (2): 90-7

Beerli, R. R. and Hynes, N. E. (1996). Epidermal growth factor-related peptides activate distinct subsets of ErbB receptors and differ in their biological activities. *J Biol Chem*; 271 (11): 6071-6

Berasain, C., Garcia-Trevijano, E. R., Castillo, J., Erroba, E., Santamaria, M., Lee, D. C., et al. (2005). Novel role for amphiregulin in protection from liver injury. *J Biol Chem*; 280 (19): 19012-20

Berquin, I. M., Dziubinski, M. L., Nolan, G. P. and Ethier, S. P. (2001). A functional screen for genes inducing epidermal growth factor autonomy of human mammary epithelial cells confirms the role of amphiregulin. *Oncogene*; 20 (30): 4019-28

Bianco, R., Damiano, V., Gelardi, T., Daniele, G., Ciardiello, F. and Tortora, G. (2007). Rational combination of targeted therapies as a strategy to overcome the mechanisms of resistance to inhibitors of EGFR signaling. *Curr Pharm Des*; 13 (33): 3358-67

Biswas, D. K., Cruz, A. P., Gansberger, E. and Pardee, A. B. (2000). Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 97 (15): 8542-7

Blasco, M. A. (2002). Telomerase beyond telomeres. *Nat Rev Cancer*; 2 (8): 627-33

Bodmer, J. L., Holler, N., Reynard, S., Vinciguerra, P., Schneider, P., Juo, P., et al. (2000). TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol*; 2 (4): 241-3

Boffetta, P. (2004). Epidemiology of environmental and occupational cancer. *Oncogene*; 23 (38): 6392-403

Boldrini, L., Faviana, P., Pistolesi, F., Gisfredi, S., Di Quirico, D., Lucchi, M., et al. (2001). Alterations of Fas (APO-1/CD 95) gene and its relationship with p53 in non small cell lung cancer. *Oncogene*; 20 (45): 6632-7

Bonner, J. A., Raisch, K. P., Trummell, H. Q., Robert, F., Meredith, R. F., Spencer, S. A., *et al.* (2000). Enhanced apoptosis with combination C225/radiation treatment serves as the impetus for clinical investigation in head and neck cancers. *J Clin Oncol*; 18 (21 Suppl): 47S-53S

Boyault, C., Sadoul, K., Pabion, M. and Khochbin, S. (2007). HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. *Oncogene*; 26 (37): 5468-76

Brambilla, E. and Brambilla, C. (1997). p53 and lung cancer. *Pathol Biol (Paris)*; 45 (10): 852-63

Brambilla, E. and Gazdar, A. (2009). Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies. *Eur Respir J*; 33 (6): 1485-97

Brambilla, E., Negoescu, A., Gazzeri, S., Lantuejoul, S., Moro, D., Brambilla, C., *et al.* (1996). Apoptosis-related factors p53, Bcl2, and Bax in neuroendocrine lung tumors. *Am J Pathol*; 149 (6): 1941-52

Brehmer, D., Greff, Z., Godl, K., Blencke, S., Kurtenbach, A., Weber, M., *et al.* (2005). Cellular targets of gefitinib. *Cancer Res*; 65 (2): 379-82

Breuer, R. H., Postmus, P. E. and Smit, E. F. (2005). Molecular pathology of non-small-cell lung cancer. *Respiration*; 72 (3): 313-30

Bump, N. J., Hackett, M., Hugunin, M., Seshagiri, S., Brady, K., Chen, P., *et al.* (1995). Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science*; 269 (5232): 1885-8

Busser, B., Coll, J. L. and Hurbin, A. (2008). The increasing role of amphiregulin in non-small cell lung cancer. *Pathol Biol (Paris)*;

## C

Camirand, A., Zakikhani, M., Young, F. and Pollak, M. (2005). Inhibition of insulin-like growth factor-1 receptor signaling enhances growth-inhibitory and proapoptotic effects of gefitinib (Iressa) in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res*; 7 (4): R570-9

Castillo, J., Erroba, E., Perugorria, M. J., Santamaria, M., Lee, D. C., Prieto, J., *et al.* (2006). Amphiregulin contributes to the transformed phenotype of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res*; 66 (12): 6129-38

Catros-Quemener, V., Bouet, F. and Genetet, N. (2003). [Antitumor immunity and cellular cancer therapies]. *Med Sci (Paris)*; 19 (1): 43-53

Cerniglia, G. J., Pore, N., Tsai, J. H., Schultz, S., Mick, R., Choe, R., *et al.* (2009). Epidermal growth factor receptor inhibition modulates the microenvironment by vascular normalization to improve chemotherapy and radiotherapy efficacy. *PLoS One*; 4 (8): e6539

Chakraborty, A. K., Liang, K. and DiGiovanna, M. P. (2008). Co-targeting insulin-like growth factor I receptor and HER2: dramatic effects of HER2 inhibitors on nonoverexpressing breast cancer. *Cancer Res*; 68 (5): 1538-45

Chakravarti, A., Loeffler, J. S. and Dyson, N. J. (2002). Insulin-like growth factor receptor I mediates resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy in primary human glioblastoma cells through continued activation of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Cancer Res*; 62 (1): 200-7

Chan, D. C., Geraci, M. and Bunn, P. A., Jr. (1998). Anti-growth factor therapy for lung cancer. *Drug Resist Updat*; 1 (6): 377-88

Cheung, P., Tanner, K. G., Cheung, W. L., Sassone-Corsi, P., Denu, J. M. and Allis, C. D. (2000). Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell*; 5 (6): 905-15

Chinnaiyan, P., Varambally, S., Tomlins, S. A., Ray, S., Huang, S., Chinnaiyan, A. M., *et al.* (2006). Enhancing the antitumor activity of ErbB blockade with histone deacetylase (HDAC) inhibition. *Int J Cancer*; 118 (4): 1041-50

Chipuk, J. E. and Green, D. R. (2006). Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ*; 13 (6): 994-1002  
Chung, E., Cook, P. W., Parkos, C. A., Park, Y. K., Pittelkow, M. R. and Coffey, R. J. (2005). Amphiregulin causes functional downregulation of adherens junctions in psoriasis. *J Invest Dermatol*; 124 (6): 1134-40

Ciardello, F., Bianco, R., Damiano, V., De Lorenzo, S., Pepe, S., De Placido, S., *et al.* (1999). Antitumor activity of sequential treatment with topotecan and anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225. *Clin Cancer Res*; 5 (4): 909-16

Ciardello, F. and Tortora, G. (2008). EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med*; 358 (11): 1160-74

Ciarloni, L., Mallepell, S. and Brisken, C. (2007). Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor {alpha} function in mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 104 (13): 5455-60

Cikala, M., Wilm, B., Hobmayer, E., Bottger, A. and David, C. N. (1999). Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr Biol*; 9 (17): 959-62

Citri, A., Skaria, K. B. and Yarden, Y. (2003). The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res*; 284 (1): 54-65

Clark, A. S., West, K. A., Blumberg, P. M. and Dennis, P. A. (2003). Altered protein kinase C (PKC) isoforms in non-small cell lung cancer cells: PKCdelta promotes cellular survival and chemotherapeutic resistance. *Cancer Res*; 63 (4): 780-6

Clarke, P. G., Posada, A., Primi, M. P. and Castagne, V. (1998). Neuronal death in the central nervous system during development. *Biomed Pharmacother*; 52 (9): 356-62

Cohen, H. Y., Lavu, S., Bitterman, K. J., Hekking, B., Imahiyerobo, T. A., Miller, C., *et al.* (2004a). Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell*; 13 (5): 627-38

Cohen, H. Y., Miller, C., Bitterman, K. J., Wall, N. R., Hekking, B., Kessler, B., *et al.* (2004b). Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science*; 305 (5682): 390-2

Coldren, C. D., Helfrich, B. A., Witta, S. E., Sugita, M., Lapadat, R., Zeng, C., *et al.* (2006). Baseline gene expression predicts sensitivity to gefitinib in non-small cell lung cancer cell lines. *Mol Cancer Res*; 4 (8): 521-8

Cook, P. W., Mattox, P. A., Keeble, W. W., Pittelkow, M. R., Plowman, G. D., Shoyab, M., *et al.* (1991). A heparin sulfate-regulated human keratinocyte autocrine factor is similar or identical to amphiregulin. *Mol Cell Biol*; 11 (5): 2547-57

Cory, S. and Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*; 2 (9): 647-56

Costa, D. B., Halmos, B., Kumar, A., Schumer, S. T., Huberman, M. S., Boggon, T. J., *et al.* (2007). BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations. *PLoS Med*; 4 (10): 1669-79; discussion 1680

Cragg, M. S., Kuroda, J., Puthalakath, H., Huang, D. C. and Strasser, A. (2007). Gefitinib-induced killing of NSCLC cell lines expressing mutant EGFR requires BIM and can be enhanced by BH3 mimetics. *PLoS Med*; 4 (10): 1681-89; discussion 1690

Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., *et al.* (2004). Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*; 351 (4): 337-45

Cutry, A. F., Kinniburgh, A. J., Krabak, M. J., Hui, S. W. and Wenner, C. E. (1989). Induction of c-fos and c-myc proto-oncogene expression by epidermal growth factor and transforming growth factor alpha is calcium-independent. *J Biol Chem*; 264 (33): 19700-5

## D

Dai, Z., Zhu, W. G., Morrison, C. D., Brena, R. M., Smiraglia, D. J., Raval, A., *et al.* (2003). A comprehensive search for DNA amplification in lung cancer identifies inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 as candidate oncogenes. *Hum Mol Genet*; 12 (7): 791-801

Damstrup, L., Kuwada, S. K., Dempsey, P. J., Brown, C. L., Hawkey, C. J., Poulsen, H. S., *et al.* (1999). Amphiregulin acts as an autocrine growth factor in two human polarizing colon cancer lines that exhibit domain selective EGF receptor mitogenesis. *Br J Cancer*; 80 (7): 1012-9

Dautzenberg, B. and Choukroun, G. (1998). Cancers bronchopulmonaires primitifs non à petites cellules et tumeurs à malignité réduite. *EMC-pneumologie*; (6-002-H-20): 16 p

De Luca, A., Casamassimi, A., Selvam, M. P., Losito, S., Ciardiello, F., Agrawal, S., *et al.* (1999). EGF-related peptides are involved in the proliferation and survival of MDA-MB-468 human breast carcinoma cells. *Int J Cancer*; 80 (4): 589-94

Debatin, K. M. and Krammer, P. H. (2004). Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene*; 23 (16): 2950-66

Desbois-Mouthon, C., Cacheux, W., Blivet-Van Eggelpoel, M. J., Barbu, V., Fartoux, L., Poupon, R., *et al.* (2006). Impact of IGF-1R/EGFR cross-talks on hepatoma cell sensitivity to gefitinib. *Int J Cancer*; 119 (11): 2557-66

Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., *et al.* (1984). Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature*; 307 (5951): 521-7

Du, B., Altorki, N. K., Kopelovich, L., Subbaramaiah, K. and Dannenberg, A. J. (2005). Tobacco smoke stimulates the transcription of amphiregulin in human oral epithelial cells: evidence of a cyclic AMP-responsive element binding protein-dependent mechanism. *Cancer Res*; 65 (13): 5982-8

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*; 102 (1): 33-42

Dubrez, L., Coll, J. L., Hurbin, A., de Fraipont, F., Lantejoul, S. and Favrot, M. C. (2001a). Cell cycle arrest is sufficient for p53-mediated tumor regression. *Gene Ther*; 8 (22): 1705-12

Dubrez, L., Coll, J. L., Hurbin, A., Solary, E. and Favrot, M. C. (2001b). Caffeine sensitizes human H358 cell line to p53-mediated apoptosis by inducing mitochondrial translocation and conformational change of BAX protein. *J Biol Chem*; 276 (42): 38980-7

## E

Eberhard, D. A., Johnson, B. E., Amler, L. C., Goddard, A. D., Heldens, S. L., Herbst, R. S., *et al.* (2005). Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol*; 23 (25): 5900-9

Eckstein, N., Servan, K., Girard, L., Cai, D., von Jonquieres, G., Jaehde, U., *et al.* (2008). Epidermal growth factor receptor pathway analysis identifies amphiregulin as a key factor for cisplatin resistance of human breast cancer cells. *J Biol Chem*; 283 (2): 739-50

Eilstein, D., Uhry, Z., Lim, T. A. and Bloch, J. (2008). Lung cancer mortality in France Trend analysis and projection between 1975 and 2012, using a Bayesian age-period-cohort model. *Lung Cancer*; 59 (3): 282-90

Engelman, J. A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J. O., *et al.* (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*; 316 (5827): 1039-43

Erjala, K., Sundvall, M., Junttila, T. T., Zhang, N., Savisalo, M., Mali, P., *et al.* (2006). Signaling via ErbB2 and ErbB3 associates with resistance and epidermal growth factor receptor (EGFR) amplification with sensitivity to EGFR inhibitor gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res*; 12 (13): 4103-11

## F

Fadok, V. A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A. and Henson, P. M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*; 405 (6782): 85-90

Falleni, M., Pellegrini, C., Marchetti, A., Oprandi, B., Buttitta, F., Barassi, F., *et al.* (2003). Survivin gene expression in early-stage non-small cell lung cancer. *J Pathol*; 200 (5): 620-6

Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M. and Boyle, P. (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*; 18 (3): 581-92  
Ferreira, C. G., Epping, M., Kruyt, F. A. and Giaccone, G. (2002). Apoptosis: target of cancer therapy. *Clin Cancer Res*; 8 (7): 2024-34

Ferrer-Soler, L., Vazquez-Martin, A., Brunet, J., Menendez, J. A., De Llorens, R. and Colomer, R. (2007). An update of the mechanisms of resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in breast cancer: Gefitinib (Iressatrade mark)-induced changes in the expression and nucleo-cytoplasmic trafficking of HER-ligands (Review). *Int J Mol Med*; 20 (1): 3-10

Fisher, M. J., Virmani, A. K., Wu, L., Aplenc, R., Harper, J. C., Powell, S. M., *et al.* (2001). Nucleotide substitution in the ectodomain of trail receptor DR4 is associated with lung cancer and head and neck cancer. *Clin Cancer Res*; 7 (6): 1688-97

Fiskus, W., Pranpat, M., Balasis, M., Bali, P., Estrella, V., Kumaraswamy, S., *et al.* (2006a). Cotreatment with vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) enhances activity of dasatinib (BMS-354825) against imatinib mesylate-sensitive or imatinib mesylate-resistant chronic myelogenous leukemia cells. *Clin Cancer Res*; 12 (19): 5869-78

Fiskus, W., Pranpat, M., Bali, P., Balasis, M., Kumaraswamy, S., Boyapalle, S., *et al.* (2006b). Combined effects of novel tyrosine kinase inhibitor AMN107 and histone deacetylase inhibitor LBH589 against Bcr-Abl-expressing human leukemia cells. *Blood*; 108 (2): 645-52

Folkman, J. (2006). Angiogenesis. *Annu Rev Med*; 57 1-18  
Folprecht, G., Lutz, M. P., Schoffski, P., Seufferlein, T., Nolting, A., Pollert, P., *et al.* (2006). Cetuximab and irinotecan/5-fluorouracil/folinic acid is a safe combination for the first-line treatment of patients with epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal carcinoma. *Ann Oncol*; 17 (3): 450-6

Fontanini, G., De Laurentiis, M., Vignati, S., Chine, S., Lucchi, M., Silvestri, V., *et al.* (1998). Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors and receptors and of neoangiogenesis in completely resected stage I-III non-small-cell lung cancer: amphiregulin and microvessel count are independent prognostic indicators of survival. *Clin Cancer Res*; 4 (1): 241-9

French, L. E. and Tschopp, J. (2003). Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. *Cell Death Differ*; 10 (1): 117-23

Frew, A. J., Johnstone, R. W. and Bolden, J. E. (2009). Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors. *Cancer Lett*; 280 (2): 125-33

Fridman, J. S. and Lowe, S. W. (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene*; 22 (56): 9030-40

Fry, D. W. (2003). Mechanism of action of erbB tyrosine kinase inhibitors. *Exp Cell Res*; 284 (1): 131-9

Fujimoto, N., Wislez, M., Zhang, J., Iwanaga, K., Dackor, J., Hanna, A. E., *et al.* (2005). High expression of ErbB family members and their ligands in lung adenocarcinomas that are sensitive to inhibition of epidermal growth factor receptor. *Cancer Res*; 65 (24): 11478-85

Fukuoka, M., Yano, S., Giaccone, G., Tamura, T., Nakagawa, K., Douillard, J. Y., *et al.* (2003). Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J Clin Oncol*; 21 (12): 2237-46

Funatomi, H., Itakura, J., Ishiwata, T., Pastan, I., Thompson, S. A., Johnson, G. R., *et al.* (1997). Amphiregulin antisense oligonucleotide inhibits the growth of T3M4 human pancreatic cancer cells and sensitizes the cells to EGF receptor-targeted therapy. *Int J Cancer*; 72 (3): 512-7

## G

Galluzzi, L. and Kroemer, G. (2008). Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*; 135 (7): 1161-3

Garcia de Palazzo, I. E., Adams, G. P., Sundareshan, P., Wong, A. J., Testa, J. R., Bigner, D. D., *et al.* (1993). Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res*; 53 (14): 3217-20

Gatzemeier, U., Pluzanska, A., Szczesna, A., Kaukel, E., Roubec, J., De Rosa, F., *et al.* (2007). Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the Tarceva Lung Cancer Investigation Trial. *J Clin Oncol*; 25 (12): 1545-52

Gazdar, A. F. (2009). Personalized medicine and inhibition of EGFR signaling in lung cancer. *N Engl J Med*; 361 (10): 1018-20

Gazzeri, S., Gouyer, V., Vour'ch, C., Brambilla, C. and Brambilla, E. (1998). Mechanisms of p16INK4A inactivation in non small-cell lung cancers. *Oncogene*; 16 (4): 497-504

Gerl, R. and Vaux, D. L. (2005). Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis*; 26 (2): 263-70

Giaccone, G., Herbst, R. S., Manegold, C., Scagliotti, G., Rosell, R., Miller, V., *et al.* (2004). Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1. *J Clin Oncol*; 22 (5): 777-84

Goldstein, N. I., Prewett, M., Zuklys, K., Rockwell, P. and Mendelsohn, J. (1995). Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res*; 1 (11): 1311-8

