



HAL
open science

Contrôle de la signalisation oncogénique du mutant L858R de l'EGFR par la protéine suppresseur de tumeur p14ARF dans les adénocarcinomes pulmonaires

Peggy Ozenne

► **To cite this version:**

Peggy Ozenne. Contrôle de la signalisation oncogénique du mutant L858R de l'EGFR par la protéine suppresseur de tumeur p14ARF dans les adénocarcinomes pulmonaires. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV084 . tel-00767340

HAL Id: tel-00767340

<https://theses.hal.science/tel-00767340>

Submitted on 19 Dec 2012

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 obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : Biodiversité du Développement et Oncogénèse

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Peggy OZENNE

Thèse dirigée par le **Docteur Sylvie GAZZERI**

Préparée au sein de l'**Institut Albert Bonniot**, INSERM/UJF

U823, Equipe 2 « Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon », dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Contrôle de la signalisation oncogénique du mutant L858R de l'EGFR par la protéine suppresseur de tumeur p14^{ARF} dans les adénocarcinomes pulmonaires

Thèse soutenue publiquement le « **29 Novembre 2011** »,
devant le jury composé de :

Mme, Marie, WISLEZ

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier - Université de
Médecine Pierre et Marie Curie, Rapporteur

Mr, Olivier, COQUERET

Professeur des Universités - Université d'Angers, Rapporteur

Mme, Elisabeth, BRAMBILLA

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier – Université Joseph
Fourier, Examineur

Mr, Julien, MAZIERES

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier – Université Paul
Sabatier, Examineur

Mme, Amandine, HURBIN

Docteur - Institut Albert Bonniot, Examineur

Mme, Sylvie, GAZZERI

Docteur - Institut Albert Bonniot, Directrice de Thèse



Remerciements

Je remercie le professeur Christian BRAMBILLA de m'avoir accueillie au sein de l'Institut Albert Bonniot, dans son unité INSERM. Cet institut offre un accès extrêmement riche à différentes ressources techniques, ce qui favorise grandement le bon déroulement d'une thèse.

Je remercie également le Professeur Elisabeth BRAMBILLA de m'avoir permise d'intégrer le département « Oncogénèse et Biotechnologies » qu'elle dirige, ainsi que pour les échanges scientifiques particulièrement intéressants au cours des réunions d'équipe.

Je remercie les membres du jury et rapporteurs, les Professeurs Marie Wislez et Olivier Coqueret qui m'ont fait l'honneur de lire, d'évaluer et juger ce travail de thèse, mais également le Professeur Julien Mazières, et le Docteur Amandine Hurbin, pour leur participation à ce jury de thèse.

Je tiens à remercier l'association « AGIR à dom » pour son soutien financier indispensable au déroulement de ma quatrième année.

Un très sincère remerciement pour ma directrice de thèse, le Docteur Sylvie Gazzeri, qui m'a accueillie dans les meilleures conditions dès mon Master 2 jusqu'à la fin de la thèse. Si certaines décisions furent délicates à la fin de mon Master 2, je ne regrette absolument en rien d'être restée dans l'équipe, à travailler sur un sujet que j'ai toujours aimé, sous la direction d'une scientifique qui a les grandes qualités de savoir encadrer, dialoguer avec ses étudiants et leur apprendre réellement le « métier de chercheur ». Je ne sais pas si j'aurai pu trouver meilleure compréhension de mes engagements professionnels annexes à ma thèse avec un autre directeur de thèse... Alors pour tout ton soutien, ton écoute, ta disponibilité et l'ensemble de tes conseils, merci beaucoup Sylvie !

Je voulais également remercier les personnes qui ont contribué chacune à leur façon à l'avancée de cette thèse :

Merci Béatrice pour ton regard scientifique « perfectionniste » : pas un petit résultat caché dans un recoin d'une diapositive ne peut passer à travers ton jugement ! Cela aboutit à des conseils et suggestions scientifiques toujours bien avisés.

Un très grand merci à Pascal et Céline : votre aide et compétence techniques sont d'une extrême nécessité pour le bon fonctionnement de notre équipe. Merci à tous les deux pour les formations que vous offrez à chaque étudiant, ainsi que les incroyables « coup de pouce » expérimentaux, et le tout avec le sourire !

Merci à mes collègues avec qui j'ai commencé ce travail, tout particulièrement Arnaud, toujours présent pour discuter « sciences », mais aussi pour faire le vide et rigoler quand cela s'imposait ! Nos discussions me manquent quelque peu...

Merci à Delphine, « Jeune Padawan » du projet EGFR/p14^{ARF} ! Bien des jours au cours de ma thèse, j'ai pensé à ce moment où je pourrai partager avec un autre étudiant une réflexion et des résultats sur ce sujet. Ce partage est, à mon sens, la clé de la réussite en recherche, et il est d'autant plus facile quand il est fait avec une personne enjouée et vive d'esprit comme toi ! Merci beaucoup car tu m'as également bien aidée à la fin de ce projet.