Gschwind, A., Fischer, O. M. and Ullrich, A. (2004). The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*; 4 (5): 361-70

Gschwind, A., Hart, S., Fischer, O. M. and Ullrich, A. (2003). TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *Embo J*; 22 (10): 2411-21

Gullo, C., Au, M., Feng, G. and Teoh, G. (2006). The biology of Ku and its potential oncogenic role in cancer. *Biochim Biophys Acta*; 1765 (2): 223-34

Gupta, S., Patel, K., Singh, H. and Gollapudi, S. (1994). Effect of Calphostin C (PKC inhibitor) on daunorubicin resistance in P388/ADR and HL60/AR cells: reversal of drug resistance possibly via P-glycoprotein. *Cancer Lett*; 76 (2-3): 139-45

## H

Haluska, P., Carboni, J. M., TenEyck, C., Attar, R. M., Hou, X., Yu, C., *et al.* (2008). HER receptor signaling confers resistance to the insulin-like growth factor-I receptor inhibitor, BMS-536924. *Mol Cancer Ther*; 7 (9): 2589-98

Han, S. W., Kim, T. Y., Jeon, Y. K., Hwang, P. G., Im, S. A., Lee, K. H., *et al.* (2006). Optimization of patient selection for gefitinib in non-small cell lung cancer by combined analysis of epidermal growth factor receptor mutation, K-ras mutation, and Akt phosphorylation. *Clin Cancer Res*; 12 (8): 2538-44

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

Hanaoka, T., Nakayama, J., Mukai, J., Irie, S., Yamanda, T. and Sato, T. A. (2001). Association of smoking with apoptosis-regulated proteins (Bcl-2, bax and p53) in resected non-small-cell lung cancers. *Int J Cancer*; 91 (2): 267-9

Hanna, N., Lilenbaum, R., Ansari, R., Lynch, T., Govindan, R., Janne, P. A., *et al.* (2006). Phase II trial of cetuximab in patients with previously treated non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 24 (33): 5253-8

Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z. and Haupt, Y. (2003). Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci*; 116 (Pt 20): 4077-85

Haura, E. B., Zheng, Z., Song, L., Cantor, A. and Bepler, G. (2005). Activated epidermal growth factor receptor-Stat-3 signaling promotes tumor survival in vivo in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*; 11 (23): 8288-94

Hecht, S. S. (2003). Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer*; 3 (10): 733-44

Hecht, S. S., Kassie, F. and Hatsukami, D. K. (2009). Chemoprevention of lung carcinogenesis in addicted smokers and ex-smokers. *Nat Rev Cancer*; 9 (7): 476-88

Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*; 407 (6805): 770-6

Herbst, R. S., Giaccone, G., Schiller, J. H., Natale, R. B., Miller, V., Manegold, C., *et al.* (2004). Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2. *J Clin Oncol*; 22 (5): 785-94

Herbst, R. S., Heymach, J. V. and Lippman, S. M. (2008). Lung cancer. *N Engl J Med*; 359 (13): 1367-80

Herbst, R. S., Yano, S., Kuniyasu, H., Khuri, F. R., Bucana, C. D., Guo, F., *et al.* (2000). Differential expression of E-cadherin and type IV collagenase genes predicts outcome in patients with stage I non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*; 6 (3): 790-7

Herr, I. and Debatin, K. M. (2001). Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*; 98 (9): 2603-14

Hill, C., Doyon, F. and Mousannif, A. (Mai 2009). Évolution de la mortalité par cancer en France de 1950 à 2006. *Saint-Maurice (Fra) : Institut de veille sanitaire*; 272p. Disponible sur: [www.invs.santé.fr](http://www.invs.santé.fr)

Hirsch, F. R., Varella-Garcia, M., Bunn, P. A., Jr., Franklin, W. A., Dziadziuszko, R., Thatcher, N., *et al.* (2006). Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 24 (31): 5034-42

Hirsch, F. R. and Witta, S. (2005). Biomarkers for prediction of sensitivity to EGFR inhibitors in non-small cell lung cancer. *Curr Opin Oncol*; 17 (2): 118-22

Holbro, T., Civenni, G. and Hynes, N. E. (2003). The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res*; 284 (1): 99-110

Huang, F., Greer, A., Hurlburt, W., Han, X., Hafezi, R., Wittenberg, G. M., *et al.* (2009). The mechanisms of differential sensitivity to an insulin-like growth factor-1 receptor inhibitor (BMS-536924) and rationale for combining with EGFR/HER2 inhibitors. *Cancer Res*; 69 (1): 161-70

Hubert, P. (2007). [Growth factors of the EGF family and their receptors]. *Bull Cancer*; 94 (7 Suppl): F137-45

Hung, R. J., McKay, J. D., Gaborieau, V., Boffetta, P., Hashibe, M., Zaridze, D., *et al.* (2008). A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature*; 452 (7187): 633-7

Hurbin, A., Coll, J. L., Dubrez-Daloz, L., Mari, B., Auberger, P., Brambilla, C., *et al.* (2005). Cooperation of amphiregulin and insulin-like growth factor-1 inhibits Bax- and Bad-mediated apoptosis via a protein kinase C-dependent pathway in non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem*; 280 (20): 19757-67

Hurbin, A., Dubrez, L., Coll, J. L. and Favrot, M. C. (2002). Inhibition of apoptosis by amphiregulin via an insulin-like growth factor-1 receptor-dependent pathway in non-small cell lung cancer cell lines. *J Biol Chem*; 277 (51): 49127-33

Husgafvel-Pursiainen, K., Boffetta, P., Kannio, A., Nyberg, F., Pershagen, G., Mukeria, A., *et al.* (2000). p53 mutations and exposure to environmental tobacco smoke in a multicenter study on lung cancer. *Cancer Res*; 60 (11): 2906-11

Husgafvel-Pursiainen, K., Hackman, P., Ridanpaa, M., Anttila, S., Karjalainen, A., Partanen, T., *et al.* (1993). K-ras mutations in human adenocarcinoma of the lung: association with smoking and occupational exposure to asbestos. *Int J Cancer*; 53 (2): 250-6

Hynes, N. E. and Lane, H. A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*; 5 (5): 341-54

Hynes, N. E. and MacDonald, G. (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol*; 21 (2): 177-84

## I

Ishikawa, N., Daigo, Y., Takano, A., Taniwaki, M., Kato, T., Hayama, S., *et al.* (2005). Increases of amphiregulin and transforming growth factor-alpha in serum as predictors of poor response to gefitinib among patients with advanced non-small cell lung cancers. *Cancer Res*; 65 (20): 9176-84

Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., *et al.* (1998). A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *Embo J*; 17 (24): 7260-72

## J

Janne, P. A., von Pawel, J., Cohen, R. B., Crino, L., Butts, C. A., Olson, S. S., *et al.* (2007). Multicenter, randomized, phase II trial of CI-1033, an irreversible pan-ERBB inhibitor, for previously treated advanced non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 25 (25): 3936-44

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J. and Thun, M. J. (2009). Cancer Statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*;

Johnson, G. R., Saeki, T., Gordon, A. W., Shoyab, M., Salomon, D. S. and Stromberg, K. (1992). Autocrine action of amphiregulin in a colon carcinoma cell line and immunocytochemical localization of amphiregulin in human colon. *J Cell Biol*; 118 (3): 741-51

Johnstone, R. W., Ruefli, A. A. and Lowe, S. W. (2002). Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*; 108 (2): 153-64

Jones, H. E., Gee, J. M., Barrow, D., Tonge, D., Holloway, B. and Nicholson, R. I. (2006). Inhibition of insulin receptor isoform-A signalling restores sensitivity to gefitinib in previously de novo resistant colon cancer cells. *Br J Cancer*; 95 (2): 172-80

Jones, H. E., Goddard, L., Gee, J. M., Hiscox, S., Rubini, M., Barrow, D., *et al.* (2004). Insulin-like growth factor-I receptor signalling and acquired resistance to gefitinib (ZD1839; Iressa) in human breast and prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer*; 11 (4): 793-814

Jorissen, R. N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T. P., Ward, C. W. and Burgess, A. W. (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res*; 284 (1): 31-53

Joseph, B., Lewensohn, R. and Zhivotovsky, B. (2000). Role of apoptosis in the response of lung carcinomas to anti-cancer treatment. *Ann N Y Acad Sci*; 926 204-16

Ju, D. S., Kim, M. J., Bae, J. H., Song, H. S., Chung, B. S., Lee, M. K., *et al.* (2007). Camptothecin acts synergistically with imatinib and overcomes imatinib resistance through Bcr-Abl independence in human K562 cells. *Cancer Lett*; 252 (1): 75-85

## K

Kakiuchi, S., Daigo, Y., Ishikawa, N., Furukawa, C., Tsunoda, T., Yano, S., *et al.* (2004). Prediction of sensitivity of advanced non-small cell lung cancers to gefitinib (Iressa, ZD1839). *Hum Mol Genet*; 13 (24): 3029-43

Kalomenidis, I., Orphanidou, D., Papamichalis, G., Vassilakopoulos, T., Scorilas, A., Rasidakis, A., *et al.* (2001). Combined expression of p53, Bcl-2, and p21WAF-1 proteins in lung cancer and premalignant lesions: association with clinical characteristics. *Lung*; 179 (5): 265-78

Kamemura, K., Ito, A., Shimazu, T., Matsuyama, A., Maeda, S., Yao, T. P., *et al.* (2008). Effects of downregulated HDAC6 expression on the proliferation of lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 374 (1): 84-9

Kantarjian, H., Sawyers, C., Hochhaus, A., Guilhot, F., Schiffer, C., Gambacorti-Passerini, C., *et al.* (2002). Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med*; 346 (9): 645-52

Kargiotis, O., Chetty, C., Gondi, C. S., Tsung, A. J., Dinh, D. H., Gujrati, M., *et al.* (2008). Adenovirus-mediated transfer of siRNA against MMP-2 mRNA results in impaired invasion and tumor-induced angiogenesis, induces apoptosis in vitro and inhibits tumor growth in vivo in glioblastoma. *Oncogene*; 27 (35): 4830-40

Kato, M., Inazu, T., Kawai, Y., Masamura, K., Yoshida, M., Tanaka, N., *et al.* (2003). Amphiregulin is a potent mitogen for the vascular smooth muscle cell line, A7r5. *Biochem Biophys Res Commun*; 301 (4): 1109-15

Kaufmann, S. H. and Earnshaw, W. C. (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res*; 256 (1): 42-9

Kaufmann, S. H. and Vaux, D. L. (2003). Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance. *Oncogene*; 22 (47): 7414-30

Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*; 26 (4): 239-57

Khambata-Ford, S., Garrett, C. R., Meropol, N. J., Basik, M., Harbison, C. T., Wu, S., *et al.* (2007). Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol*; 25 (22): 3230-7

Kim, E. S., Hirsh, V., Mok, T., Socinski, M. A., Gervais, R., Wu, Y. L., *et al.* (2008). Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer (INTEREST): a randomised phase III trial. *Lancet*; 372 (9652): 1809-18

Kimura, H., Suminoe, M., Kasahara, K., Sone, T., Araya, T., Tamori, S., *et al.* (2007). Evaluation of epidermal growth factor receptor mutation status in serum DNA as a predictor of response to gefitinib (IRESSA). *Br J Cancer*; 97 (6): 778-84

Kondapaka, S. B., Fridman, R. and Reddy, K. B. (1997). Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells. *Int J Cancer*; 70 (6): 722-6

Koomagi, R. and Volm, M. (1999). Expression of Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand in lung cancer, its prognostic and predictive relevance. *Int J Cancer*; 84 (3): 239-43

Kosaka, T., Yatabe, Y., Endoh, H., Yoshida, K., Hida, T., Tsuboi, M., *et al.* (2006). Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib. *Clin Cancer Res*; 12 (19): 5764-9

Krause, D. S. and Van Etten, R. A. (2005). Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med*; 353 (2): 172-87

Kris, M. G., Natale, R. B., Herbst, R. S., Lynch, T. J., Jr., Prager, D., Belani, C. P., *et al.* (2003). Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *Jama*; 290 (16): 2149-58

Kwak, E. L., Sordella, R., Bell, D. W., Godin-Heymann, N., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., *et al.* (2005). Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 102 (21): 7665-70

## L

Lababede, O., Meziane, M. A. and Rice, T. W. (1999). TNM staging of lung cancer: a quick reference chart. *Chest*; 115 (1): 233-5

Lantuejoul, S., Constantin, B., Drabkin, H., Brambilla, C., Roche, J. and Brambilla, E. (2003). Expression of VEGF, semaphorin SEMA3F, and their common receptors neuropilins NP1 and NP2 in preinvasive bronchial lesions, lung tumours, and cell lines. *J Pathol*; 200 (3): 336-47

Lantuejoul, S., Salon, C., Soria, J. C. and Brambilla, E. (2007). Telomerase expression in lung preneoplasia and neoplasia. *Int J Cancer*; 120 (9): 1835-41

Lautrette, A., Li, S., Alili, R., Sunnarborg, S. W., Burtin, M., Lee, D. C., *et al.* (2005). Angiotensin II and EGF receptor cross-talk in chronic kidney diseases: a new therapeutic approach. *Nat Med*; 11 (8): 867-74

Le Calvez, F., Mukeria, A., Hunt, J. D., Kelm, O., Hung, R. J., Taniere, P., *et al.* (2005). TP53 and KRAS mutation load and types in lung cancers in relation to tobacco smoke: distinct patterns in never, former, and current smokers. *Cancer Res*; 65 (12): 5076-83

Le Faou, A. L. and Scemama, O. (2005). [Epidemiology of tobacco smoking]. *Rev Mal Respir*; 22 (6 Pt 2): 8S27-32

Le Tourneau, C., Vidal, L. and Siu, L. L. (2008). Progress and challenges in the identification of biomarkers for EGFR and VEGFR targeting anticancer agents. *Drug Resist Updat*; 11 (3): 99-109

Lee, S. H., Shin, M. S., Kim, H. S., Lee, H. K., Park, W. S., Kim, S. Y., *et al.* (1999). Alterations of the DR5/TRAIL receptor 2 gene in non-small cell lung cancers. *Cancer Res*; 59 (22): 5683-6

- Lee, S. M., Bae, J. H., Kim, M. J., Lee, H. S., Lee, M. K., Chung, B. S., *et al.* (2007). Bcr-Abl-independent imatinib-resistant K562 cells show aberrant protein acetylation and increased sensitivity to histone deacetylase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther*; 322 (3): 1084-92
- Lemjabbar, H., Li, D., Gallup, M., Sidhu, S., Drori, E. and Basbaum, C. (2003). Tobacco smoke-induced lung cell proliferation mediated by tumor necrosis factor alpha-converting enzyme and amphiregulin. *J Biol Chem*; 278 (28): 26202-7
- Levine, B. and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*; 132 (1): 27-42
- Li, C., Iida, M., Dunn, E. F., Ghia, A. J. and Wheeler, D. L. (2009). Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene*;
- Li, G. C., He, F., Shao, X., Urano, M., Shen, L., Kim, D., *et al.* (2003). Adenovirus-mediated heat-activated antisense Ku70 expression radiosensitizes tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*; 63 (12): 3268-74
- Li, G. C., Ouyang, H., Li, X., Nagasawa, H., Little, J. B., Chen, D. J., *et al.* (1998). Ku70: a candidate tumor suppressor gene for murine T cell lymphoma. *Mol Cell*; 2 (1): 1-8
- Li, L. Y., Luo, X. and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*; 412 (6842): 95-9
- Li, S., Plowman, G. D., Buckley, S. D. and Shipley, G. D. (1992). Heparin inhibition of autonomous growth implicates amphiregulin as an autocrine growth factor for normal human mammary epithelial cells. *J Cell Physiol*; 153 (1): 103-11
- Li, S., Schmitz, K. R., Jeffrey, P. D., Wiltzius, J. J., Kussie, P. and Ferguson, K. M. (2005). Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell*; 7 (4): 301-11
- Lichtner, R. B., Menrad, A., Sommer, A., Klar, U. and Schneider, M. R. (2001). Signaling-inactive epidermal growth factor receptor/ligand complexes in intact carcinoma cells by quinazoline tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res*; 61 (15): 5790-5
- Lilenbaum, R., Axelrod, R., Thomas, S., Dowlati, A., Seigel, L., Albert, D., *et al.* (2008). Randomized phase II trial of erlotinib or standard chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer and a performance status of 2. *J Clin Oncol*; 26 (6): 863-9
- Lilenbaum, R. C. (2006). The evolving role of cetuximab in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*; 12 (14 Pt 2): 4432s-4435s
- Linardou, H., Dahabreh, I. J., Kanaloupiti, D., Siannis, F., Bafaloukos, D., Kosmidis, P., *et al.* (2008). Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol*; 9 (10): 962-72
- Ling, Y. H., Lin, R. and Perez-Soler, R. (2008). Erlotinib induces mitochondrial-mediated apoptosis in human H3255 non-small-cell lung cancer cells with epidermal growth factor receptor L858R mutation through mitochondrial oxidative phosphorylation-dependent activation of BAX and BAK. *Mol Pharmacol*; 74 (3): 793-806
- Liston, P., Fong, W. G. and Korneluk, R. G. (2003). The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene*; 22 (53): 8568-80
- Lo, H. W., Hsu, S. C., Ali-Seyed, M., Gunduz, M., Xia, W., Wei, Y., *et al.* (2005). Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell*; 7 (6): 575-89
- Lockshin, R. A. and Zakeri, Z. (2001). Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2 (7): 545-50
- Lorente, M., Carracedo, A., Torres, S., Natali, F., Egia, A., Hernandez-Tiedra, S., *et al.* (2009). Amphiregulin is a factor for resistance of glioma cells to cannabinoid-induced apoptosis. *Glia*;
- Lu, D., Zhang, H., Koo, H., Tonra, J., Balderes, P., Prewett, M., *et al.* (2005). A fully human recombinant IgG-like bispecific antibody to both the epidermal growth factor receptor and the insulin-like growth factor receptor for enhanced antitumor activity. *J Biol Chem*; 280 (20): 19665-72
- Lu, D., Zhang, H., Ludwig, D., Persaud, A., Jimenez, X., Burtrum, D., *et al.* (2004). Simultaneous blockade of both the epidermal growth factor receptor and the insulin-like growth factor receptor signaling pathways in cancer cells with a fully human recombinant bispecific antibody. *J Biol Chem*; 279 (4): 2856-65
- Ludovini, V., Bellezza, G., Pistola, L., Bianconi, F., Di Carlo, L., Sidoni, A., *et al.* (2009). High coexpression of both insulin-like growth factor receptor-1 (IGFR-1) and epidermal growth factor receptor (EGFR) is associated with shorter disease-free survival in resected non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol*; 20 (5): 842-9
- Luetke, N. C., Qiu, T. H., Fenton, S. E., Troyer, K. L., Riedel, R. F., Chang, A., *et al.* (1999). Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development. *Development*; 126 (12): 2739-50
- Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavata, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., *et al.* (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*; 350 (21): 2129-39

## M

- Ma, L., de Roquancourt, A., Bertheau, P., Chevret, S., Millot, G., Sastre-Garau, X., *et al.* (2001). Expression of amphiregulin and epidermal growth factor receptor in human breast cancer: analysis of autocrine and stromal-epithelial interactions. *J Pathol*; 194 (4): 413-9

- Ma, L., Gauville, C., Berthois, Y., Millot, G., Johnson, G. R. and Calvo, F. (1999). Antisense expression for amphiregulin suppresses tumorigenicity of a transformed human breast epithelial cell line. *Oncogene*; 18 (47): 6513-20
- Madelaine, J. and Zalcman, G. (2005). Biologie des cancers bronchiques. *EMC-pneumologie*; 2 (1): 1-8
- Mahalingam, D., Mita, A., Mita, M. M., Nawrocki, S. T. and Giles, F. J. (2009). Targeted therapy for advanced non-small cell lung cancers: historical perspective, current practices, and future development. *Curr Probl Cancer*; 33 (2): 73-111
- Martin, B., Paesmans, M., Berghmans, T., Branle, F., Ghisdal, L., Mascaux, C., et al. (2003). Role of Bcl-2 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer*; 89 (1): 55-64
- Martini, N. (1990). Surgical treatment of non-small cell lung cancer by stage. *Semin Surg Oncol*; 6 (5): 248-54
- Masago, K., Fujita, S., Hatachi, Y., Fukuhara, A., Sakuma, K., Ichikawa, M., et al. (2008). Clinical significance of pretreatment serum amphiregulin and transforming growth factor- $\alpha$ , and an epidermal growth factor receptor somatic mutation in patients with advanced non-squamous, non-small cell lung cancer. *Cancer Sci*; 99 (11): 2295-301
- Massarelli, E., Varella-Garcia, M., Tang, X., Xavier, A. C., Ozburn, N. C., Liu, D. D., et al. (2007). KRAS mutation is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res*; 13 (10): 2890-6
- Matsui, M., Miyasaka, J., Hamada, K., Ogawa, Y., Hiramoto, M., Fujimori, R., et al. (2000). Influence of aging and cell senescence on telomerase activity in keratinocytes. *J Dermatol Sci*; 22 (2): 80-7
- Mattson, M. P. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*; 430 (7000): 631-9
- Mazumder, S., Plesca, D., Kinter, M. and Almasan, A. (2007). Interaction of a cyclin E fragment with Ku70 regulates Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol*; 27 (9): 3511-20
- Menashi, S., Serova, M., Ma, L., Vignot, S., Mourah, S. and Calvo, F. (2003). Regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinase expression by amphiregulin in transformed human breast epithelial cells. *Cancer Res*; 63 (22): 7575-80
- Menzo, S., Clementi, M., Alfani, E., Bagnarelli, P., Iacovacci, S., Manzin, A., et al. (1993). Trans-activation of epidermal growth factor receptor gene by the hepatitis B virus X-gene product. *Virology*; 196 (2): 878-82
- Merrick, D. T., Haney, J., Petrunich, S., Sugita, M., Miller, Y. E., Keith, R. L., et al. (2005). Overexpression of vascular endothelial growth factor and its receptors in bronchial dysplasia demonstrated by quantitative RT-PCR analysis. *Lung Cancer*; 48 (1): 31-45
- Micheau, O., Hammann, A., Solary, E. and Dimanche-Boitrel, M. T. (1999a). STAT-1-independent upregulation of FADD and procaspase-3 and -8 in cancer cells treated with cytotoxic drugs. *Biochem Biophys Res Commun*; 256 (3): 603-7
- Micheau, O., Solary, E., Hammann, A. and Dimanche-Boitrel, M. T. (1999b). Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs. *J Biol Chem*; 274 (12): 7987-92
- Miettinen, P. J., Berger, J. E., Meneses, J., Phung, Y., Pedersen, R. A., Werb, Z., et al. (1995). Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature*; 376 (6538): 337-41
- Miller, W. E., Earp, H. S. and Raab-Traub, N. (1995). The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces expression of the epidermal growth factor receptor. *J Virol*; 69 (7): 4390-8
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., et al. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*; 9 (6): 1799-805
- Mohamed, M. K., Ramalingam, S., Lin, Y., Gooding, W. and Belani, C. P. (2005). Skin rash and good performance status predict improved survival with gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Ann Oncol*; 16 (5): 780-5
- Mok, T. S., Wu, Y. L., Thongprasert, S., Yang, C. H., Chu, D. T., Saijo, N., et al. (2009). Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*; 361 (10): 947-57
- Moll, U. M., Wolff, S., Speidel, D. and Deppert, W. (2005). Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol*; 17 (6): 631-6
- Morgillo, F., Kim, W. Y., Kim, E. S., Ciardiello, F., Hong, W. K. and Lee, H. Y. (2007). Implication of the insulin-like growth factor-IR pathway in the resistance of non-small cell lung cancer cells to treatment with gefitinib. *Clin Cancer Res*; 13 (9): 2795-803
- Morgillo, F., Woo, J. K., Kim, E. S., Hong, W. K. and Lee, H. Y. (2006). Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib. *Cancer Res*; 66 (20): 10100-11
- Moscato, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., et al. (1995). Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res*; 55 (23): 5536-9
- Motoyama, A. B., Hynes, N. E. and Lane, H. A. (2002). The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res*; 62 (11): 3151-8

Myong, N. H. (2005). Tissue microarray analysis of Fas and FasL expressions in human non-small cell lung carcinomas; with reference to the p53 and bcl-2 overexpressions. *J Korean Med Sci*; 20 (5): 770-6

## N

Nabha, S. M., Glaros, S., Hong, M., Lykkesfeldt, A. E., Schiff, R., Osborne, K., *et al.* (2005). Upregulation of PKC-delta contributes to antiestrogen resistance in mammary tumor cells. *Oncogene*; 24 (19): 3166-76

Nahta, R., Yuan, L. X., Zhang, B., Kobayashi, R. and Esteva, F. J. (2005). Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res*; 65 (23): 11118-28

Nambu, Y., Hughes, S. J., Rehemtulla, A., Hamstra, D., Orringer, M. B. and Beer, D. G. (1998). Lack of cell surface Fas/APO-1 expression in pulmonary adenocarcinomas. *J Clin Invest*; 101 (5): 1102-10

Nicholson, R. I., Gee, J. M. and Harper, M. E. (2001). EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*; 37 Suppl 4 S9-15

Normanno, N., Bianco, C., De Luca, A. and Salomon, D. S. (2001). The role of EGF-related peptides in tumor growth. *Front Biosci*; 6 D685-707

Normanno, N., Ciardiello, F., Brandt, R. and Salomon, D. S. (1994a). Epidermal growth factor-related peptides in the pathogenesis of human breast cancer. *Breast Cancer Treat Res*; 29 (1): 11-27

Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M. R., *et al.* (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*; 366 (1): 2-16

Normanno, N., Selvam, M. P., Bianco, C., Damiano, V., de Angelis, E., Grassi, M., *et al.* (1995). Amphiregulin antisense oligodeoxynucleotides inhibit growth and transformation of a human colon carcinoma cell line. *Int J Cancer*; 62 (6): 762-6

Normanno, N., Selvam, M. P., Qi, C. F., Saeki, T., Johnson, G., Kim, N., *et al.* (1994b). Amphiregulin as an autocrine growth factor for c-Ha-ras- and c-erbB-2-transformed human mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 91 (7): 2790-4

## O

O'Hagan, R. C. and Hassell, J. A. (1998). The PEA3 Ets transcription factor is a downstream target of the HER2/Neu receptor tyrosine kinase. *Oncogene*; 16 (3): 301-10

Okada, H. and Mak, T. W. (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*; 4 (8): 592-603

Olayioye, M. A., Beuvink, I., Horsch, K., Daly, J. M. and Hynes, N. E. (1999). ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *J Biol Chem*; 274 (24): 17209-18

Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A. and Hynes, N. E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo J*; 19 (13): 3159-67

Orniskov, D., Nexø, E. and Sørensen, B. S. (2006). Insulin-induced proliferation of bladder cancer cells is mediated through activation of the epidermal growth factor system. *FEBS J*; 273 (23): 5479-89

Overholser, J. P., Prewett, M. C., Hooper, A. T., Waksal, H. W. and Hicklin, D. J. (2000). Epidermal growth factor receptor blockade by antibody IMC-C225 inhibits growth of a human pancreatic carcinoma xenograft in nude mice. *Cancer*; 89 (1): 74-82

## P

Paez, J. G., Janne, P. A., Lee, J. C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., *et al.* (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*; 304 (5676): 1497-500

Pallis, A. G., Serfass, L., Dziadziusko, R., van Meerbeeck, J. P., Fennell, D., Lacombe, D., *et al.* (2009). Targeted therapies in the treatment of advanced/metastatic NSCLC. *Eur J Cancer*;

Pao, W., Wang, T. Y., Riely, G. J., Miller, V. A., Pan, Q., Ladanyi, M., *et al.* (2005). KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med*; 2 (1): e17

Patel, D., Bassi, R., Hooper, A., Prewett, M., Hicklin, D. J. and Kang, X. (2009). Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab inhibits EGFR/HER-2 heterodimerization and activation. *Int J Oncol*; 34 (1): 25-32

Peng, X. H., Karna, P., Cao, Z., Jiang, B. H., Zhou, M. and Yang, L. (2006). Cross-talk between epidermal growth factor receptor and hypoxia-inducible factor-1alpha signal pathways increases resistance to apoptosis by up-regulating survivin gene expression. *J Biol Chem*; 281 (36): 25903-14

Perez-Soler, R. (2004). HER1/EGFR targeting: refining the strategy. *Oncologist*; 9 (1): 58-67

Perez-Soler, R. (2006). Rash as a surrogate marker for efficacy of epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer. *Clin Lung Cancer*; 8 Suppl 1 S7-14

Peter, M. E. and Krammer, P. H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*; 10 (1): 26-35

Peto, R., Darby, S., Deo, H., Silcocks, P., Whitley, E. and Doll, R. (2000). Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *Bmj*; 321 (7257): 323-9

## R

Picirhard, V., Berthois, Y., Roccabianca, M., Prevot, C., Sarrazin, M., Portugal, H., *et al.* (2006). Concomitant cell growth and differentiation are dependent on erbB1 and integrin activation in an autonomously surviving colon adenocarcinoma: involvement of autocrine amphiregulin secretion. *Anticancer Res*; 26 (4B): 2769-83

Pinkoski, M. J. and Green, D. R. (2002). Lymphocyte apoptosis: refining the paths to perdition. *Curr Opin Hematol*; 9 (1): 43-9

Pirker, R., Pereira, J. R., Szczesna, A., von Pawel, J., Krzakowski, M., Ramlau, R., *et al.* (2009). Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet*; 373 (9674): 1525-31

Pitti, R. M., Marsters, S. A., Lawrence, D. A., Roy, M., Kischkel, F. C., Dowd, P., *et al.* (1998). Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*; 396 (6712): 699-703

Plowman, G. D., Green, J. M., McDonald, V. L., Neubauer, M. G., Disteche, C. M., Todaro, G. J., *et al.* (1990). The amphiregulin gene encodes a novel epidermal growth factor-related protein with tumor-inhibitory activity. *Mol Cell Biol*; 10 (5): 1969-81

Pollak, M. (2008). Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer*; 8 (12): 915-28

Prewett, M. C., Hooper, A. T., Bassi, R., Ellis, L. M., Waksal, H. W. and Hicklin, D. J. (2002). Enhanced antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody IMC-C225 in combination with irinotecan (CPT-11) against human colorectal tumor xenografts. *Clin Cancer Res*; 8 (5): 994-1003

Prince, H. M., Bishton, M. J. and Harrison, S. J. (2009). Clinical studies of histone deacetylase inhibitors. *Clin Cancer Res*; 15 (12): 3958-69

Puri, N. and Salgia, R. (2008). Synergism of EGFR and c-Met pathways, cross-talk and inhibition, in non-small cell lung cancer. *J Carcinog*; 7 9

## Q

Qin, L., Tamasi, J., Raggatt, L., Li, X., Feyen, J. H., Lee, D. C., *et al.* (2005). Amphiregulin is a novel growth factor involved in normal bone development and in the cellular response to parathyroid hormone stimulation. *J Biol Chem*; 280 (5): 3974-81

Qin, Q., Patil, K. and Sharma, S. C. (2004). The role of Bax-inhibiting peptide in retinal ganglion cell apoptosis after optic nerve transection. *Neurosci Lett*; 372 (1-2): 17-21

Quantin, B. and Breathnach, R. (1988). Epidermal growth factor stimulates transcription of the c-jun proto-oncogene in rat fibroblasts. *Nature*; 334 (6182): 538-9

Rapport-EMeA (Juillet 2009).

<http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/iressa/iressa.htm>. Iressa - European Public Assessment Report

Rasheed, W. K., Johnstone, R. W. and Prince, H. M. (2007). Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs*; 16 (5): 659-78

Rashmi, R., Kumar, S. and Karunakaran, D. (2004). Ectopic expression of Bcl-XL or Ku70 protects human colon cancer cells (SW480) against curcumin-induced apoptosis while their down-regulation potentiates it. *Carcinogenesis*; 25 (10): 1867-77

Recchia, A. G., Musti, A. M., Lanzino, M., Panno, M. L., Turano, E., Zumpano, R., *et al.* (2009). A cross-talk between the androgen receptor and the epidermal growth factor receptor leads to p38MAPK-dependent activation of mTOR and cyclinD1 expression in prostate and lung cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*; 41 (3): 603-14

Reck, M. and Crino, L. (2009). Advances in anti-VEGF and anti-EGFR therapy for advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*; 63 (1): 1-9

Reed, J. C. (1999). Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol*; 17 (9): 2941-53

Reich, S. J., Fosnot, J., Kuroki, A., Tang, W., Yang, X., Maguire, A. M., *et al.* (2003). Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol Vis*; 9 210-6

Ricci, F., Pucci, S., Sesti, F., Missiroli, F., Cerulli, L. and Spagnoli, L. G. (2007). Modulation of Ku70/80, clusterin/ApoJ isoforms and Bax expression in indocyanine-green-mediated photo-oxidative cell damage. *Ophthalmic Res*; 39 (3): 164-73

Ricono, J. M., Huang, M., Barnes, L. A., Lau, S. K., Weis, S. M., Schlaepfer, D. D., *et al.* (2009). Specific cross-talk between epidermal growth factor receptor and integrin alphavbeta5 promotes carcinoma cell invasion and metastasis. *Cancer Res*; 69 (4): 1383-91

Riedl, S. J., Renatus, M., Snipas, S. J. and Salvesen, G. S. (2001). Mechanism-based inactivation of caspases by the apoptotic suppressor p35. *Biochemistry*; 40 (44): 13274-80

Rinehart, JJ., Wilding, G., Willson, J., Krishnamurthi, S., Natale, RB. and Dasse, KD *et al.* (2003). A phase I clinical and pharmacokinetic (PK)/food effect study of oral CI-1033, a pan-erb B tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *ASCO Meeting Abstracts*; (22): 821

Risch, A. and Plass, C. (2008). Lung cancer epigenetics and genetics. *Int J Cancer*; 123 (1): 1-7

Robles, A. I., Linke, S. P. and Harris, C. C. (2002). The p53 network in lung carcinogenesis. *Oncogene*; 21 (45): 6898-907

Rodland, K. D., Bollinger, N., Ippolito, D., Opresko, L. K., Coffey, R. J., Zangar, R., *et al.* (2008). Multiple mechanisms are responsible for transactivation of the epidermal growth factor receptor in mammary epithelial cells. *J Biol Chem*; 283 (46): 31477-87

Rogers, S. J., Box, C., Chambers, P., Barbachano, Y., Nutting, C. M., Rhys-Evans, P., *et al.* (2009). Determinants of response to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Pathol*;

Rosell, R., Moran, T., Queralt, C., Porta, R., Cardenal, F., Camps, C., *et al.* (2009). Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med*; 361 (10): 958-67

Rosell, R., Robinet, G., Szczesna, A., Ramlau, R., Constenla, M., Mennecier, B. C., *et al.* (2008). Randomized phase II study of cetuximab plus cisplatin/vinorelbine compared with cisplatin/vinorelbine alone as first-line therapy in EGFR-expressing advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*; 19 (2): 362-9

Roshal, M., Zhu, Y. and Planelles, V. (2001). Apoptosis in AIDS. *Apoptosis*; 6 (1-2): 103-16

Ross, HJ., Blumenschein, GR., Dowlati, A., Aisner, J., Rigas, A. and Stanislaus M, *et al.* (2005). Preliminary safety results of a phase II trial comparing two schedules of lapatinib (GW572016) as first line therapy for advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *ASCO Meeting Abstracts*; (23): 7099

Rusch, V., Baselga, J., Cordon-Cardo, C., Orazem, J., Zaman, M., Hoda, S., *et al.* (1993). Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non-small cell lung cancers and adjacent benign lung. *Cancer Res*; 53 (10 Suppl): 2379-85

## S

Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G. and Vandenaebelle, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*; 23 (16): 2861-74

Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H. M., Higashiyama, S., Peschon, J., *et al.* (2004). Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol*; 164 (5): 769-79

Saito, Y., Haendeler, J., Hojo, Y., Yamamoto, K. and Berk, B. C. (2001). Receptor heterodimerization: essential mechanism for platelet-derived growth factor-induced epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol Cell Biol*; 21 (19): 6387-94

Sakurai, H., Tsukamoto, T., Kjelsberg, C. A., Cantley, L. G. and Nigam, S. K. (1997). EGF receptor ligands are a large fraction of in vitro branching morphogens secreted by embryonic kidney. *Am J Physiol*; 273 (3 Pt 2): F463-72

Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F. and Normanno, N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*; 19 (3): 183-232