Les très bonnes conditions de travail dépendent également de l'ensemble des membres des équipes 2 et 5, indissociables partenaires dans la recherche et le partage de bons moments ! Merci à tous d'avoir contribué à cette ambiance à la fois sérieuse et conviviale !

Voilà... j'arrive à la fin de remerciements « professionnels », et j'ai toujours trouvé un peu déplacé de s'étendre sur les remerciements plus « personnels », car, après-tout, une thèse est publique... Cependant, m'arrêter ici dans mes remerciements serait d'une hypocrisie et d'un manque de reconnaissance indescriptibles.

Je remercie infiniment mes parents. J'ai toujours eu la chance de pouvoir choisir mes études sans être jugée, en étant soutenue même dans les moments où j'ai douté de certains choix. Vous m'avez toujours offert le meilleur, à savoir le soutien dans la liberté. Encore merci beaucoup, cette thèse est la vôtre...

Merci aux « vrais » amis que j'ai rencontré ici, à Grenoble, en particulier Bertrand, Elo la Bretonne et Petit Eléphant Bleu. Mes abdominaux n'ont jamais été aussi musclés quand nous étions tous réunis sur Grenoble ! Que de bons moments, au labo, au ski, soirée crêpes, notre unique et fabuleuse randonnée en raquettes, ou encore ce week-end magique à Venise ! Et merci d'être encore là malgré le fait que nous soyons presque aux quatre coins de l'Europe (oui, je pense que la Bretagne est un pays à part en Europe !). Merci pour ces phrases mythiques qui me font encore tellement rire ! Je tenais aussi à vous préciser officiellement quelque chose d'important : le Pulco n'est pas plus efficace que le Limoncello contre les piqures de moustiques....

Merci aussi à toi « Ma P'tite Mag ». Malgré nos évolutions et nos vies différentes, nous ne pouvons nier ce lien olfactif « original » découvert au lycée et qui nous ramène(ra) toujours l'une à l'autre! Merci pour tous les bons moments passés ensemble depuis maintenant dix ans. Et soit sûre : « We will be victorious » !

Merci à Céline, ma binôme d'IUT. Tu as supporté patiemment mes questions au début de notre formation pratique qui constitue finalement l'embryogenèse de cette thèse. Puis, les années suivantes à la faculté ont, d'une certaine façon, fait de nous un binôme pérenne ! Bonne continuation, tu le mérites amplement.

Enfin, un remerciement particulier pour la personne avec qui j'ai partagé cette dernière année de thèse. Passage assez délicat d'une vie professionnelle, tu as supporté avec une incroyable tolérance les jours fériés à travailler, les journées un peu trop longues qui s'étendent vers la nuit et le pire des calvaires : les courses en solitaire ! Merci pour ton humble et solide soutien, merci pour les splendides balades, merci pour les superbes éclats de rire, merci d'être une personne aussi respectueuse et authentique. Je te souhaite le meilleur dans ta vie, et te transmets à mon tour, tout le courage que tu as su me donner cette année.

Liste des Publications et Communications

Ces travaux ont été réalisés dans le centre de recherche INSERM-UJF U823, au sein de l'équipe 2 « Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon », à l'Institut Albert Bonniot, à Grenoble. Ils ont donné lieu aux publications suivantes :

Articles parus dans des revues internationales à comité de lecture

Ozenne P., Daydé D., Brambilla E., Eymin B., Gazzeri S.

P14^{ARF} inhibits the growth of lung adenocarcinoma cells harboring an EGFR L858R mutation by activating a STAT3-dependent pro-apoptotic signalling pathway
Oncogene, en révision.

Ozenne P., Brambilla E., Eymin B., Gazzeri S.

The ARF tumor suppressor: structure, functions and status in cancer.
International Journal of Cancer, Volume 127(10), 2010, pages: 2239-47.

Van Den Broeck A., Ozenne P., Eymin B., Gazzeri S.

Lung cancer: a modified epigenome
Cell Adhesion Migration, Volume 4(1), 2010, pages 107-13.

Communications orales

Ozenne P., Daydé D., Perron P., Barrial C., Brambilla E., Eymin B., Gazzeri S.

P14^{ARF} inhibits the growth of lung adenocarcinoma cells harboring an EGFR L858R mutation by activating a STAT3-dependent pro-apoptotic signalling pathway (Rev. Mal. Respir. 2011 ; Volume 3, N° spécial ; Résumé 17, page 11).

7^{ème} Journées de la Recherche Respiratoire (J2R), 21-22 Octobre 2011, Toulouse, France.

Ozenne P., Daydé D., Van Den Broeck A., Perron P., Barrial C., Brambilla C., Brambilla E., Eymin B., Gazzeri S.

Rôle de la protéine suppresseur de tumeur p14^{ARF} dans le contrôle de la croissance des adénocarcinomes bronchiques médiée par l'EGFR (Rev. Mal. Respir. 2009 ; Volume 26, N° 11 ; Résumé 027, page 16).

5^{ème} Journées de la Recherche Respiratoire (J2R), Octobre 2009, Strasbourg, France.