Saltz, L. B., Lenz, H. J., Kindler, H. L., Hochster, H. S., Wadler, S., Hoff, P. M., *et al.* (2007). Randomized phase II trial of cetuximab, bevacizumab, and irinotecan compared with cetuximab and bevacizumab alone in irinotecan-refractory colorectal cancer: the BOND-2 study. *J Clin Oncol*; 25 (29): 4557-61

Saltz, L. B., Meropol, N. J., Loehrer, P. J., Sr., Needle, M. N., Kopit, J. and Mayer, R. J. (2004). Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol*; 22 (7): 1201-8

Sanchez-Cespedes, M. (2003). Dissecting the genetic alterations involved in lung carcinogenesis. *Lung Cancer*; 40 (2): 111-21

Sapountzi, V., Logan, I. R. and Robson, C. N. (2006). Cellular functions of TIP60. *Int J Biochem Cell Biol*; 38 (9): 1496-509

Sartorius, U. A. and Krammer, P. H. (2002). Upregulation of Bcl-2 is involved in the mediation of chemotherapy resistance in human small cell lung cancer cell lines. *Int J Cancer*; 97 (5): 584-92

Sato, J. D., Kawamoto, T., Le, A. D., Mendelsohn, J., Polikoff, J. and Sato, G. H. (1983). Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors. *Mol Biol Med*; 1 (5): 511-29

Sawada, M., Hayes, P. and Matsuyama, S. (2003). Cytoprotective membrane-permeable peptides designed from the Bax-binding domain of Ku70. *Nat Cell Biol*; 5 (4): 352-7

Schiller, J. H., Harrington, D., Belani, C. P., Langer, C., Sandler, A., Krook, J., *et al.* (2002). Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*; 346 (2): 92-8

Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*; 103 (2): 211-25

Schreiber, A. B., Lax, I., Yarden, Y., Eshhar, Z. and Schlessinger, J. (1981). Monoclonal antibodies against receptor for epidermal growth factor induce early and delayed effects of epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 78 (12): 7535-9

Schrump, D. S. (2009). Cytotoxicity mediated by histone deacetylase inhibitors in cancer cells: mechanisms and potential clinical implications. *Clin Cancer Res*; 15 (12): 3947-57

Schuger, L., Johnson, G. R., Gilbride, K., Plowman, G. D. and Mandel, R. (1996). Amphiregulin in lung branching morphogenesis: interaction with heparan sulfate proteoglycan modulates cell proliferation. *Development*; 122 (6): 1759-67

Sculier, J. P. and Moro-Sibilot, D. (2009). First- and second-line therapy for advanced nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J*; 33 (4): 915-30

- Sequist, L. V., Bell, D. W., Lynch, T. J. and Haber, D. A. (2007). Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 25 (5): 587-95
- Shah, N. T., Kris, M. G., Pao, W., Tyson, L. B., Pizzo, B. M., Heinemann, M. H., *et al.* (2005). Practical management of patients with non-small-cell lung cancer treated with gefitinib. *J Clin Oncol*; 23 (1): 165-74
- Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J. and Haber, D. A. (2007). Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*; 7 (3): 169-81
- Shepherd, F. A., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., Tan, E. H., Hirsh, V., Thongprasert, S., *et al.* (2005). Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*; 353 (2): 123-32
- Shields, T. W. (1993). Surgical therapy for carcinoma of the lung. *Clin Chest Med*; 14 (1): 121-47
- Shivapurkar, N., Reddy, J., Chaudhary, P. M. and Gazdar, A. F. (2003). Apoptosis and lung cancer: a review. *J Cell Biochem*; 88 (5): 885-98
- Shivapurkar, N., Reddy, J., Matta, H., Sathyanarayana, U. G., Huang, C. X., Toyooka, S., *et al.* (2002a). Loss of expression of death-inducing signaling complex (DISC) components in lung cancer cell lines and the influence of MYC amplification. *Oncogene*; 21 (55): 8510-4
- Shivapurkar, N., Toyooka, S., Eby, M. T., Huang, C. X., Sathyanarayana, U. G., Cunningham, H. T., *et al.* (2002b). Differential inactivation of caspase-8 in lung cancers. *Cancer Biol Ther*; 1 (1): 65-9
- Shivapurkar, N., Toyooka, S., Toyooka, K. O., Reddy, J., Miyajima, K., Suzuki, M., *et al.* (2004). Aberrant methylation of trail decoy receptor genes is frequent in multiple tumor types. *Int J Cancer*; 109 (5): 786-92
- Shoyab, M., McDonald, V. L., Bradley, J. G. and Todaro, G. J. (1988). Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 85 (17): 6528
- Sibilia, M. and Wagner, E. F. (1995). Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science*; 269 (5221): 234-8
- Silva, C. M. (2004). Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene*; 23 (48): 8017-23
- Sizemore, N., Cox, A. D., Barnard, J. A., Oldham, S. M., Reynolds, E. R., Der, C. J., *et al.* (1999). Pharmacological inhibition of Ras-transformed epithelial cell growth is linked to down-regulation of epidermal growth factor-related peptides. *Gastroenterology*; 117 (3): 567-76
- Sobrero, A. F., Maurel, J., Fehrenbacher, L., Scheithauer, W., Abubakr, Y. A., Lutz, M. P., *et al.* (2008). EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*; 26 (14): 2311-9
- Socinski, M. A. (2007). Antibodies to the epidermal growth factor receptor in non small cell lung cancer: current status of matuzumab and panitumumab. *Clin Cancer Res*; 13 (15 Pt 2): s4597-601
- Solic, N. and Davies, D. E. (1997). Differential effects of EGF and amphiregulin on adhesion molecule expression and migration of colon carcinoma cells. *Exp Cell Res*; 234 (2): 465-76
- Soria, J. C., Lee, H. Y., Lee, J. I., Wang, L., Issa, J. P., Kemp, B. L., *et al.* (2002). Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clin Cancer Res*; 8 (5): 1178-84
- Soria, J. C., Cortes, J., Armand, J. P., Taleb, A., van Bree, L. and Lopez, E., *et al.* (2005). Phase I pharmacokinetic profile and early clinical evaluation of the PAN-HER inhibitor BMS-599626. *ASCO Meeting Abstracts*; (23): 3109
- Spierings, D. C., de Vries, E. G., Timens, W., Groen, H. J., Boezen, H. M. and de Jong, S. (2003). Expression of TRAIL and TRAIL death receptors in stage III non-small cell lung cancer tumors. *Clin Cancer Res*; 9 (9): 3397-405
- Spiro, S. G. and Porter, J. C. (2002). Lung cancer--where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. *Am J Respir Crit Care Med*; 166 (9): 1166-96
- Steller, H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*; 267 (5203): 1445-9
- Stennicke, H. R. and Salvesen, G. S. (2000). Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta*; 1477 (1-2): 299-306
- Sternlicht, M. D., Sunnarborg, S. W., Kouros-Mehr, H., Yu, Y., Lee, D. C. and Werb, Z. (2005). Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin. *Development*; 132 (17): 3923-33
- Stinchcombe, T. E. and Socinski, M. A. (2009). Current treatments for advanced stage non-small cell lung cancer. *Proc Am Thorac Soc*; 6 (2): 233-41
- Subramanian, C., Jarzembowski, J. A., Opiari, A. W., Jr., Castle, V. P. and Kwok, R. P. (2007). CREB-binding protein is a mediator of neuroblastoma cell death induced by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A. *Neoplasia*; 9 (6): 495-503
- Subramanian, C., Opiari, A. W., Jr., Bian, X., Castle, V. P. and Kwok, R. P. (2005a). Ku70 acetylation mediates neuroblastoma cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 102 (13): 4842-7
- Subramanian, C., Opiari, A. W., Jr., Castle, V. P. and Kwok, R. P. (2005b). Histone deacetylase inhibition induces apoptosis in neuroblastoma. *Cell Cycle*; 4 (12): 1741-3
- Sunnarborg, S. W., Hinkle, C. L., Stevenson, M., Russell, W. E., Raska, C. S., Peschon, J. J., *et al.* (2002). Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability. *J Biol Chem*; 277 (15): 12838-45

Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., *et al.* (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*; 397 (6718): 441-6

Sutheesophon, K., Kobayashi, Y., Takatoku, M. A., Ozawa, K., Kano, Y., Ishii, H., *et al.* (2006). Histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) induces apoptosis in leukemic cells by facilitating mitochondrial translocation of Bax, which is enhanced by the proteasome inhibitor bortezomib. *Acta Haematol*; 115 (1-2): 78-90

## T

Tabernero, J., Van Cutsem, E., Diaz-Rubio, E., Cervantes, A., Humblet, Y., Andre, T., *et al.* (2007). Phase II trial of cetuximab in combination with fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*; 25 (33): 5225-32

Tait, S. W. and Green, D. R. (2008). Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene*; 27 (50): 6452-61

Tang, Y., Luo, J., Zhang, W. and Gu, W. (2006). Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell*; 24 (6): 827-39

Tao, Y., Pinzi, V., Bourhis, J. and Deutsch, E. (2007). Mechanisms of disease: signaling of the insulin-like growth factor 1 receptor pathway--therapeutic perspectives in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*; 4 (10): 591-602

Tatton, W. G., Chalmers-Redman, R., Brown, D. and Tatton, N. (2003). Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol*; 53 Suppl 3 S61-70; discussion S70-2

Thatcher, N., Chang, A., Parikh, P., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., von Pawel, J., *et al.* (2005). Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet*; 366 (9496): 1527-37

Thèse Van Den Broeck, A. (3 sept. 2009). Aspects épigénétiques des cancers broncho-pulmonaires et implication de l'histone acétyltransférase Tip60. *Mémoire de Thèse d'Université (Ph.D.)*; (Université Joseph Fourier): Grenoble

Thiberville, L. and Paris, C. (2004). Epidémiologie et facteurs de risque des cancers bronchiques primitifs. *EMC-pneumologie*; 1 (1): 7-18

Thomas, S. M., Bhola, N. E., Zhang, Q., Contrucci, S. C., Wentzel, A. L., Freilino, M. L., *et al.* (2006). Cross-talk between G protein-coupled receptor and epidermal growth factor receptor signaling pathways contributes to growth and invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*; 66 (24): 11831-9

Thome, M. and Tschopp, J. (2001). Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol*; 1 (1): 50-8

Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*; 267 (5203): 1456-62

Threadgill, D. W., Dlugosz, A. A., Hansen, L. A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., *et al.* (1995). Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science*; 269 (5221): 230-4

Torring, N., Sorensen, B. S., Bosch, S. T., Klocker, H. and Nexø, E. (1998). Amphiregulin is expressed in primary cultures of prostate myofibroblasts, fibroblasts, epithelial cells, and in prostate tissue. *Prostate Cancer Prostatic Dis*; 1 (5): 262-267

Toyooka, S., Toyooka, K. O., Miyajima, K., Reddy, J. L., Toyota, M., Sathyanarayana, U. G., *et al.* (2003). Epigenetic down-regulation of death-associated protein kinase in lung cancers. *Clin Cancer Res*; 9 (8): 3034-41

Tracy, S., Mukohara, T., Hansen, M., Meyerson, M., Johnson, B. E. and Janne, P. A. (2004). Gefitinib induces apoptosis in the EGFR858R non-small-cell lung cancer cell line H3255. *Cancer Res*; 64 (20): 7241-4

W. D. Travis, E. Brambilla, H. K. Müller-Hermelink and C. C. Harris, Eds., Eds. (2004). WHO Classification of tumors. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon, IARC Press

Tsao, D. A., Yang, M. J., Chang, H. J., Yen, L. C., Chiu, H. H., Hsueh, E. J., *et al.* (2009). A fast and convenient new technique to detect the therapeutic target, K-ras mutant, from peripheral blood in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*;

Tsao, M. S., Sakurada, A., Cutz, J. C., Zhu, C. Q., Kamel-Reid, S., Squire, J., *et al.* (2005). Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med*; 353 (2): 133-44

Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Hattori, S., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., *et al.* (2004). JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *Embo J*; 23 (8): 1889-99

## U

Ushiro, H. and Cohen, S. (1980). Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J Biol Chem*; 255 (18): 8363-5

## V

Van Cruchten, S. and Van Den Broeck, W. (2002). Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol*; 31 (4): 214-23

Vignot, S. and Besse, B. (2007). [Gemcitabine and non small-cell lung cancer]. *Bull Cancer*; 94 Spec No Actualites S95-103

## W

Wang, X. D., Reeves, K., Luo, F. R., Xu, L. A., Lee, F., Clark, E., *et al.* (2007). Identification of candidate predictive and surrogate molecular markers for dasatinib in prostate cancer: rationale for patient selection and efficacy monitoring. *Genome Biol*; 8 (11): R255

Wang, X., Masri, S., Phung, S. and Chen, S. (2008). The role of amphiregulin in exemestane-resistant breast cancer cells: evidence of an autocrine loop. *Cancer Res*; 68 (7): 2259-65

Ward, W. H., Cook, P. N., Slater, A. M., Davies, D. H., Holdgate, G. A. and Green, L. R. (1994). Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. Investigation of catalytic mechanism, structure-based searching and discovery of a potent inhibitor. *Biochem Pharmacol*; 48 (4): 659-66

Weber, R. (1964). Ultrastructural Changes in Regressing Tail Muscles of *Xenopus* Larvae at Metamorphosis. *J Cell Biol*; 22 481-7

Weil, M., Raff, M. C. and Braga, V. M. (1999). Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Curr Biol*; 9 (7): 361-4

Ettinger and S. David, Eds. (2001). Thoracic Oncology. Part I-2 : The epidemiology of Lung Cancer.

Willmarth, N. E. and Ethier, S. P. (2006). Autocrine and juxtacrine effects of amphiregulin on the proliferative, invasive, and migratory properties of normal and neoplastic human mammary epithelial cells. *J Biol Chem*; 281 (49): 37728-37

Witta, S. E., Dziadziuszko, R., Yoshida, K., Hedman, K., Varella-Garcia, M., Bunn, P. A., Jr., *et al.* (2009). ErbB-3 expression is associated with E-cadherin and their coexpression restores response to gefitinib in non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol*; 20 (4): 689-95

Witta, S. E., Gemmill, R. M., Hirsch, F. R., Coldren, C. D., Hedman, K., Ravdel, L., *et al.* (2006). Restoring E-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines. *Cancer Res*; 66 (2): 944-50

Wood, W., Turmaine, M., Weber, R., Camp, V., Maki, R. A., McKercher, S. R., *et al.* (2000). Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development*; 127 (24): 5245-52

Wu, M., Rivkin, A. and Pham, T. (2008). Panitumumab: Human monoclonal antibody against epidermal growth factor receptors for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Clin Ther*; 30 (1): 14-30

Wu, W. G., Soria, J. C., Wang, L., Kemp, B. L. and Mao, L. (2000). TRAIL-R2 is not correlated with p53 status and is rarely mutated in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*; 20 (6B): 4525-9

## X

Xin, M., Gao, F., May, W. S., Flagg, T. and Deng, X. (2007). Protein kinase Czeta abrogates the proapoptotic function of Bax through phosphorylation. *J Biol Chem*; 282 (29): 21268-77

## Y

Yamada, M., Ichikawa, Y., Yamagishi, S., Momiyama, N., Ota, M., Fujii, S., *et al.* (2008). Amphiregulin is a promising prognostic marker for liver metastases of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*; 14 (8): 2351-6

Yamane, S., Ishida, S., Hanamoto, Y., Kumagai, K., Masuda, R., Tanaka, K., *et al.* (2008). Proinflammatory role of amphiregulin, an epidermal growth factor family member whose expression is augmented in rheumatoid arthritis patients. *J Inflamm (Lond)*; 5 5

Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2 (2): 127-37

Yonesaka, K., Zejnullahu, K., Lindeman, N., Homes, A. J., Jackman, D. M., Zhao, F., *et al.* (2008). Autocrine production of amphiregulin predicts sensitivity to both gefitinib and cetuximab in EGFR wild-type cancers. *Clin Cancer Res*; 14 (21): 6963-73

Yoo, J. Y., Kim, J. H., Kim, J., Huang, J. H., Zhang, S. N., Kang, Y. A., *et al.* (2008). Short hairpin RNA-expressing oncolytic adenovirus-mediated inhibition of IL-8: effects on angiogenesis and tumor growth inhibition. *Gene Ther*; 15 (9): 635-51

Yosypiv, I. V., Schroeder, M. and El-Dahr, S. S. (2006). Angiotensin II type 1 receptor-EGF receptor cross-talk regulates ureteric bud branching morphogenesis. *J Am Soc Nephrol*; 17 (4): 1005-14

## Z

Zembutsu, H., Ohnishi, Y., Daigo, Y., Katagiri, T., Kikuchi, T., Kakiuchi, S., *et al.* (2003). Gene-expression profiles of human tumor xenografts in nude mice treated orally with the EGFR tyrosine kinase inhibitor ZD1839. *Int J Oncol*; 23 (1): 29-39

Zhang, W., Peyton, M., Xie, Y., Soh, J., Minna, J. D., Gazdar, A. F., *et al.* (2009). Histone deacetylase inhibitor romidepsin enhances anti-tumor effect of erlotinib in non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines. *J Thorac Oncol*; 4 (2): 161-6

Zhou, Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V. M. and Salvesen, G. S. (1997). Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J Biol Chem*; 272 (12): 7797-800

Zochbauer-Muller, S., Gazdar, A. F. and Minna, J. D. (2002). Molecular pathogenesis of lung cancer. *Annu Rev Physiol*; 64 681-708



# **Annexes**



## Classification histologique des tumeurs malignes du poumon

### **Carcinome à petites cellules**

Variantes : Carcinome composite à petites cellules

### **Carcinome épidermoïde\***

Variantes : Papillaire  
À cellules claires  
À petites cellules  
Basaloïde

### **Adénocarcinome\***

Acineux  
Papillaire  
Carcinome bronchiolo-alvéolaire  
non mucineux (cellules de Clara/pneumocyte de type II)  
mucineux (cellules caliciformes)  
mixte mucineux et non mucineux  
Adénocarcinome solide  
Adénocarcinome avec sous-types mixtes  
Variantes : Adénome embryonnaire bien différencié  
Adénocarcinome mucineux (« colloïde »)  
Cystadénocarcinome mucineux  
Adénocarcinome à cellules en bague  
Carcinome à cellules claires

### **Carcinome à grandes cellules**

Variantes : Carcinome neuro-endocrine à grandes cellules  
Carcinome neuro-endocrine composite à grandes cellules  
Carcinome basaloïde  
Carcinome de type lymphoépithéliome  
Carcinome à cellules claires  
Carcinome à grandes cellules et rhabdoïde

### **Carcinome adénoquameux**

#### **Carcinomes avec éléments pléomorphes, sarcomatoïdes ou sarcomateux**

Carcinomes à cellules fusiformes ou à cellules géantes  
Carcinome pléomorphe  
Carcinome à cellules fusiformes  
Carcinome à cellules géantes  
Carcinosarcome  
Blastome pulmonaire

#### *Tumeur carcinoïde*

Carcinoïde typique  
Carcinoïde atypique

#### *Tumeurs des glandes bronchiques*

Carcinome mucoépidermoïde  
Carcinome adénoïde kystique  
Autres

\* Classement : bien différencié, modérément différencié et peu différencié.

### **Annexe 1. Classification histologique des tumeurs malignes pulmonaires selon l'OMS**

Adapté d'après Brambilla *et al.*, 2001

	OMS Grade 1	OMS Grade 2	OMS Grade 3	OMS Grade 4
<b>Alopécie</b>	Perte des cheveux	Alopécie modérée en plaques	Alopécie complète mais réversible	Alopécie irréversible
<b>Toxicité cutanée</b>	Erythème	Desquamation, vésicules	Suintement, ulcération	Fièvre avec hypotension
<b>Cardiotoxicité</b>	Mineure - Ne nécessite pas l'arrêt du traitement	Moderée - Ne nécessite pas l'arrêt du traitement	Sévère	Intolérable
<b>Mucite</b>	Douleur, érythème	Erythème, ulcère, alimentation solide	Ulcération, alimentation liquide uniquement	Alimentation impossible Voie parentérale
<b>Myélotoxicité (adulte)</b>				
- Anémie (Hb en g/dl)	9,5 à 10,9	8 à 9,4	6,5 à 7,9	< 6,5
- Leucopénie (L en G/l)	3 à 3,9	2 à 2,9	1 à 1,9	< 1
- Neutropénie (PNN en G/l)	1,5 à 1,9	1 à 1,4	0,5 à 0,9	< 0,5
- Thrombopénie (P en G/l)	75 à 99	50 à 75	25 à 50	< 25
<b>Hémorragie</b>	Pétéchie	Moderée	Moyenne	Importante
<b>Infection</b>	Mineure	Moderée	Majeure	Choc infectieux
<b>Nausées, vomissements</b>	Nausées	Vomissements transitoires	Vomissements nécessitant un traitement antiémétique	Vomissements incoercibles
<b>Diarrhée</b>	Transitoire < 2 jours	Tolérable > 2 jours	Intolérable, demandant un traitement	Hémorragique Déshydratation
<b>Neurotoxicité, état de conscience</b>	Assoupissements	Somnolence < 50% des heures d'éveil	Somnolence > 50% des heures d'éveil	Coma
<b>Neurotoxicité périphérique</b>	Paresthésies légères et/ou diminution des réflexes ostéotendineux	Paresthésies sévères et/ou faiblesse musculaire modérée	Paresthésies intolérables et/ou perte motrice marquée	Paralyse
<b>Stérilité</b>				
<b>Cancer secondaire</b>				

Hb=Hémoglobine, L=Leucocytes  
PNN=Polynucléaires neutrophiles  
P=Plaquettes, G/l=Giga/l=10<sup>9</sup>/l

Annexe 2. Principaux effets secondaires des anticancéreux. Classification par stades de gravité de l'OMS. D'après Anticancéreux: utilisation pratique (5ème édition), Dossiers du CNHIM, 2004, XXV, 4-5.

**EXIGENCES DE QUALITE DANS LA PRISE EN CHARGE DES CANCERS BRONCHIQUES**

- Les modalités de prise en charge du patient font l'objet d'une discussion pluridisciplinaire, tenant compte de son âge, de ses co-morbidités, le stade TNM et la situation sociale. Les informations sont transmises dans les meilleurs délais au médecin traitant.
- Les différents aspects de la maladie et des traitements sont expliqués au patient et à sa famille.
- Des documents d'information sur les différents aspects de la maladie et des thérapeutiques sont disponibles et remis au patient.
- Les protocoles et schémas thérapeutiques sont écrits, disponibles, connus et régulièrement actualisés. Il existe des protocoles relatifs à la prise en charge des effets secondaires
- Le patient doit pouvoir bénéficier d'une aide à l'arrêt du tabagisme
- Le patient doit bénéficier d'une prise en charge de la douleur
- Le patient peut bénéficier de soins palliatifs par une équipe et/ou une structure spécialisée, fixe ou mobile
- Le patient et sa famille peuvent bénéficier d'une prise en charge par un psychologue
- Le patient et sa famille peuvent bénéficier d'une prise en charge par une assistante sociale
- Une recherche d'exposition professionnelle, en vue d'une éventuelle déclaration et réparation, doit être systématique.
- En cas de constatation de plusieurs cas de cancers dans la famille du patient, une consultation d'onco-génétique sera proposée
- Le patient a la possibilité de participer à des protocoles de recherche clinique

Méthodes de notation

Evidence	Bénéfice Substantiel	Bénéfice modéré	Bénéfice minime	Pas de bénéfice
Bonne	A	B	C	D
Modeste	B	B	C	D
Faible	C	C	C	D

**Abréviations**

- AUC : aire sous la courbe
- CBNPC : cancer bronchique non à petites cellules
- cTNM : TNM clinique
- EFR : exploration fonctionnelle respiratoire
- EPO : erythropoïétine
- IRM : imagerie par résonance magnétique
- IV : Intra veineux
- J : jour
- PS : Performance Status
- pTNM : TNM pathologique
- RC : réponse complète
- RP : réponse partielle
- TDM : tomodensitométrie
- TEP : tomographie par émission de positons
- TNM : Tumor – Nodes – Metastasis

Référentiel Cancers Bronchiques Non à Petites Cellules - Octobre 2008 - 2 - Réseau Régional Rhône Alpes Auvergne

**REFERENTIEL REGIONAL**

**CANCER BRONCHIQUE NON A PETITES CELLULES**

**CTEURS** : D ARPIN, A AUBERT, M AUBERT, A BELLIERE, M BERTOCCHI, PY BRICHON, P BRUN, B ET, O CHAPET, E DE LA ROCHE, S DIAB, L FALCHERO, E FAUCHON, P FOURNEL, P FOURNERET, N MOND, L GERINIERE, B GUIBERT, S LARIVE, I MARTEL-LAFAY, B MASTROIANNI, P MERLE, D D-SIBILOT, P MULSANT, H NAGY-MIGNOTTE, A NAMEE, M PEROL, R RIOU, PJ SOUQUET (onco-athérapeute), B TAVIOT, F TRONC, M ZOUAI

Référentiel Cancers Bronchiques Non à Petites Cellules - Octobre 2008 - 1 - Réseau Régional Rhône Alpes Auvergne

### Classification Union Internationale pour la Classification des Cancers 1997

Mountain CF. Revisions in the international item for staging lung cancer. Chest 1997;111:1710-1717.

#### T : TUMEUR PRIMAIRE

**TX :** Tumeur primaire non connue ou tumeur prouvée par la présence de cellules malignes dans les sécrétions broncho-pulmonaires mais non visible aux examens radiologiques et endoscopiques.

**T0 :** Absence de tumeur identifiable

**Tis :** Carcinomes in situ

**T1 :** Tumeur de 3 cm ou moins dans ses plus grandes dimensions, entourée par du poumon ou de la plèvre viscérale, sans évidence d'invasion plus proximale que les bronches lobaires à la bronchoscopie (c'est-à-dire pas dans les bronches souches)

**T2 :** Tumeur avec l'un quelconque des éléments suivants d'extension

\* plus de 3 cm de plus grand diamètre

\* envahissement de la plèvre viscérale quelle que soit la taille de la tumeur, envahissement d'une bronche souche et une distance supérieure à 2 cm de la carène.

\* existence d'une atélectasie ou d'une pneumopathie obstructive étendue à la région hilare mais ne s'étendant pas à tout le poumon.

\* Tumeur quelle que soit sa taille, ayant au moins l'un des caractères invasifs suivants :

\* atteinte de la paroi thoracique (incluant les tumeurs du sommet)

\* atteinte du diaphragme

\* atteinte de la plèvre médiastinale ou du péricarde

\* tumeur dans les bronches souches à moins de 2 cm de la carène sans envahissement carénaire

\* association à une atélectasie ou à une pneumopathie obstructive de tout le poumon

**T4 :** Tumeur quelles que soient ses dimensions, comportant un envahissement quelconque parmi les suivants :

\* médiastin

\* cœur

\* gros vaisseaux

\* trachée

\* œsophage

\* corps vertébraux

\* carène

\* tumeur avec épanchement pleural malin

### Introduction

Le cancer bronchique non à petites cellules représente la forme histologique la plus fréquente des cancers bronchiques. Il est la première cause de décès par cancer dans la population masculine. Son incidence est estimée entre 40 et 70 pour 100 000 en France pour l'homme.

Les facteurs pronostiques défavorables connus restent toujours le stade avancé et le *Performance Status* élevé pour les patients opérés (Fry WA, The National Cancer Data Base report on lung cancer. Cancer, 1996 ; 7 : 1947-55) et pour les patients non opérés le stade élevé, le mauvais *Performance Status*, taux de LDH élevé, anémie et hyperleucocytose (Paesmans M, Prognostic factors for survival in advanced non-small cell lung cancer: uni and multivariate analysis including RECPAM in 1052 patients. J Clin Oncol, 1995 ; 13 : 1221-30).

**N : GANGLIONS REGIONAUX ( cf schéma)**

- NX** envahissement loco-régional inconnu
- N0** : absence de métastase dans les ganglions lymphatiques régionaux
- N1** : métastases ganglionnaires péri-bronchiques homolatérales et/ou hilaires homolatérales incluant une extension directe
- N2** : métastases dans les ganglions médiastinaux homolatéraux ou dans les ganglions sous carinaires
- N3** : métastases ganglionnaires médiastinales controlatérales ou hilaires controlatérales ou scapulaire, sus-claviculaires homo ou contro latérales

**M : METASTASES**

- M0** : pas de métastase à distance
- M1** : existence de métastases à distance

Une nouvelle classification est en cours d'élaboration et devrait être appliquée fin 2009.

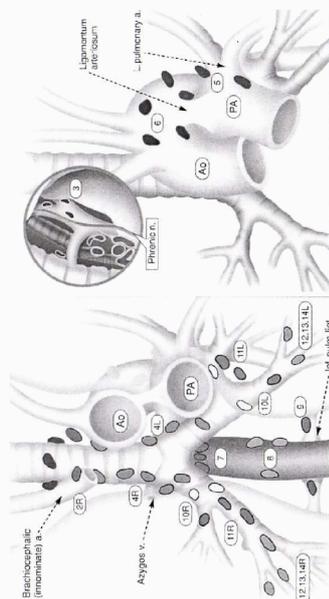
**Remarques**

- La classification TNM est une classification clinique.
- En post-opératoire, avec les données anatomopathologiques, les patients sont reclassés en pTNM suivant les mêmes critères que précédemment.
- NB En cas de 2 foyers néoplasiques dans le même lobe, le cancer est classé T4. En cas de foyers néoplasiques de même histologie dans 2 lobes différents, la tumeur est classée M1.

**CLASSIFICATION PAR STADE**

La classification par stade, permettant de regrouper les patients en stades de pronostic différent

- o **carcinome occulte** Tx N0 M0
- o **stade 0** Tis N0 M0
- o **stade I A** T1 N0 M0
- o **I B** T2 N0 M0
- o **stade II A** T1 N1 M0
- o **II B** T2 N1 M0
- o **stade III A** T3 N0 M0
- o **III B** T1, T2, T3 N2 M0
- o **stade III B** regroupe les patients N3 M0 quel que soit le T et les patients T4 M0 quel que soit le N
- o **stade IV** regroupe les patients M1 quel que soit le T et le N



2R-4R : chaîne paratrachéale droite  
 5 : ganglions sous aortiques  
 7 : ganglions intertrachéobronchiques  
 9 : ganglions du ligament triangulaire  
 12-13-14 : ganglions intralobaires

2L-4L : chaîne paratrachéale gauche  
 6 : ganglions para-aortiques  
 8 : ganglions latéro-oesophagiques  
 10-11 : ganglions intrapulmonaires et extra lobaires

**Bilan pré thérapeutique**

Le bilan pré-thérapeutique doit être réalisé dans des délais les plus courts possibles et dépend évidemment des possibilités d'accès aux examens et de l'état physiologique du patient.

**1. Comment évaluer l'extension anatomique médiastinale de la tumeur ?**

La tomodensitométrie (TDM) est l'examen de référence et de première intention pour détecter une extension anatomique de la tumeur. L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) peut être utile pour apprécier les rapports avec les vaisseaux et le coeur

La fibroscopie bronchique, examen diagnostique, est également un moyen indirect de suspecter les atteintes médiastinales (refoulement, infiltration ou bourgeonnement). La localisation anatomique de ces anomalies oriente la suite des examens.

L'écho-endoscopie est un examen particulièrement performant pour dépister l'extension à la paroi oesophagienne et à l'aorte. Elle permet aussi de réaliser des ponctions de masses tumorales

**2. Comment évaluer l'extension pariétale ? Quelle est la place de la thoracoscopie ?**

La radiographie conventionnelle permet de voir les lésions évidentes (lyse costale, atteinte pleurale majeure). La TDM affine le diagnostic d'extension pleuro-pariétale : s'il existe une lyse costale, l'atteinte pariétale est certaine. A l'opposé, si la lésion est à distance de la paroi, on peut conclure à l'intégrité de la plèvre. Si un liséré graisseux extrapleurale est visible entre la tumeur et la paroi, l'extension pariétale peut être écartée.

suite

**4. Comment évaluer l'extension métastatique ?**

La recherche de tous les sites métastatiques n'est pas forcément nécessaire chez le sujet avec déjà un ou plusieurs sites métastatiques.

La recherche de la preuve histologique d'une lésion métastatique n'est justifiée que si celle-ci est unique et si cela peut modifier la stratégie thérapeutique.

La radiographie thoracique, l'endoscopie et le scanner thoracique effectués dans le cadre de bilan focorégional permettent la recherche d'une éventuelle extension métastatique pulmonaire homo ou controlatérale. Seul un nodule isolé controlatéral non accessible à l'endoscopie peut justifier une démarche complémentaire (ponction trans-thoracique guidée par TDM, et/ou TEP)

Le scanner thoracique initial doit comporter une exploration des surrénales. L'exploration abdominale fait appel à un scanner abdominal et/ou une échographie abdominale.

La scintigraphie osseuse n'est réalisée qu'en cas de suspicion clinique de métastases osseuses. Il faut néanmoins souligner que seule la présence d'une lyse osseuse visualisée par les radiographies dirigées et/ou la TDM et/ou l'IRM affirmera avec une bonne fiabilité, l'extension osseuse. Les zones fixantes doivent être explorées par des examens radiologiques appropriés

La recherche de métastases cérébrales est recommandée en cas de signes cliniques neurologiques. L'examen de référence est l'IRM (TDM en cas de délai excessif).

La TEP a un intérêt pour dépister les extensions métastatiques intra-abdominales, intrathoraciques, et osseuses (elle peut remplacer la scintigraphie osseuse). Elle ne permet pas, par contre, d'explorer le cerveau.

**5. Place de marqueurs tumoraux dans le bilan d'extension** (Utilisation des marqueurs tumoraux sériques dans le cancer bronchique primitif. Recommandations de la Société de Pneumologie de Langue Française. Rev. Mal. Resp., 1997, 14, Suppl.3, 3SS-3S39).

Dans l'état actuel des connaissances, compte tenu des faibles sensibilités et spécificités des marqueurs sériques utilisables dans les CBNPC, ils ne peuvent influencer ni le bilan d'extension ni la décision thérapeutique initiale.

Ils n'ont aucune utilité en dehors d'essais cliniques prospectifs (RMO - Niveau de preuve B).

**6. Les données cliniques et biologiques non spécifiques influencent-elles le bilan d'extension ?**

Le traitement chirurgical doit être d'emblée abandonné sur certains arguments cliniques : en cas d'affection associée contre-indiquant définitivement une excrèse ou une anesthésie générale, en cas de cancer manifestement disséminé (métastases ganglionnaires superficielles, cutanées...), en cas de patients physiologiquement très âgés. L'âge n'est pas à lui seul une contre-indication à une thérapeutique curative. Dans ces éventualités, on s'attachera à réaliser uniquement des investigations qui permettent d'adapter la thérapeutique palliative.

En cas de doute sur l'extension pariétale à l'examen TDM, pouvant influencer l'indication chirurgicale, l'IRM précise : l'atteinte de la gouttière costo-vertébrale, des trous de conjugaison, et de l'espace périural. L'extension vertébrale, vasculaire et nerveuse des tumeurs de l'apex, l'extension diaphragmatique.

En cas d'épanchement pleural visible à la radiographie ou au scanner, la ponction pleurale pour examen cytologique est recommandée. Si l'épanchement est minime, l'échographie en facilite le repérage. En cas de négativité de la cytologie, une thoracoscopie est recommandée lorsqu'il n'existe pas d'autre contre-indication à l'excérèse, afin de préciser le caractère néoplasique ou non de l'épanchement.

**3. Comment évaluer l'extension ganglionnaire intrathoracique ?**

Dès la fibroscopie, on peut suspecter la présence d'adénopathies comprimant les voies aériennes. Des ponctions per-endoscopiques trans-bronchiques à l'aiguille de Wang peuvent être réalisées.

L'examen tomodensitométrique s'attache à décrire les ganglions anormaux (adénopathies) par leur taille, leur nombre, et leur topographie. Le caractère anormal de ces adénopathies ne préjuge pas de leur nature néoplasique. Toutefois, il a été démontré que plus la taille est grande, plus l'envahissement néoplasique est fréquent (de l'ordre de 30 % pour les adénopathies entre 1 et 2 cm, et de plus de 70 % au-delà de 2 cm). Dans cette indication, l'IRM n'est pas supérieure à la TDM, et le couplage de ces deux méthodes de donne pas d'information supplémentaire.