Communications affichées

Ozenne P., Daydé D., Perron P., Barrial C., Brambilla E., Eymin B., Gazzeri S.

An EGFR/ARF cross-talk controls the growth of lung adenocarcinoma cells (Bull. Cancer supplément mars 2011; Volume 98; Résumé 15, page S17).

6^{ème} Journées Scientifiques du CLARA, 28-29 Mars 2011, Lyon, France.

Ozenne P., Daydé D., Perron P., Barrial C., Brambilla C., Brambilla E., Eymin B., Gazzeri S.

Role of the p14^{ARF} tumor suppressor in EGFR-mediated growth control of lung cancer cells (EJC supplements, June 2010, Volume 8, N°5; Summary 468, page 120; 06-28-2010).

21th Meeting of the European Association for Cancer Research (EACR), 26-29 June 2010, Oslo, Norway.

Ozenne P., Van Den Broeck A., Eymin B., Perron P., Lampreia C., Brambilla C., Brambilla E., Gazzeri S.

Rôle de la protéine suppresseur de tumeur p14^{ARF} dans le contrôle de la croissance des adénocarcinomes bronchiques médiée par l'EGFR (Bull. Cancer 2009; Volume 96, N° spécial ; Résumé 51, page S42).

4^{ème} Journées Scientifiques du CLARA, 24-25 Mars 2009, Lyon, France.

Ozenne P., Van Den Broeck A., Eymin B., Perron P., Lampreia C., Brambilla C., Brambilla E., Gazzeri S.

Role of the p14^{ARF} tumor suppressor in EGFR-mediated growth control of bronchial adenocarcinoma (EJC supplements, July 2008, Volume 6, N°9; Poster 132, page 34; 06-06-2008)

20th Meeting of the European Association for Cancer Research (EACR), July5-8 2008, Lyon, France.

Ozenne P., Van Den Broeck A., Eymin B., Perron P., Lampreia C., Brambilla C., Brambilla E., Gazeri S.

Rôle de la protéine suppresseur de tumeur p14^{ARF} dans le contrôle de la croissance des adénocarcinomes pulmonaires médiée par l'EGFR (Bull. Cancer 2008 ; Volume 95, N° spécial ; Résumé 142, page S77).

3^{ème} Journées Scientifiques du CLARA, 18-19 Mars 2008, Lyon, France.

Ozenne P., Van Den Broeck A., Eymin B., Perron P., Lampreia C., Brambilla C., Brambilla E., Gazeri S.

Rôle de la protéine suppresseur de tumeur p14^{ARF} dans le contrôle de la croissance des adénocarcinomes pulmonaires médiée par l'EGFR (Rev. Mal. Respir. 2007 ; Volume 24, N° 9 ; Résumé 044, page 1211).

3^{ème} Journées de la Recherche Respiratoire (J2R), 12-13 Octobre 2007, Paris, France.