L'échographie endo-oesophagienne permet l'exploration et la ponction éventuelle d'adénopathies sous carénaires (7) para oesophagiques (8,9) ou dans la fenêtre aortopulmonaire (5) (B).  
L'échographie endo-bronchique permet l'exploration et la ponction des adénopathies 2,3,4,7,10,11 (B)

La tomographie par émission de positons (TEP) a une plus grande spécificité et sensibilité que le scanner pour dépister les extensions ganglionnaires, même s'il existe des faux positifs et négatifs.

Une TEP devrait être réalisée chez les patients potentiellement opérables, si l'examen ne rallonge pas le délai de prise en charge.

Une TEP devrait être réalisée pour les patients relevant d'une radiothérapie curative, sans allonger le délai de prise en charge.

L'extension ganglionnaire dépisée à la TEP, doit néanmoins être confirmée, si cela est réalisable, par une médiastinoscopie ou une échographie avec ponction trans-bronchique.

La médiastinoscopie est un acte chirurgical à faible morbidité (entre 0,5 et 1 % selon les séries publiées) ; elle permet d'explorer la face latérale droite et antérieure de la trachée, et la face latérale gauche, la carène, l'axe de la bronche souche droite (2, 4 R et 4 L, 7, 10 R)

La médiastinoscopie n'est pas indispensable en l'absence d'atteinte ganglionnaire en TDM et/ou TEP.

Une thoracoscopie gauche est possible pour explorer les chaînes ganglionnaires 5 et 6

**TRAITEMENT****1. Stade I et II clinique (bilan pré-thérapeutique), patient opérable****1.1. L'artitude thérapeutique :**

- La chirurgie d'exérèse complète large (lobectomie minimum), comportant un curage ganglionnaire complet (A)
- Le curage ganglionnaire minimal recommandé est le suivant :  
Pour l'exérèse lobe supérieur droit ou lobe moyen = 2,4,7,8,10,11 et intra-pulmonaire  
Pour l'exérèse des lobes inférieurs droits et gauches = 4,7,8,9,10,11 et intra-pulmonaire  
Pour l'exérèse du lobe supérieur gauche = 5,6,7,8,10,11 et intra-pulmonaire

Si atteinte 7 ou 4L, indication de curage du médiastin supérieur (2&3)

- La suite du traitement dépend des résultats anatomopathologiques.

Il est recommandé

- que l'acte chirurgical soit réalisé par un chirurgien spécialiste expérimenté (A)
- dans une structure hospitalière pouvant assumer des suites post-opératoires compliquées (Silverstein GA. Specialists achieve better outcomes than generalists for lung cancer surgery. Chest 1998 ; 114 : 675-80).
- La chirurgie du cancer bronchique doit viser les valeurs de référence suivantes :  
Mortalité opératoire : 5 à 10 % pour la pneumonectomie, 2 à 4 % pour la lobectomie

**1.1.1. Exérèse incomplète**

Il y a une indication d'une association chimio-radiothérapie comme pour un cancer localement avancé (cf chapitre) ou d'une radiothérapie isolée (résidu microscopique)(B).

**1.1.2. Tranche de section envahie (R1)**

Un traitement complémentaire est licite, à discuter en concertation multidisciplinaire : soit la chirurgie si elle est possible, soit la radiothérapie (B), suivant l'état clinique et fonctionnel du patient.

S'il s'agit que d'un simple carcinome in situ aux alentours de la tranche de section ou si l'exérèse est limitée (< 1 cm de la tumeur), une simple surveillance est logique (C).

**1.1.3. pN0-N1-N2 :**

- Il n'y a pas d'indication de radiothérapie post opératoire pour les pN0-I (A) ; (Port Meta-analysis Trialists Group. Postoperative radiotherapy in NSCLC: systematic review and meta-analysis of individual patient data from nine randomised controlled trials. Lancet. 1999; 352: 257-63).
- Option : la radiothérapie post opératoire peut diminuer le risque de rechute locale pour les stades III A N2 sans démonstration actuelle d'une amélioration de la survie (C).
- La chimiothérapie post opératoire systématique chez tous les patients en état physique et physiologique de la recevoir est indiquée pour les stades II et III (A)

La recherche complète de métastase(s) est impérative en cas de symptômes cliniques : altération sévère de l'état général avec un PS supérieur à 2 ; perte de poids supérieure à 10 % du poids habituel ; douleurs osseuses, adénomégalies, signes neurologiques ...

Des anomalies biologiques imposent la même attitude : hyperleucocytose, hypoalbuminémie, viscosité de sédimentation très élevée, hypercalcémie, phosphatases alcalines et LDH fortement élevées ...

**Recommandations**

- 1) En cas de cancer bronchique avéré ou suspecté un scanner thoracique doit être réalisé (A)
- 2) En cas d'adénomégalies médiastinales au scanner (> 1 cm petit axe), des explorations complémentaires sont utiles (B)
- 3) Pour les patients opérables avec tumeur résecable, une TEP est recommandée (B)
- 4) Pour les patients relevant d'une radiothérapie curative une TEP est recommandée (B)
- 5) En cas de fixation ganglionnaire médiastinale à la TEP, une confirmation histocytologique est recommandée (B)
- 6) Une IRM thoracique n'est justifiée que pour préciser une atteinte vasculaire ou pariétale suspectée au scanner (B)
- 7) En cas de suspicion de maladie oligométastatique il est recommandé d'obtenir une preuve histo-cytologique. Le dossier devra être systématiquement présenté en RCP. (B)
- 8) La médiastinoscopie est la méthode de choix pour explorer les chaînes ganglionnaires, en cas d'adénomégalies au scanner thoracique et/ou fixant à la TEP et en l'absence de diffusion métastatique (B). Une ponction transbronchique et/ou oesophagienne sous echo endoscopie est une alternative à la médiastinoscopie .
- 9) Les marqueurs tumoraux sanguins ne sont d'aucune utilité pour le diagnostic, suivi et pronostic des cancers bronchiques (B)

**Evaluation cardio respiratoire**

- 10) Les patients devant être opérés d'un cancer bronchique doivent bénéficier d'une évaluation cardiovasculaire clinique au minimum et si besoin para-clinique (B)
- 11) En cas de pathologie artérielle non contrôlée (coronaropathie, artériopathie des membres inférieurs ou carotidiennes, une technique de revascularisation ou stent peut précéder l'intervention thoracique
- 12) Une évaluation fonctionnelle respiratoire complète doit être réalisée (A) avant une chirurgie ou une radiothérapie à visée curative
- 13) L'évaluation du VEMS post opératoire doit être faite en fonction de l'exérèse envisagée, et éventuellement de la scintigraphie pulmonaire de ventilation et perfusion
- 14) Les patients avec une V0 2 max < 15 ml/kg/min (pre-opératoire) et/ou VEMS et DLCO < 40 % théorique en post opératoire, ou Sa O2 < 90 % doivent être considérés comme à haut risque opératoire (C)
- 15) Néanmoins, si le cancer atteint un lobe non fonctionnel, une chirurgie peut être licite, malgré les constantes fonctionnelles (C).

suite

### 3. Formes localement avancées (stades III A et III B)

L'attitude thérapeutique dépend de la possibilité d'une résection complète de la tumeur. Les stades III B (T4 ou N3) sont jugés inopérables sauf quelques cas particuliers (cf. infra). Les limites de la résectabilité concernent les stades III A, en fonction de l'envahissement ganglionnaire homolatéral (N2). En effet, si les adénopathies circonscrites de petit volume à droite, para-trachéales basses ou inter-trachéo-bronchiques, à gauche sous aortiques, para aortiques ou intertrachéo-bronchiques, peuvent être résectées en totalité, les adénopathies para-trachéales hautes volumineuses avec rupture capsulaire, témoignant d'un envahissement médiastinal "en bloc", constituent une contre-indication opératoire. La réalisation d'une médiastinoscopie dans les cas difficiles permet de mieux juger de l'opérabilité. Il est démontré qu'un envahissement microscopique est de moins mauvais pronostic qu'un envahissement massif et qu'une atteinte d'un seul relais ganglionnaire est moins péjorative qu'une atteinte de plusieurs niveaux (Riquet M. Factors determining survival in resected N2 lung cancer. Eur J Cardio-thorac Surg; 1995; 9:300-4) (A).

**Tous les dossiers doivent être discutés en RCP pour déterminer la stratégie optimale (séquence traitement chimiothérapique et traitement local)**

#### 3.1. Stades III A (T1- T2 -T3 N2 M0) résectables chez des patients médicalement opérables

##### 3.1.1 Deux attitudes peuvent être proposées :

\* chirurgie d'exérèse avec un curage ganglionnaire médiastinal complet, précédée de 2 à 4 cycles de chimiothérapie à base de Cisplatine, si l'état général du patient le permet et en l'absence de contre indication. Un doublet contenant du Carboplatine est recommandé en cas de contre indication au Cisplatine (B).

\* chirurgie première avec chimiothérapie post opératoire (association Cisplatine Navelbine, 4 cycles)  
Les dossiers doivent être discutés en RCP.

**3.1.2. En cas d'exérèse incomplète une radiothérapie post opératoire est réalisée (C)**

3.1.3 Option : la radiothérapie post opératoire peut diminuer le risque de rechute locale pour les stades III A N2 sans démonstration actuelle d'une amélioration de la survie (C).

3.1.4. La chimio-radiothérapie pré opératoire ne doit être réalisée que dans le cadre d'essais thérapeutiques.

3.1.5. Pour les IIIA N2 marginalement résectables, l'indication opératoire devra être discutée en cas d'absence de réponse à la chimiothérapie, d'autant plus si le geste chirurgical envisagé est une pneumonectomie (B).

L'utilisation d'un protocole contenant du Cisplatine et de la Vinorelbine est recommandée (A) suivant un schéma 21 jours, 4 cycles.

- o Cisplatine 80 mg/m<sup>2</sup> J1, Vinorelbine 30 mg/m<sup>2</sup> J1 et 8 tous les 21 jours

La chimiothérapie doit être débutée dans les 4 à 8 semaines suivant l'acte chirurgical. En cas de contre indication au cisplatine (âge > 75 ans, PS, comorbidités...), l'efficacité d'une chimiothérapie n'a pas été démontrée.

Option : En cas de contre indication au Cisplatine, une chimiothérapie à base de Carboplatine pourra être réalisée dans des cas particuliers après avis d'une RCP.

En cas d'effets secondaires graves constatés à la Vinorelbine, l'utilisation d'une drogue de troisième génération associée au cisplatine est possible et doit être discutée en RCP.

En cas de décision de radiothérapie, elle sera réalisée après la fin de la chimiothérapie.

Pour les stades p IA, la chimiothérapie post opératoire n'est pas recommandée en dehors d'essai thérapeutique (C). Pour les stades p IB, il n'y a pas d'argument actuel pour recommander de façon systématique une chimiothérapie post opératoire. Dans certains cas pour lesquels le risque de rechute estimé est important, l'indication doit être discutée en RCP.

#### 1.2 Divers

▪ Dans le cas de patient ayant une EFR " limitée", âgé ou fragile, il est licite de n'effectuer qu'un geste limité (wedge resection ou résection non réglée) même si la fréquence des résidues locaux est plus importante et doit être discuté en réunion de concertation multidisciplinaire.

- En cas de tumeur de petite taille (moins de 2 cm), une exérèse limitée par segmentectomie avec curage peut être discutée (C).
- En cas de T3 par atteinte pariétale, si l'exérèse a été complète, il n'y a pas de nécessité de réaliser une radiothérapie post opératoire (C).

#### 2. Stades I et II cliniques inopérables du fait d'une exploration fonctionnelle respiratoire médiocre ou médicalement inopérable.

Si l'état général du patient le permet, une radiothérapie à visée "curative" est proposée (B). En fonction de l'accessibilité du plateau technique : radiothérapie stéréotaxique (stade I avec tumeur inférieure ou égale à 4 cm) ou radiothérapie de conformation « 3 dimensions » (66 à 74 Gy) avec collimateur multifilament et vérification du positionnement, ciblée sur le volume tumoral après avoir éliminé une atteinte médiastinale par une TEP.

Options : Chimiothérapie : associée à la radiothérapie (séquentielle ou concomitante)  
Ablation thermique pour les tumeurs de moins de 3 cm

### 3.2. Stades III A non résecables et III B ou patients non médicalement opérables

**3.2.1. Il y a lieu de réaliser une association de chimiothérapie et de radiothérapie si l'état du patient le permet.** La chimiothérapie doit comporter 2 à 4 cures à base de sels de platine, associée à une radiothérapie à une dose au moins égale à 66 à 70 Gy en étagement classique. (A) Les critères de qualité de la radiothérapie sont disponibles à l'adresse internet suivante <http://concoranet.lyon.fnclcc.fr/radiotherapie/>

**3.2.2. La radiothérapie en split course** ne se conçoit que pour des patients en mauvais état général ou avec une espérance de vie courte (C)

**3.2.3. L'association chimio-radiothérapie concomitante** est recommandée chez les patients avec PS 0 ou 1, sans comorbidité, de moins de 70 ans (entre 70 et 75 ans, peut être discutée) compte tenu de ses meilleurs résultats (A). Une technique de radiothérapie de conformation est indispensable avec évaluation précise des volumes pulmonaires irradiés. La chimiothérapie doit être à base de Cisplatine (à dose cytotoxique), mais sans gemcitabine (sauf essai).

**3.2.4 L'association chimiothérapie-radiothérapie séquentielle** est préconisée chez les patients PS>1 et/ou âgés et/ou fragiles (B)

**3.2.5 La radiosensibilisation** par sel de platine (cisplatine ou carboplatine) ou autre drogue, hebdomadaire, à très faible dose, dans le but unique de radiosensibilisation sans action systémique, ne doit être réalisée que dans le cadre d'essais cliniques (C).

### 3.3. Stade III B : cas particulier des T4

T4 épine et T4 trachée, N0 ou 1, : chirurgie ou radiothérapie exclusive possible, de même que pour des cas sélectionnés avec atteinte, veine cave supérieure, oreillette gauche, corps vertébral. Ces cas doivent être discutés dans le cadre des RCP.

### 3.4. Cas particulier de tumeurs de l'apex (syndrome de PANCOAST-TOBIAS « pur » ou « assimilés »).

Il est recommandé de réaliser une association de chimiothérapie et de radiothérapie jusqu'à 45 Gray, puis une réévaluation en vue d'une chirurgie et/ou poursuite de la radiothérapie jusqu'à une dose de 65 à 70 Gy (B). Chez les patients fragiles, une association radio-chimiothérapie est réalisée (C), voire une radiothérapie seule en « split course » pour les patients douloureux en mauvais état général

En cas de N2 prouvé (médiastinoscopie ou ponction) les patients ne tirent aucun bénéfice d'un acte chirurgical.

Option : Association radiothérapie préopératoire et chirurgie – chimiothérapie post opératoire

## 4. Formes métastatiques stade IV

### 4.1 Résultats

La chimiothérapie palliative permet : d'augmenter la durée de vie (A) et d'augmenter la qualité de vie (A). La chimiothérapie est à base de sels de platine pour les patients PS 0 ou 1 (A), et adaptée pour les PS 2 (B) et chez les patients âgés de plus de 75 ans (B)

### 4.2. Les protocoles de chimiothérapie de première ligne

#### ▪ Pour les patients PS 0 ou 1

Aucun protocole n'a démontré une supériorité par rapport à un autre (B). Une bi-thérapie associant un sel de platine avec une « nouvelle » drogue est plus efficace qu'une monothérapie (B), et aussi efficace et moins toxique qu'une trithérapie (B). Ainsi sont recommandés au sein du réseau les protocoles suivants

- ✓ **CISPLATINE-VINORELBINE**
- CISPLATINE 80 mg/m<sup>2</sup> J1-22
- VINORELBINE 30 mg/m<sup>2</sup> J1 et 8 dans le schéma 21 jours
- ✓ **CISPLATINE-GEMCITABINE**
- CISPLATINE 80 mg/m<sup>2</sup> J1-22
- GEMCITABINE 1250 mg/m<sup>2</sup> J1, J 8 tous les 21 jours
- ✓ **CARBOPLATINE-TAXOL**
- CARBOPLATINE AUC 6 J1-22 (Calvert)
- PACLITAXEL 200 mg/m<sup>2</sup> en 3 heures.
- ✓ **CISPLATINE-DOCETAXEL**
- CISPLATINE 75 mg/m<sup>2</sup> J1
- DOCETAXEL 75 mg/m<sup>2</sup> J1 tous les 21 jours
- ✓ **CISPLATINE-PEMETREXED**
- CISPLATINE 75 mg/m<sup>2</sup> J1
- PEMETREXED 500 mg/m<sup>2</sup> J1 tous les 21 jours (sous convert d'acide folique et vitamine B12) uniquement pour les cancers bronchiques non à petites cellules non épidermoïdes

- **Recommandations** : l'adjonction de Bevacizumab à la chimiothérapie, à la dose de 15 mg/kg toutes les trois semaines, puis poursuivi en monothérapie jusqu'à progression ou toxicité a démontré pour les **carcinomes non épidermoïdes** un bénéfice en terme de survie en association avec une chimiothérapie de type carboplatine-paclitaxel et de survie sans progression aux doses de 7,5 ou 15 mg/kg avec une chimiothérapie de type carboplatine-paclitaxel et cisplatine-gemcitabine. L'AMM préconise son administration à la dose de 7,5 ou 15 mg/kg en association avec une chimiothérapie à base de sel de platine ; les précautions d'emploi et la sélection des patients candidats à recevoir du bevacizumab doivent tenir compte des recommandations de l'AMM. Les doses recommandées sont 7,5 mg/kg avec le cisplatine, et 15 mg/kg avec le Carboplatine Taxol.

#### ▪ Pour les patients PS 2 (ou contre indication au cisplatine, patient fragile) :

suite

- ERLOTINIB 150 mg/j (B)
- PEMETREXED (uniquement pour les cancers bronchiques non épidermoïdes)
- DOCETAXEL

#### 4.4 Traitement de ligne ultérieure

Chez des patients sélectionnés, la reprise de la chimiothérapie doit se discuter en RCP (C).

#### 4.5. Questions diverses

##### 4.5.1 Quand évaluer la réponse ?

La réponse est évaluée après 2 ou 3 cures (B).

##### 4.5.2 Comment évaluer la réponse ?

Elle s'effectue par tomodynamométrie (C) et éventuellement une fibroscopie bronchique.

##### 4.5.3 Durée optimale de la chimiothérapie de première ligne dans les stades IV ?

On réalise 4 à 6 cures (B), moindre si progression ou intolérance.