Table des Matières

| | |
|---|-----------|
| <i>Remerciements</i> | 1 |
| <i>Liste des Publications et Communications</i> | 4 |
| <i>Table des Matières</i> | 7 |
| <i>Liste des Figures</i> | 10 |
| <i>Liste des Tableaux</i> | 14 |
| <i>Liste des Abréviations</i> | 15 |
| <i>Avant-Propos</i> | 20 |
| <i>Introduction</i> | 22 |
| A. Cancers broncho-pulmonaires : étiologie, classification, prise en charge thérapeutique | 22 |
| A.1. Etiologie du cancer du poumon | 22 |
| A.2. Classification du cancer du poumon | 23 |
| A.2.1. La classification histologique selon l'OMS | 24 |
| A.2.2. La classification pathologique TNM (pTNM) selon l'UICC | 24 |
| A.3. La carcinogenèse du Cancer Broncho-Pulmonaire Non-à Petites Cellules (CBNPC) | 25 |
| A.4. Prise en charge thérapeutique des CBNPC | 29 |
| A.4.1. Traitements conventionnels | 29 |
| A.4.2. Thérapies ciblées..... | 30 |
| B. Le récepteur à l'EGF | 33 |
| B.1. Membres et structure de la famille HER | 33 |
| B.2. Activation de l'EGFR et voies de signalisations associées | 35 |
| B.2.1. Liaison au ligand spécifique | 35 |
| B.2.2. Voies de signalisation activées par l'EGFR..... | 36 |
| B.3. Altérations de la signalisation de l'EGFR dans les CBNPC | 43 |
| B.3.1. Altérations des ligands de l'EGFR..... | 43 |
| B.3.2. Altérations de l'EGFR dans les CBNPC..... | 44 |
| B.3.3. Altérations majeures des voies de signalisations de l'EGFR dans les CBNPC | 50 |
| B.4. Thérapies anti-EGFR dans les CBNPC | 53 |
| B.4.1. Principe d'action général des EGFR-TKI..... | 53 |
| B.4.2. Le gefitinib et l'erlotinib : des études cliniques à l'utilisation thérapeutique dans les CBNPC..... | 53 |
| B.4.3. Les facteurs de réponse aux EGFR-TKI | 56 |
| B.4.4. Mutations de l'EGFR, CBNPC et réponse aux EGFR-TKI : le trio infernal | 62 |
| C. La protéine suppresseur de tumeur p14^{ARF} : structure, fonctions et statut dans les cancers | 63 |
| C.1. Le locus INK4a/INK4b/ARF : une structure atypique | 63 |
| C.2. La régulation de p14^{ARF} : originale et complexe | 65 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| C.2.1. | Stabilité et renouvellement de p14 ^{ARF} | 65 |
| C.2.2. | Induction de p14 ^{ARF} | 66 |
| C.2.3. | Régulation de la transcription de p14 ^{ARF} | 66 |
| C.3. | Fonctions physiologiques de p14^{ARF} | 68 |
| C.3.1. | p14 ^{ARF} : un constituant essentiel de la voie p53..... | 68 |
| C.3.2. | p14 ^{ARF} : un acteur indépendant de p53 | 70 |
| C.3.3. | Transcription et la maturation des ARN ribosomiaux..... | 72 |
| C.3.4. | Réponse aux dommages de l'ADN..... | 73 |
| C.3.5. | L'autophagie par p14 ^{ARF} : une auto-digestion aux conséquences ambiguës..... | 74 |
| C.3.6. | La sumoylation des partenaires de p14 ^{ARF} : une modification post-traductionnelle aux effets multiples | 75 |
| C.4. | Dérégulations de p14^{ARF} dans les cancers humains et CBNPC | 75 |
| C.4.1. | Délétion homozygote du locus INK4a/ARF: un pour tous, tous pour un | 75 |
| C.4.2. | Hyperméthylation spécifique du promoteur de p14 ^{ARF} | 76 |
| C.4.3. | Mutations des exons 1β et 2..... | 77 |
| C.4.4. | Autres mécanismes | 78 |
| C.4.5. | L'inactivation de p14 ^{ARF} , un indicateur clinique | 78 |
| | Objectifs du travail | 80 |
| | Résultats..... | 82 |
| A. | Matériels et Méthodes | 82 |
| A.1. | Culture cellulaire..... | 82 |
| A.1.1. | Lignées cellulaires et conditions de culture | 82 |
| A.1.2. | Transfection transitoire de vecteurs plasmidiques d'expression | 82 |
| A.1.3. | Transfection transitoire d'ARN interférents | 84 |
| A.1.4. | Traitement à la Cucurbitacine I (JSI-124)..... | 85 |
| A.2. | Analyse de l'expression des ARNm par RT-qPCR | 85 |
| A.2.1. | Extraction des ARN totaux | 85 |
| A.2.2. | RT-PCR | 86 |
| A.2.3. | PCR quantitative (qPCR)..... | 86 |
| A.3. | Analyse de l'expression protéique par western-blotting..... | 87 |
| A.3.1. | Extraction protéique totale..... | 87 |
| A.3.2. | Fractionnement cellulaire..... | 87 |
| A.3.3. | Détermination de la concentration protéique | 88 |
| A.3.4. | Western-blotting | 88 |
| A.4. | Etude de l'apoptose | 90 |
| A.4.1. | Marquage simple de la caspase 3 active | 90 |
| A.4.2. | Co-marquage p14 ^{ARF} /caspase 3 active | 90 |
| A.5. | Immunofluorescence | 91 |
| A.5.1. | Immunofluorescence indirecte détectée par microscopie à épifluorescence | 91 |
| A.5.2. | Immunofluorescence indirecte détectée par microscopie confocale..... | 92 |
| A.6. | Test d'activité luciférase | 92 |
| A.7. | Test statistique | 93 |
| B. | P14^{ARF} inhibe la croissance des cellules d'adénocarcinome pulmonaire exprimant la mutation L858R de l'EGFR en activant une voie pro-apoptotique dépendante de STAT3..... | 94 |