L'intérêt d'une chimiothérapie de maintenance n'est pas démontré en dehors du Bevacizumab qui doit être poursuivi jusqu'à progression ou toxicité.

#### 4.5.4. Métastase unique de cancer bronchique

- En cas de métastase cérébrale unique résécable, et de cancer bronchique résécable, on peut proposer une intervention neurochirurgicale première (C) avec irradiation pancérébrale en postopératoire. Une radiothérapie stéréotaxique pourra aussi être réalisée dans des conditions précises (1 à 2 lésions, moins de 3 cm au total). Une irradiation pan-encéphalique sera aussi réalisée.
- Les traitements associés sont à discuter en réunion de concertation multidisciplinaire : chirurgie pulmonaire ?, irradiation thoracique ?, chimiothérapie complémentaire ? En cas de contre indication chirurgicale et de radiothérapie stéréotaxique, une radiothérapie cérébrale totale, sera pratiquée.
- Pour les autres sites métastatiques (foie, surrénale), aucune attitude consensuelle n'existe, la discussion se fait au cas par cas en réunion de concertation multidisciplinaire.

#### 4.5.5. Métastases cérébrales multiples

- ✓ CARBOPLATINE- PACLITAXEL (A)
  - CARBOPLATINE AUC 6 J1+22 (Calvert)
  - PACLITAXEL 200 à 225 mg/m<sup>2</sup> en 3 heures.
- ✓ CARBOPLATINE- GEMCITABINE (B)
  - CARBOPLATINE AUC 5 J1
  - GEMCITABINE 1000 mg/m<sup>2</sup> J1 et 8 tous les 21 jours
- ✓ TAXOTERE-GEMCITABINE (B)
  - DOCETAXEL 75 mg/m<sup>2</sup> J8
  - GEMCITABINE 1000 mg/m<sup>2</sup> J1 et 8 tous les 21 jours
- ✓ CARBOPLATINE-PEMETREXED (B) pour les tumeurs non épidermoïdes
  - CARBOPLATINE AUC 5 (Calvert) J1
  - PEMETREXED 500 mg/m<sup>2</sup> J1 tous les 21 jours

Option : monothérapie (Gemcitabine – Vinorelbine),....

##### ▪ Sujet âgé de plus de 70 ou 75 ans et/ou comorbidité :

Une monothérapie (B) ou une chimiothérapie sans cisplatine (C) est licite.

- ✓ GEMCITABINE 1000 à 1250 mg/m<sup>2</sup> J1, 8 tous les 21 jours
- ✓ VINOELBINE 30 mg/m<sup>2</sup> J1 et 8 tous les 21 jours
- ✓ VINOELBINE per os 60 à 80 mg/m<sup>2</sup> hebdomadaire
- ✓ CARBOPLATINE –PACLITAXEL
- ✓ DOCETAXEL 60 mg/m<sup>2</sup> tous les 21 jours
- ✓ CARBOPLATINE- GEMCITABINE
- ✓ CARBOPLATINE – PEMETREXED pour les tumeurs non épidermoïdes

#### 4.2 Chimiothérapie de seconde ligne.

Chez les patients en bon état général et demandeurs, qu'ils aient répondu ou non à une première ligne métastatique, il est recommandé de réaliser une chimiothérapie de seconde ligne

- ✓ DOCETAXEL 75 mg/m<sup>2</sup> J1 tous les 21 jours (A)
- ✓ PEMETREXED 500 mg/m<sup>2</sup> J1 tous les 21 jours sous couvert d'acide folique et de vitamine B12 (A) , uniquement pour les cancers bronchiques non épidermoïdes
- ✓ ERLOTINIB 150 mg/j

#### 4.3 Traitement de troisième ligne

- L'acte chirurgical est suivant les cas une lobectomie ou une résection limitée (*wedge resection*) (A)

### CANCER BRONCHIOLO-ALVEOLAIRE

A coté de la forme « pure » sans atteinte ganglionnaire, métastatique ou pleurale, (véritable cancer *in situ* des alvéoles ), il existe de nombreuses formes frontalières mixte avec des aspects de cancer broncholo-alvéolaires, au sein d'un adénocarcinome, à traiter comme les adénocarcinomes.

Le traitement sera chirurgical si la lésion est « nodulaire » unique (A) ou intralobaire (sans dépasser une lobectomie). Eventuellement une greffe bi pulmonaire dans certains cas privilégiés peut être discutée. Une chimiothérapie est utilisée en cas d'atteinte pluri focale (B). Les protocoles à utiliser sont des doubles à base de Paclitaxel et de Pemetrexed.

En seconde ligne, l'utilisation de l'erlotinib constitue une option de choix pour les formes non mucineuses.

### DEPISTAGE

En dehors d'essai clinique et d'amécédent de cancer, un dépistage systématique chez un patient sans signes fonctionnels respiratoire, même fumeur, par radiographie ou scanner, ou cytologie de crachat n'est pas utile (D)

### CHIMIOPREVENTION

Il est recommandé de ne pas prescrire des agents de chimio-prévention tant dans les groupes à risque (fumeur, exposition professionnelle) que chez des patients traités pour cancer du poumon ou autre cancer ORL (D). La seule prévention efficace est l'arrêt du tabac qui diminue le risque de deuxième cancer et diminue la morbidité post opératoire (B).

### SOINS PALLIATIFS

A coté des traitements chirurgicaux, radiothérapiques, chimiothérapiques et biologiques, une grande part de la thérapeutique est directement fonction des symptômes ressentis par le patient :

- thérapeutiques médicamenteuses : corticoïdes, antalgiques et notamment morphiniques,
- radiothérapie osseuse, cérébrale,
- chirurgie des métastases
- traitements mécaniques : désobstruction bronchique, laser, cryothérapie,thermo coagulation, photochimiothérapie, mise en place de prothèses, curiethérapie endobronchique, chirurgie de décompression
- prise en charge psychologique et sociale du patient et de sa famille

### Facteurs de Croissance Hématopoïétique

Leur utilisation systématique n'est pas recommandée(C).

La chimiothérapie a montré une efficacité comparable à la radiothérapie dans les métastases cérébrales multiples (que la tumeur primitive soit contrôlée ou non) et la même efficacité que dans les autres organes (B). Il est démontré que la chronologie de la radiothérapie cérébrale n'est pas importante par rapport à la chimiothérapie (B). La chronologie des modalités est discutée au cas par cas.

## 5. DIVERS

### 5.1. Cancers métachroniques ou synchrones

Ce ne sont pas des contre-indications opératoires formelles (C) .

### 5.2. Cancer bronchique sur poumon unique

Dans des cas rigoureusement sélectionnés, une exérèse chirurgicale économe peut être réalisée (C) (Massard G, Surgical management for bronchogenic cancer occurring after pneumonectomy. J Thorac Cardiovasc Surg. 1995;109:597-600)

## 6. CANCER RADIO OCCULTE

- En cas de cancer *in situ* il convient de réaliser une évaluation endoscopique bronchique complète compte tenu de la fréquence de la cancérogénèse multifocale (si possible auto-fluorescence). Un traitement conservateur local endobronchique est préconisé compte tenu de la fréquence des seconds cancers (Speiser BL, Strategies for treatment of occult carcinomas of the endobronchus. Chest 1997;111(5):1158-61) (C, B) ; Photochimiothérapie ou cryothérapie en 1<sup>o</sup> intention , curiethérapie endobronchique si échec..... avec une surveillance ultérieure attentive. Option : Thermocoagulation
- Un cancer microinvasif, est traité soit chirurgicalement, soit par un traitement conservateur (curiethérapie) suivant l'état fonctionnel et général du patient

## CONDUITE A TENIR DEVANT UN NODULE PULMONAIRE PERIPHERIQUE

Recommandations

- devant un nodule périphérique, des radiographies anciennes doivent être recherchées pour évaluer l'ancienneté du nodule(C)
- Un nodule inchangé depuis au moins 3 ans ne nécessite plus de surveillance particulière (C)
- Un scanner thoracique est nécessaire devant tout nodule périphérique (B)
- Pour les ditzels (nodules de moins de 5 mm) : scanner thoracique à 1 an et arrêt si non évolution
- Pour les nodules entre 5 et 8 mm, scanner à 3,6 ou 12 mois suivant les facteurs du risque du patient
- Pour les nodules de plus de 8 mm de diamètre, une TEP est nécessaire (B)
- En cas de taille > 2 cm, d'évolutivité incertaine, ou de TEP fixant, une intervention chirurgicale est logique (A)
- Une ponction transpariétale n'est réalisée que si contre indication chirurgicale ou refus de la chirurgie par le patient. (C)
- En cas de négativité de fixation de la TEP une surveillance scannographique est nécessaire (3 mois, 6 mois, 12 mois, 18 mois, 24 mois, 36 mois) (C)

Elle est possible en situation préopératoire ou post opératoire dans les stades I à III A, ainsi que chez des patients particulièrement fragiles (plusieurs lignes de chimiothérapie, radiothérapie antérieure) (C)

#### Erythropoïétine

Son utilisation, chez les patients traités par chimiothérapie, est utile pour améliorer la qualité de vie des patients dès la chute du taux d'hémoglobine à moins de 10 g (B). Il est démontré que l'objectif à atteindre est de conserver un taux d'hémoglobine autour de 11 à 12 g/dl, taux ou la qualité de vie du patient est optimale. Au delà du taux, de 12 g/dl le traitement par Erythropoïétine sera interrompu puis repris éventuellement en cas de nouvelle baisse du chiffre de l'hémoglobine. L'érythropoïétine recombinante ne doit pas être utilisée en dehors de son association à la chimiothérapie.

#### Traitement anti émétique

MASCC (Multinational Association of Supportive Care in Cancer Perugia 2004) Niveau B

Risque émétique	Chimiothérapie IV	Chimiothérapie per os
<b>Fort</b>	Cisplatine	
<b>Modéré</b>	Carboplatine, dexaméthasone	Ifosfamide, Vinorelbine, VP 16
<b>Faible</b>	Gemcitabine, Topotécan	Paclitaxel, Docetaxel, Pemetrexed, VP 16,
<b>Minime</b>	Vinorelbine	

#### Risque Fort

Prévention nausées et vomissements aigus : sétrons ( 0,15 mg/kg/8 h Ondansetron, 1 à 3 mg Granisetron), aprepitant 125 mg/ po et dexaméthasone 20 mg IV

Nausées retardées : dexaméthasone 8 mg po x 2, 3 à 4 jours et aprepitant 80 mg/j 2 jours

#### Risque moyen

Aigu : sétron ( 8 mg Ondansetron, 1 mg Granisetron) et dexaméthasone 8 mg IV  
Retardé : dexaméthasone 4 mgx 2, 3 à 4 jours, option : sétron

#### Risque faible

dexaméthasone 4 mg IV

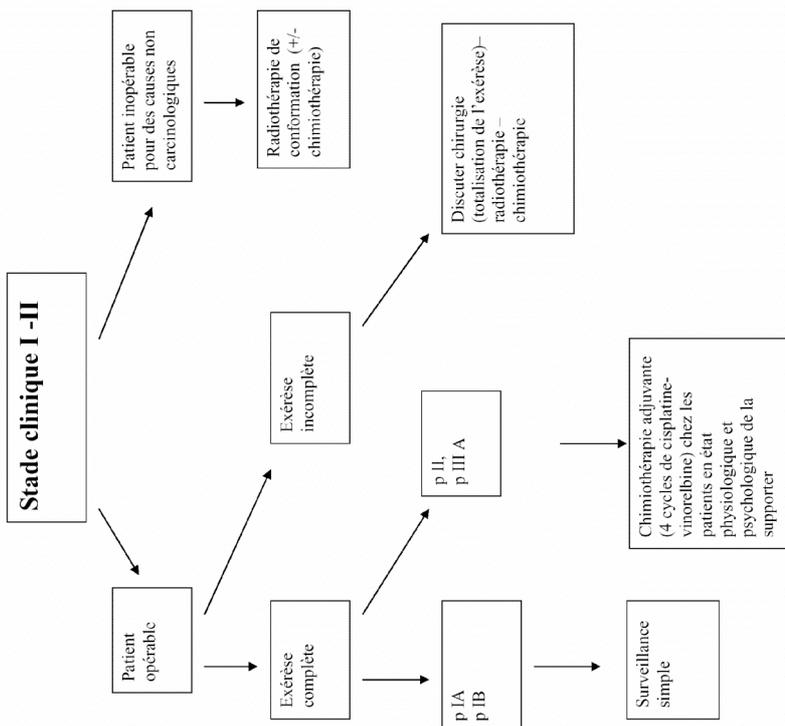
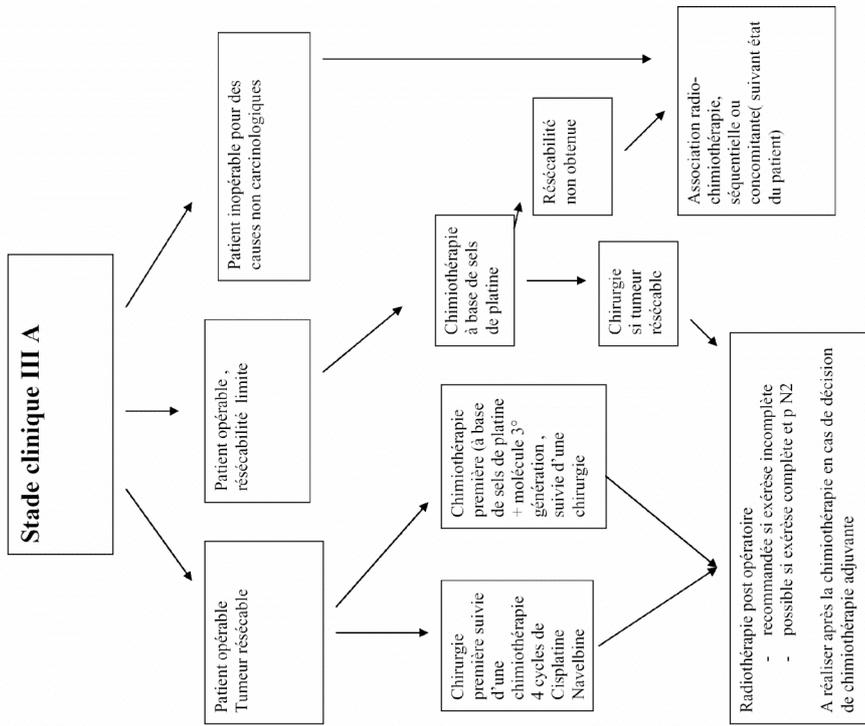
Le meilleur traitement des nausées anticipées et la prévention des troubles digestifs des cures précédentes !!!

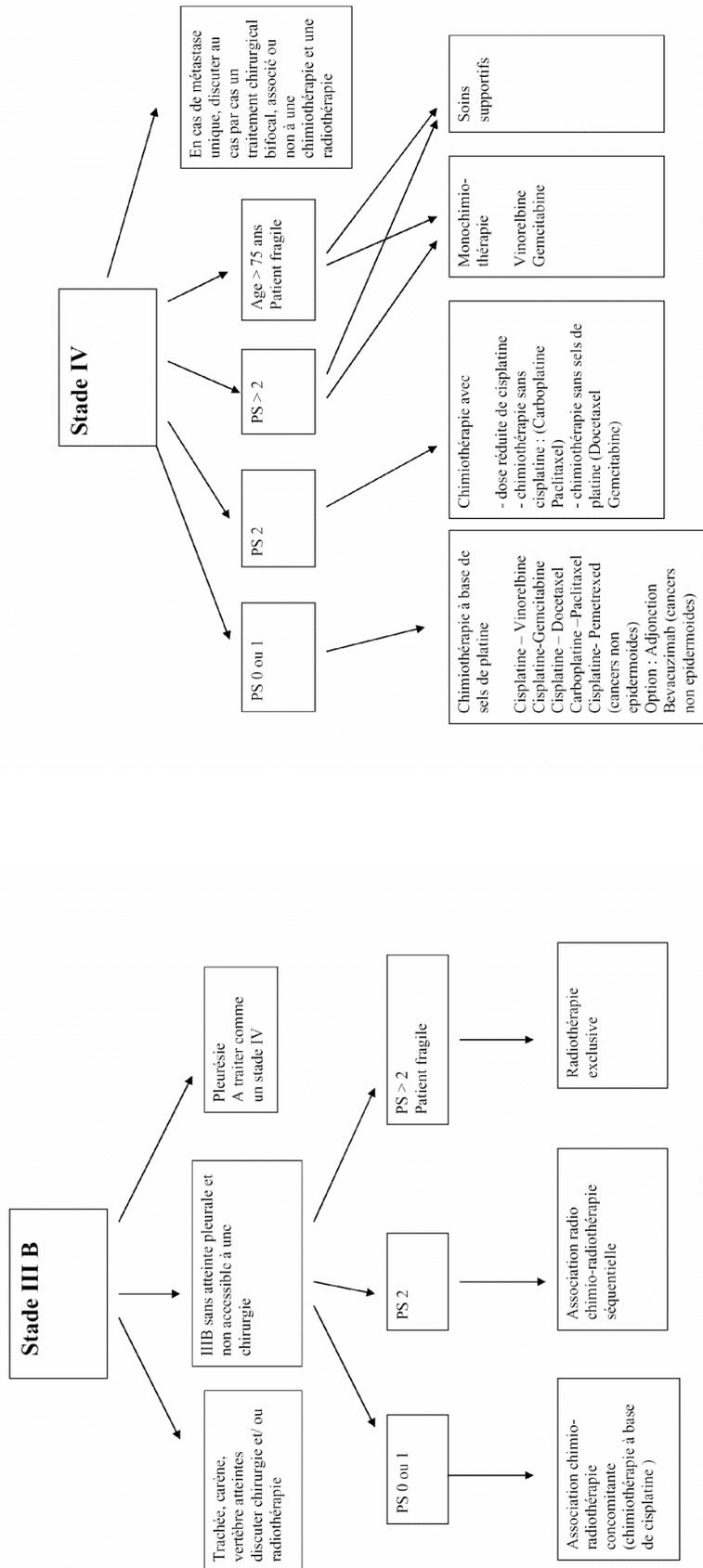
#### SURVEILLANCE

Le patient doit bénéficier d'une surveillance du fait des risques de révélation et de second cancer. Dans le but d'augmenter la survie, l'objectif des cs et examens est de diagnostiquer second cancer ou une rechute accessible à un traitement performant

Aucun consensus n'existe concernant les modalités et la fréquence de surveillance, que le patient ait été traité par chirurgie, chimiothérapie, et/ou radiothérapie.  
L'arrêt du tabac est impératif pour diminuer le risque de second cancer.