| | |
|--|-------------------|
| B.1. Présentation de l'étude..... | 94 |
| B.2. Résultats | 94 |
| B.2.1. La protéine p14 ^{ARF} inhibe la croissance des cellules exprimant la mutation L858R de l'EGFR en induisant leur apoptose | 94 |
| B.2.2. L'apoptose en réponse à p14 ^{ARF} nécessite l'accumulation de pSTAT3-Y705..... | 95 |
| B.2.3. La voie pro-apoptotique STAT3/p14 ^{ARF} diminue l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 | 96 |
| B.2.4. Le mutant EGFR-L858R diminue l'expression de p14 ^{ARF} et inhibe la signalisation pro-apoptotique p14 ^{ARF} / STAT3/ Bcl2 | 97 |
| B.3. Article | 98 |
| B.4. Conclusion et résultats complémentaires | 99 |
| B.4.1. TIP60 : un acteur de l'inhibition de la voie pro-apoptotique p14 ^{ARF} /STAT3/Bcl-2 ?..... | 99 |
| B.4.2. HDAC7 : un autre complice de TIP60 ? | 102 |
| B.4.3. L'EGFR inhibe l'expression transcriptionnelle et protéique de p14 ^{ARF} | 103 |
| B.4.4. La signalisation pro-apoptotique médiée par STAT3 n'est pas restreinte au mutant EGFR-L858R... .. | 108 |
| C. p14^{ARF} : nouvelle cible transcriptionnelle de STAT3..... | 111 |
| C.1. Présentation de l'étude..... | 111 |
| C.1.1. STAT3 stimule l'expression transcriptionnelle de p14 ^{ARF} | 111 |
| C.1.2. La phosphorylation de STAT3-Y705 est impliquée dans le contrôle de l'expression des transcrits et de la protéine p14 ^{ARF} | 113 |
| C.1.3. STAT3 induit la transcription de p14 ^{ARF} | 116 |
| C.1.4. STAT3 ne contrôle pas l'expression de p16 ^{INK4a} | 119 |
| C.2. Conclusion..... | 120 |
| <i>Conclusion et Discussion</i> | <i>121</i> |
| A. TIP60: un interlocuteur de la voie p14^{ARF}/STAT3/Bcl-2..... | 121 |
| B. L'EGFR-L858R contrôle l'expression de p14^{ARF} | 123 |
| C. Rôle de p14^{ARF} dans la signalisation oncogénique des EGFR mutés au cours de la carcinogénèse bronchique..... | 126 |
| D. Réactivation de la voie pro-apoptotique dépendante de STAT3 : vers de nouvelles combinaisons thérapeutiques ? | 129 |
| <i>Bibliographie</i> | <i>131</i> |

Liste des Figures

Figures de l'Introduction

Figure 1: Nombre de décès et estimation de l'incidence de dix cancers majeurs aux Etats-Unis, par sexe, en 2010.

Figure 2: Lien causal tabagisme/cancer du poumon: pourcentage global de cancers broncho-pulmonaires en fonction de la consommation de tabac.

Figure 3: La carcinogenèse broncho-pulmonaire: une pathologie multi-étapes.

Figure 4: Thérapies ciblées pour le traitement des CBNPC.

Figure 5: Caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'EGFR.

Figure 6: Les ligands des membres de la famille HER.

Figure 7: Les tyrosines phosphorylées de l'EGFR servent de sites de liaison des protéines adaptatrices pour activer les voies de signalisation intracellulaires.

Figure 8: Les principales voies de signalisation activées par l'EGFR.

Figure 9: La voie des MAPK après activation par l'EGFR.

Figure 10: La voie PI3K/AKT après activation par l'EGFR.

Figure 11: La voie JAK/STAT après activation par l'EGFR.

Figure 12: Les principales mutations de l'EGFR observées dans les CBNPC.

Figure 13: Statut mutationnel de l'EGFR (L858R et Del19) observé dans les CBNPC: a) selon l'activité tabagique, b) le sexe, c) l'origine ethnique, d) le type histologique de cancer.

Figure 14: Conséquences biologiques des mutations L858R et Del19 de l'EGFR dans les CBNPC.

Figure 15: Mécanisme d'action des EGFR-TKI: Principe du « choc oncogénique ».

Figure 16: Les différentes sensibilités aux EGFR-TKI selon les mutations du domaine tyrosine kinase de l'EGFR dans les CBNPC.

Figure 17: Répartition des facteurs de résistance acquise aux EGFR-TKI.

Figure 18: Structure du locus INK4a/ARF/INK4b et fonctions biologiques initialement identifiées pour les protéines suppresseur de tumeur p15^{INK4a}, p14^{ARF} et p16^{INK4a}.

Figure 19: p14^{ARF} est un régulateur essentiel de la voie p53.

Figure 20: p14^{ARF} exerce des fonctions suppresseur de tumeur indépendamment de p53.

Figures du Matériels et Méthodes

Figure 21 : Représentation du vecteur plasmidique d'expression pcDNA3.1 (Invitrogen).

Figure 22 : Principe de détection par chimioluminescence dans la technique de western-blotting.

Figure 23: Principe simplifié de détection de l'activité transcriptionnelle par test luciférase.

Figures des Résultats

Figure 24: TIP60 contrôle les expressions de pSTAT-Y705, p14^{ARF} et Bcl-2 dans les cellules exprimant l'EGFR-L858R.

Figure 25: TIP60 contribue à la survie des cellules exprimant l'EGFR-L858R.

Figure 26: TIP60 contrôle les expressions de pSTAT-Y705, et Bcl-2 dans les cellules exprimant l'EGFR-L858R.

Figure 27: p14^{ARF} ne modifie ni l'expression, ni la localisation subcellulaire de TIP60 (H1975).

Figure 28: p14^{ARF} ne modifie ni l'expression, ni la localisation subcellulaire de TIP60 (H3255).

Figure 29: HDAC7 contrôle les expressions de pSTAT3-Y705 et de Bcl-2.

Figure 30: L'EGFR-L858R diminue l'expression des transcrits de p14^{ARF} (H1975, siEGFR).

Figure 31: L'EGFR-L858R diminue l'expression de la protéine p14^{ARF} (H1975, siL858R).

Figure 32: L'EGFR-L858R diminue l'expression des transcrits de p14^{ARF} (H1975, siL858R).

Figure 33: Les mutations et la surexpression de l'EGFR diminuent l'expression protéique de p14^{ARF}.

Figure 34: L'EGFR-Del19 diminue l'expression des transcrits et de la protéine p14^{ARF} (HCC827, siEGFR).

Figure 35: L'EGFR-Del19 diminue l'expression des transcrits et de la protéine p14^{ARF} (HCC827, siDel19).

Figure 36: L'EGFR sauvage diminue l'expression des transcrits et de la protéine p14^{ARF} (H358).

Figure 37: L'accumulation de pSTAT3-Y705 corrèle avec une inhibition de la croissance et à l'induction de l'apoptose des cellules exprimant un EGFR-Del19.

Figure 38: L'accumulation de pSTAT3-Y705 corrèle avec une inhibition de la croissance et à l'induction de l'apoptose des cellules exprimant un EGFR sauvage.

Figure 39: Neutraliser l'expression endogène de STAT3 diminue l'expression de la protéine p14^{ARF} (H1975, H3255).

Figure 40: Neutraliser l'expression endogène de STAT3 diminue l'expression des transcrits de p14^{ARF} (H1975, H3255).

Figure 41: Neutraliser l'expression endogène de STAT3 diminue l'expression des transcrits et de la protéine p14^{ARF} (HCC827, H358).

Figure 42: Neutraliser la phosphorylation de STAT3 sur sa tyrosine Y705 diminue l'expression des transcrits et de la protéine p14^{ARF} (H1975, H3255).

Figure 43: Neutraliser la phosphorylation de STAT3 sur sa tyrosine Y705 diminue l'expression des transcrits et de la protéine p14^{ARF} (HCC827).

Figure 44: L'accumulation de pSTAT3-Y705 augmente l'expression des transcrits et de la protéine p14^{ARF} (H1975, H3255).

Figure 45: L'accumulation de pSTAT3-Y705 augmente l'expression des transcrits et de la protéine p14^{ARF} (HCC827, H358).

Figure 46: p14^{ARF} est une cible transcriptionnelle de STAT3 (H1299).

Figure 47: p14^{ARF} est une cible transcriptionnelle de STAT3 (HCC827, H1975).

Figure 48: Favoriser la liaison à l'ADN de STAT3 diminue l'expression de la protéine p14^{ARF}.

Figure 49: STAT3 active spécifiquement la transcription de p14^{ARF} et non celle de p16^{INK4a}.

Figures de la Conclusion

Figure 50 : Actions hypothétiques du complexe TIP60/HDAC7 sur la voie pro-apoptotique p14^{ARF}/STAT3/Bcl-2.

Figure 51: L'EGFR-L858R se localise principalement à la membrane, mais également dans le noyau.

Figure 52: L'EGFR-L858R se localise à la membrane et dans le noyau.

Figure 53: Schéma hypothétique du contrôle de la voie p14^{ARF}/STAT3/Bcl-2 pro-apoptotique par l'EGFR-L858R.

Figure 54: Schéma hypothétique du contrôle différentiel de la voie IL-6/gp130/STAT3 oncogénique et de la voie p14^{ARF}/STAT3/Bcl-2 pro-apoptotique par l'EGFR-L858R.

Figure 55: Apoptose après traitements individuels ou combinés de Gefitinib, d'ABT-737 et/ou de siPTP-RT.

Liste des Tableaux

Tableaux de l'Introduction

Tableau 1 : Principaux oncogènes activés dans la tumorigenèse des CBNPC.

Tableau 2 : Principaux gènes suppresseurs de tumeur inactivés dans la tumorigenèse des CBNPC.

Tableau 3: Principaux facteurs de sensibilité ou de résistance(primaire ou acquise) aux EGFR-TKI.

Tableau 4 : Facteurs de transcription impliqués dans la régulation du locus INK4a/ARF ou de p14^{ARF} spécifiquement.

Tableau 5 : Altérations de l'expression de p14^{ARF} dans les CBNPC.

Tableaux du Matériels et Méthodes

Tableau 6: Séquences des siARN utilisées au cours des études.

Tableau 7: Séquences nucléotidiques utilisées au cours des qPCR.

Tableau 8: Anticorps utilisés pour les expériences de western-blotting.