Option: Pour les patients opérés : La rechute métastatique survient surtout dans les 2 premières années, la rechute loco régionale en général entre 1 à 3 ans. L'endoscopie bronchique systématique ne serait utile que chez les patients ayant un cancer épidermoïde. Une TDM thoracique régulière est logique pour dépister un second cancer après 3 ans





GORTEC-GETTEC CARISSA		IFCT-0301
Nom d'essai :		
Titre	Essai clinique de phase 2 randomisé testant l'association du ZD1839 (Iressa®) à la radiothérapie post-opératoire et au cisplatine dans les carcinomes des voies aéro-digestives supérieures	Essai de phase 2 randomisé comparant 3 chimiothérapies, par gefitinib ou par gemcitabine ou par docétaxel, chez des patients fragilisés ayant un cancer pulmonaire non à petites cellules de stade IV ou IIIB non accessible à un traitement par radiothérapie
Type d'essai :	thérapeutique	thérapeutique
Phase :	2	2
Etat de l'essai :	ouvert aux inclusions	clos aux inclusions
Avancement :	Ouverture effective le : 30/09/2005 Nombre d'inclusions prévues : 140 Nombre effectif : 30 au 28/02/2008 Clôture prévue le : 30/09/2008	Ouverture effective le : 24/12/2004 Nombre d'inclusions prévues : 126 Nombre effectif : 128 au 18/06/2007 Clôture effective le : 18/06/2007
Organisme promoteur :	Groupe Oncologie Radiothérapie Tête Et Cou (GORTEC)	Groupe Nord d'Oncologie Multidisciplinaire (GNOM)
Collaboration(s) scientifique(s) :	Groupe d'Etude des Tumeurs de la Tête Et du Cou (GETTEC)	Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique (IFCT)
Financement(s) :	Essai prioritaire INCa Astra Zeneca	Sanofi Aventis et Astra Zeneca
Sexe : hommes et femmes	Age : tout âge	Age : entre 18 et 80 ans
Essai avec tirage au sort (randomisé) :	Oui	Oui
Essai avec placebo :	Non	Non
Etendue investigation :	multicentrique - France	multicentrique - France
<b>Registre INCa</b>		
Date de publication :	22/05/2008	29/06/2007
N° d'enregistrement :	RECF0077	RECF0131
adapté d'après <a href="http://www.e-cancer.fr/Les-Essais-Cliniques/">http://www.e-cancer.fr/Les-Essais-Cliniques/</a> , 2008. Rubrique "registre des essais cliniques", mot clé : gefitinib		

## EST Profile

Hs.270833 - AREG: Amphiregulin

### Breakdown by Body Sites

	TPM	Intensité du spot	
adipose tissue	0		
adrenal gland	0		
ascites	0		
bladder	0		
blood	8		TPM = Transcrits par million
bone	0		
bone marrow	40		
brain	0		
cervix	20		
connective tissue	0		
ear	0		
embryonic tissue	0		
esophagus	148		
eye	0		
heart	0		
intestine	29		
kidney	0		
larynx	0		
liver	52		
lung	20		
lymph	0		
lymph node	21		
mammary gland	12		
mouth	0		
muscle	0		
nerve	0		
ovary	0		
pancreas	0		
parathyroid	0		
pharynx	0		
pituitary gland	0		
placenta	45		
prostate	15		
salivary gland	0		
skin	14		
spleen	0		
stomach	102		
testis	0		
thymus	0		
thyroid	0		
tonsil	0		
trachea	19		
umbilical cord	0		
uterus	4		
vascular	38		

## EST Profile

Hs.270833 - AREG: Amphiregulin

### Breakdown by Health State

	TPM	Intensité du spot	
adrenal tumor	0		
bladder carcinoma	0		
breast (mammary gland) tumor	21		TPM = Transcrits par million
cervical tumor	28		
chondrosarcoma	0		
colorectal tumor	26		
esophageal tumor	173		
gastrointestinal tumor	75		
germ cell tumor	0		
glioma	0		
head and neck tumor	0		
kidney tumor	0		
leukemia	0		
liver tumor	51		
lung tumor	9		
lymphoma	0		
non-neoplasia	0		
normal	8		
ovarian tumor	0		
pancreatic tumor	0		
primitive neuroectodermal tumor...	0		
prostate cancer	19		
retinoblastoma	0		
skin tumor	0		
soft tissue/muscle tissue tumor	0		
uterine tumor	0		

Source : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Hs.270833>



ELSEVIER  
MASSON

Disponible en ligne sur  
 ScienceDirect  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
  
www.em-consulte.com

PATHOLOGIE  
BIOLOGIE

Pathologie Biologie xxx (2008) xxx-xxx

Editorial

## The increasing role of amphiregulin in non-small cell lung cancer

### Le rôle grandissant de l'amphiréguline dans le cancer du poumon non à petites cellules

**Keywords:** Amphiregulin; Non-small cell lung cancer; Gefitinib; Growth factor; Apoptosis; Drug resistance; EGFR; Targeted therapy; Tyrosine kinase inhibitors

**Mots clés :** Amphiréguline ; Cancer bronchique non à petites cellules ; Gefitinib ; Facteur de croissance ; Apoptose ; Résistance aux traitements ; EGFR ; Thérapie ciblée ; Inhibiteurs de tyrosine kinase

Amphiregulin (AREG) is an 84-aminoacid glycoprotein discovered in the late 80s by M. Shoyab et al. AREG was originally isolated from the conditioned medium of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-stimulated MCF-7 human breast carcinoma cell line. The human AREG gene (GeneID 374) is located on the q13-q21 region of chromosome 4, and is composed of six exons encoding the preprotein mRNA transcript. AREG is thus synthesized as a 252-amino acid transmembrane precursor, named pro-AREG. Pro-AREG is subjected to sequential proteolytic cleavage at the plasma membrane within the ectodomain that leads to released N-glycosylated soluble AREG forms. This shedding is essentially mediated by tumor-necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE), a member of the disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family also known as ADAM-17.

The AREG gene expression profile indicates that AREG is constitutively expressed in various tissues, mainly in the genitourinary and reproductive systems, as well as in the gastrointestinal tract, but also in bone marrow, liver and in the respiratory tract.

AREG is a member of the epidermal growth factor (EGF) family of proteins, which includes EGF itself, transforming growth factor alpha, heparin-binding EGF-like growth factor, betacellulin, and neuregulin. AREG binds to and activates the EGF receptor (EGFR or ErbB1) through autocrine, paracrine and juxtacrine mechanisms. The EGFR is widely expressed on epithelial cell membranes. The binding of AREG to EGFR induces autophosphorylation of the EGFR intracellular tyrosine kinase domain, which in turn activates two major intracellular pathways, i.e. the MEK/ERK1/2 and the PI3K/AKT pathways. EGFR is for instance involved in cell proliferation and differentiation, cell metabolism, cell migration and survival, as

well as in the control of cell cycle. Furthermore, the EGFR was the first tyrosine kinase receptor to be directly linked to several human tumors. AREG possesses a mitogenic activity for cells and plays a role in several biological processes including nerve generation, bone formation, mammary duct formation, as well as the outgrowth and branching of several tissues such as lung, kidney and prostate. AREG is also expressed in several cancers, inducing cellular responses such as growth, proliferation, migration or invasiveness after the activation of EGFR.

Lung cancer is the leading cause of cancer mortality in the world, both in males and females. Non-small cell lung cancer (NSCLC) accounts for 80% of lung cancers. Once diagnosed, NSCLC 5-year survival rate hardly reaches 12% despite different treatments such as chemotherapy, radiotherapy, and surgery. Such a poor prognosis is partially explained by NSCLC's ability to resist apoptosis and treatments. In this editorial, we report the role of AREG in such resistance mechanisms leading to NSCLC progression.

#### 1. Implication of AREG in NSCLC apoptosis resistance

The ability to evade apoptosis is a hallmark of almost all types of cancers. Cancer cells can acquire resistance to apoptosis through a variety of strategies, including the inactivation of the well-known protein p53. Another way to circumvent programmed cell death is to transmit anti-apoptotic survival signals, essentially through autonomous production of growth factors by the tumor. Cancer cells produce growth factors that can be secreted, thus binding to cell surface receptors and stimulating their own growth and apoptosis resistance in an autocrine manner. The autocrine roles of EGF-like growth factors in lung cancer pathogenesis and in

0369-8114/\$ - see front matter © 2008 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.patbio.2008.10.002

Please cite this article in press as: Busser B, et al. The increasing role of amphiregulin in non-small cell lung cancer. Pathol Biol (Paris) (2008), doi:10.1016/j.patbio.2008.10.002

apoptosis resistance have been extensively studied. The involvement of AREG in autocrine loops of activation is well described in several human malignancies and AREG anti-apoptotic activity is already demonstrated in breast, lung and hepatocarcinomas. In NSCLC, AREG presence is correlated with tumor size, illustrating its functional activity as a growth factor enhancing cell proliferation. AREG is also an indicator of reduced overall survival for NSCLC, suggesting an interesting role as a prognostic marker [1]. AREG, in collaboration with insulin-like growth factor type-1 (IGF-1), inhibits serum deprivation-induced apoptosis in NSCLC cell lines [2]. AREG is able to activate the IGF-1-receptor independently of its own EGF receptor. IGF1-receptor activation is in turn inducing the secretion of AREG and IGF-1 in an autocrine loop. The combination of AREG and IGF-1 and the subsequent receptor activation stimulate an original protein kinase C-dependent MAPK and PI3K-independent pathway that leads to NSCLC apoptosis resistance [3].

## 2. Implication of AREG in NSCLC resistance to treatment

Since autocrine-stimulated mitogenesis and apoptosis resistance contribute significantly to cancer progression, clinical development of anticancer treatments interrupting autocrine loops are under evaluation. In lung cancer, the use of EGFR-tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKI) such as gefitinib and erlotinib can block such autocrine EGFR activation. Gefitinib showed potent anti-tumor effects in clinical trials for NSCLC treatment after previous chemotherapy, but failed to improve overall survival benefit in an unselected population. Predictive markers of EGFR-TKI sensitivity have thus been investigated to identify patients likely to benefit from such a targeted therapy.

As a matter of fact, AREG is involved in NSCLC resistance to EGFR-TKI. Gefitinib responders and non-responders present a differential expression of AREG gene in biopsy samples obtained from gefitinib-treated NSCLC patients. These data are confirmed by RT-PCR, immunohistochemistry, and serologic ELISA assays: AREG is indeed significantly overexpressed in gefitinib non-responders but undetectable in responders. Moreover, NSCLC patients with the worst prognosis and a shorter survival time present high levels of seric AREG, which are correlated with gefitinib resistance [4]. This subset of gefitinib non-responder patients contains principally males, smokers with non-adenocarcinomas NSCLC. Interestingly, independent studies showed that most of gefitinib sensitive patients are principally females, non-smokers with NSCLC adenocarcinomas [5], and with EGFR mutations.

Altogether, these data suggest that seric AREG might be an important predictor of gefitinib resistance among advanced NSCLC patients. In other malignancies, AREG is also responsible for resistance to conventional chemotherapeutic

drug, such as cisplatin, and to hormonal anti-tumor treatments such as exemestane, an oral steroidal aromatase inhibitor.

## 3. Conclusion

The implication of EGF-related growth factors in cancer progression is indisputable. AREG is already involved in various malignancies, and we reported several oncogenic roles for AREG in NSCLC progression. AREG is secreted by tumor cells in an autocrine/paracrine manner, leading to present AREG as a prognostic marker in NSCLC. Furthermore, AREG allows resistance to apoptosis in NSCLC. Anti-AREG antibodies restored an apoptotic activity in NSCLC cells [2], suggesting that AREG might be an interesting target to overcome apoptosis resistance. In addition, AREG is involved in therapeutic resistance in breast cancer and NSCLC, thus suggesting the interest of AREG as a biological marker of sensitivity to both conventional and EGFR-targeted therapy. The use of AREG as a biomarker should be encouraged since AREG is correlated with a poor prognosis, resistance to treatments and to apoptosis.

## References

- [1] Fontanini G, De Laurentiis M, Vignati S, Chine S, Lucchi M, Silvestri V, et al. Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors and receptors and of neoangiogenesis in completely resected stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: amphiregulin and microvessel count are independent prognostic indicators of survival. *Clin Cancer Res* 1998;4:241-9.
- [2] Hurbin A, Dubrez L, Coll JL, Favrot MC. Inhibition of apoptosis by amphiregulin via an insulin-like growth factor-1 receptor-dependent pathway in non-small cell lung cancer cell lines. *J Biol Chem* 2002;277:49127-33.
- [3] Hurbin A, Coll JL, Dubrez-Daloz L, Mari B, Auburger P, Brambilla C, et al. Cooperation of amphiregulin and insulin-like growth factor-1 inhibits Bax- and Bad-mediated apoptosis via a protein kinase C-dependent pathway in non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem* 2005;280:19757-6.
- [4] Ishikawa N, Daigo Y, Takano A, Taniwaki M, Kato T, Hayama S, et al. Increases of amphiregulin and transforming growth factor-alpha in serum as predictors of poor response to gefitinib among patients with advanced non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 2005;65:9176-84.
- [5] Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7:169-81.

B. Busser<sup>a,b</sup>

J.-L. Coll<sup>a</sup>

A. Hurbin<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Inserm U823, institut Albert-Bonniot,  
université Joseph-Fourier, BP 170, La Tronche,  
38042 Grenoble cedex 9, France

<sup>b</sup>UF cancérologie biologique et biothérapie,  
hôpital Michallon, CHRU de Grenoble,  
38000 Grenoble, France

\*Corresponding author.

E-mail address: amandine.hurbin@ujf-grenoble.fr  
(A. Hurbin).

1 October 2008

17 October 2008



**Thèse soutenue par : BUSSER Benoît**

**IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION D'UN NOUVEAU MÉCANISME DE RÉSISTANCE AU GEFITINIB DANS LE CANCER DU POU MON NON-À PETITES CELLULES : ROLE DE L'AMPHIRÉGULINE**

Le cancer bronchique non-à petites cellules (CBNPC) représente 80% des cancers du poumon et possède un pronostic extrêmement médiocre, avec une survie à 5 ans inférieure à 15%. Le gefitinib, une molécule appartenant à la famille des inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR-TKI) a montré de puissants effets anti-prolifératifs dans les CBNPC, mais la grande variabilité des réponses a incité la recherche de marqueurs capables de prédire une résistance ou une sensibilité à ce traitement. Les patients porteurs de CBNPC résistants au gefitinib ont des taux d'amphiréguline (AREG) sérique élevés, suggérant l'implication de l'AREG dans la résistance au gefitinib. Nous avons d'abord cherché à démontrer le rôle de l'AREG dans la résistance au gefitinib des cellules de CBNPC avant d'en décrire le mécanisme moléculaire.

Notre travail montre que l'AREG permet de résister à l'apoptose induite par le gefitinib *in vitro* et *in vivo* en inactivant la protéine proapoptotique Bax. L'AREG induit une diminution du niveau d'expression de Bax et augmente son interaction avec la protéine Ku70, par un mécanisme dépendant de l'acétylation de Ku70. Nous décrivons ainsi un mécanisme original de résistance au gefitinib, dépendant de l'acétylation et contrôlé par un facteur de croissance, l'AREG.

Dans un contexte où le cancer pulmonaire est un problème majeur de santé publique et où la résistance aux traitements reste une des principales préoccupations des professionnels de santé, nos travaux suggèrent des applications potentielles pour la prise en charge clinique des patients porteurs de CBNPC. Ces applications concernent à la fois les domaines diagnostique et thérapeutique. En effet, nous démontrons le rôle central de l'AREG dans la résistance au gefitinib et proposons son utilisation comme biomarqueur prédictif d'une résistance à ce traitement. De plus, nous proposons d'associer les EGFR-TKI à une thérapie anti-AREG ou aux inhibiteurs d'histone-déacétylases, notamment chez les patients porteurs de CBNPC résistants au gefitinib.

**IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF AN ORIGINAL MECHANISM OF RESISTANCE TO GEFITINIB IN NON-SMALL LUNG CANCERS: ROLE OF AMPHIREGULIN**

Non-small cell lung cancer (NSCLC) accounts for 80% of lung cancers and is associated with a very poor prognosis, with a 5-year survival rate remaining below 15%. Gefitinib is a molecule that belongs to Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase inhibitors (EGFR-TKI) family and has shown potent antiproliferative effects in NSCLC. A high variability in clinical responses to this treatment lead to investigate new predictive markers to discriminate gefitinib-responders from non-responders. Patients that are resistant to gefitinib have high seric amphiregulin (AREG) levels, suggesting a role of this growth factor in gefitinib resistance. We investigated whether AREG was involved in gefitinib resistance and we characterized the molecular pathway initiated by AREG.

This work shows that AREG allows resistance to gefitinib-induced apoptosis *in vitro* and *in vivo*, through the inactivation of Bax proapoptotic protein. AREG induces the decrease of Bax expression level as well as an increased interaction between Bax and Ku70, through an acetylation-dependant mechanism. Therefore we describe an original pathway of gefitinib resistance, dependant of acetylation, and controlled by the growth factor AREG.

Lung cancer is a major health problem and NSCLC resistance to treatments represents a worrying phenomenon for clinicians. This work suggests both diagnostic and therapeutic solutions to improve NSCLC care. Effectively, we demonstrated the major role of AREG in NSCLC resistance to gefitinib, and validated its use as a predictive biomarker of non responsiveness to this treatment. Moreover, we suggest the association of EGFR-TKI with histone deacetylase inhibitors, especially for NSCLC patients that are resistant to EGFR-TKI.

**Mots clés** : Amphiréguline, Gefitinib, Cancer bronchique non-à petites cellules, Résistance, Tyrosine kinase, EGFR

**Keywords** : Amphiregulin, Gefitinib, Non-small cell lung cancer, Resistance, Tyrosine kinase, EGFR

**Discipline** : Biologie cellulaire

**Centre de Recherche Inserm U823 - Institut Albert Bonniot – Grenoble I**  
**Équipe 5** : "Identification de cibles thérapeutiques et vectorisation de drogues dans le cancer bronchique non-à petites cellules"