Liste des Abréviations

| | |
|--------------------|--|
| ADC | Adénocarcinome |
| ADN | Acide Désoxyribonucléique |
| ADNc | Acide Désoxyribonucléique Complémentaire |
| ADNr | Acide Désoxyribonucléique Ribosomique |
| AKT | RAC-alpha serine/threonine-protein kinase (ou Protein kinase B) |
| AMM | Autorisation de Mise sur le Marché |
| AREG | Amphiréguline |
| p14 ^{ARF} | human Alternative Reading Frame |
| p19 ^{Arf} | mouse Alternative Reading Frame |
| ARF-BP1/Mule | ARF-binding protein1/Mcl1-ubiquitin ligase E3 |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ARNm | Acide Ribonucléique messenger |
| ARNr | Acide Ribonucléique ribosomique |
| ATM | Ataxia telangiectasia Mutated |
| ATR | Ataxia telangiectasia Related |
| ATP | Adénosine Tri-Phosphate |
| BAD | Bcl2-antagonist of cell death |
| BAX | Bcl2-associated X protein |
| Bcl-2 | B-Cell Lymphoma protein-2 |
| Bcl-xl | B-Cell Lymphoma-extra large |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| BTC | Bêtacelluline |
| Caspase | CysteinyI aspartic acid-protease |
| CBPC | Carcinome Broncho-Pulmonaire à Petites Cellules |
| CBNPC | Carcinome Broncho-pulmonaire à Non-à Petites Cellules* |
| Cdk1 | Cyclin Dependant Kinase-1 (ou CDC2) |
| Chk | Check point kinase |
| CtBP2 | C-terminal Binding Protein 2 |
| Del19 | Délétion des codons 746-750 de l'exon 19 du gène de l' <i>egfr</i> |
| DMSO | diméthylsulfoxyde |
| DP-1 | DRTF-1 Polypeptide-1 |

| | |
|--------------|--|
| DRTF-1 | Database of Rice Transcription Factor-1 |
| EPG | Epigène |
| EGF | Epidermal Growth Factor |
| EGFR | Epidermal Growth Factor Receptor |
| EGFR-Y1068 | EGFR phosphorylé sur la Tyrosine 1068 |
| EMT | Epithelial to Mesenchymal Transition |
| EPG | Epigène |
| EPR | Epiréguline |
| ErbB | Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene |
| ERK | Extracellular-Signal-Regulated Kinase |
| FACS | Fluorescence Activated Cell Sorter |
| FADD | Fas-Associated Death Domain protein |
| FasL | Fas Ligand |
| FGF | Fibroblast Growth Factor |
| FHIT | Fragile Histidine Triad |
| FISH | Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization |
| G418 | Généticine |
| GAS elements | Gamma interferon Activation Site elements |
| GDP | Guanosine Diphosphate |
| Grb2 | Growth factor Receptor-Bound protein 2 |
| GSK-3 | Glycogen synthase kinase 3 |
| GTPase | Guanosine Triphosphate hydrolase |
| HB-EGF | Heparin-binding EGF-like Growth Factor |
| Hdm2 | Human Double-Minute 2 |
| HER | Human Epidermal Receptor |
| HGF | Hepatocyte Growth Factor |
| HSP70 | Heat Shock Protein 70 |
| HSP90 | Heat Shock Protein 90 |
| hTERT | human Telomerase Reverse Trascriptase |
| IDEAL | Iressa Dose Evaluation in Advanced Lung cancer |
| IGF-1 | Insulin like Growth Factor-1 |
| IGF-1R | Insulin like Growth Factor-1 Receptor |
| INTACT | Iressa NSCLC Trial Assessing Combination Treatment |

| | |
|---------------|---|
| INTEREST | Iressa Non-small-cell lung cancer Trial Evaluation Response and Survival against Taxotere |
| IL-6 | Interleukine-6 |
| iPASS | Iressa Pan-Asia Study |
| iNOS | inducible Nitric Oxide Syntase |
| JAK | Janus Kinase |
| JSI-124 | Cucurbitacine I |
| L858R | Substitution de la Lysine par Arginine (position 858) |
| LREA | Lysine Arginine Glutamate Alanine |
| MAPK | Mitogen-Activated Protein Kinase |
| Mdm2 | Mouse Double Minute-2 |
| MEF | Mouse Embryonic Fibroblast |
| MEK | MAPK/ERK Kinase |
| MKP1 | MAPK Phosphatase-1 |
| mTOR | mammalian Target of Rapamycin |
| NaCl | Chlorure de Sodium |
| NFκB | Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells |
| NoLS | Nuclear Localization Sequence |
| NRG | Neuréguline |
| NPM | Nucléophosmine |
| OMS | Organisation Mondiale de la Santé |
| pAKT-S473 | AKT phosphorylée sur la Sérine 473 |
| PBS | Phosphate Buffer Saline |
| Pc-G | Groupe Polycomb |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PDK-1 | Phosphoinositide-dependant kinase-1 |
| PE | Phycoérythrine |
| pERK-Y202/204 | ERK phosphorylée sur les Tyrosines 202/204 |
| PFA | Paraformaldéhyde |
| PI3K | Phosphoinositide-3 Kinase |
| PIAS | Protein Inhibitor of Activated STAT |
| PIP3 | Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate |
| PKB | Protein Kinase B |
| PKC | Protein Kinase C |

| | |
|-----------------|---|
| PLC γ | Phospholipase C γ |
| PLD | Phospholipase D |
| Pokemon | POK Erythroid Myeloid Ontogenic factor (<i>voir ZBTB7A</i>) |
| PP2A | Protein Phosphatase 2 |
| pSTAT3-Y705 | STAT3 phosphorylée sur la Tyrosine 705 |
| pSTAT5-Y694 | STAT5 phosphorylée sur la Tyrosine 694 |
| PTB | Phosphotyrosine Binding |
| PTEN | Phosphatase and TENsin-Homologue |
| PTP-1B | Protein Tyrosine Phosphatase-1B |
| PTP-RT | Protein Tyrosine Phosphatase Receptor T |
| pTNM | classification Pathologique “Tumor”, “Nodes”, “Metastasis” |
| PVDF | Polyvinylidene Difluoride |
| RASSF1 | Ras Association domain Family protein 1A |
| RT-qPCR | Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction |
| RANKL | Nuclear Factor-kB Ligand |
| Rb | Retinoblastoma |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfate |
| SH2 | Src Homology Domain 2 |
| siARN | Silencing ARN |
| smARF | Small Mitochondrial Alternative Reading Frame |
| SOCS | Suppressors of Cytokine Signaling |
| Sos | Son of Sevenless |
| SVF | Sérum de Veau Fœtal |
| STAT | Signal Transducer and Activator of Transcription |
| STAT3C | STAT3 constitutivement activée |
| SUMO | Small Ubiquitin-like Modifier |
| TBP1 | Tat-Binding Protein-1 |
| TBS | Tris Buffer Saline |
| TBST | Tris-Buffered Saline and 0.1% Tween 20 |
| TBX | T-Box protein |
| TC-PTP α | T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase- α |
| TC-PTP β | T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase- β |
| TGF- α | Tumor Growth Factor- α |
| TGF- β | Tumor Growth Factor- β |

| | |
|---------|---|
| TIP60 | Tat interacting protein-60 |
| TKI | Tyrosine Kinase Inhibitor |
| TNF | Tumor Necrosis Factor |
| TOPO I | Topoisomerase I |
| TTF-1 | ARN polymerase I Transcription Termination Factor-1 |
| Ubc9 | Ubiquitin Carrier protein 9 |
| UICC | Union Internationale Contre le Cancer |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| VEMS | Volume Expiratoire Maximal par Seconde |
| ZBTB7A | Zinc finger and BTB domain containing 7A (Pokemon) |
| ZD 1839 | Nom chimique du gefitinib (IRESSA®) |

Avant-Propos

En France, si les maladies cardio-vasculaires ont longtemps été la première cause de mortalité, à partir des années 2000, le cancer représente une part prédominante (30%) des décès toutes causes confondues (Aouba A., *et al*, 2007). Cette tendance reflète l'évolution mondiale, avec le cancer comme cause majeure de mortalité tant dans les pays développés que dans les pays en voie de développement (World Health Organization, 2008). Avec le vieillissement de la population, les modifications des modes de vie et de l'environnement, le cancer peut se décrire comme une maladie « contemporaine » en croissance. Parmi les cancers les plus fortement présents à travers le monde, le cancer du poumon occupe une place privilégiée inquiétante (**Figure 1**). Avec une mortalité presque égale à une incidence en croissance (Ferlay F. et al., 2010, GLOBOCAN 2008), et un taux de survie à 5 ans dans moins de 15% des cas (Brambilla E. & Gazdar A., 2009), le cancer du poumon compte parmi les plus agressifs et apparaît comme un sujet préoccupant de santé publique. Par ailleurs, même si la survie des patients atteints de cancer du poumon a doublé entre 1950 et 2000 (Souquet P.J. et al., 1993 ; Johnson D.H., 2000; Schiller J.H. et al., 2002), les résultats obtenus avec les thérapies conventionnelles de type chimiothérapie ou radiothérapie restent très modestes.

Pour pallier au manque d'efficacité du diagnostic précoce et des thérapies du cancer du poumon, biologistes et cliniciens travaillent ensemble pour identifier des marqueurs et des cibles biologiques spécifiques de ce cancer. Une cible particulièrement intéressante est étudiée depuis une dizaine d'années : le récepteur aux facteurs de croissance épidermique « Epidermal Growth Factor Receptor » (EGFR), très souvent surexprimé ou muté dans les adénocarcinomes pulmonaires. La surexpression comme les mutations font de l'EGFR un puissant oncogène et par conséquent une cible thérapeutique privilégiée dans ce type de cancer.

Cependant, si l'utilisation des nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées offre parfois un gain de survie sans progression tumorale, la réponse incomplète ainsi que l'émergence de mécanismes de résistance reflète un manque de connaissances crucial sur les mécanismes moléculaires mis en place lors de ces traitements ciblés.

Dans ce cadre, notre équipe s'attache à caractériser les événements moléculaires et génétiques impliqués dans le développement du cancer du poumon afin d'adapter les traitements au profil de chaque patient.

Estimation du nombre de nouveaux cas

| | | | Hommes | Femmes | | | |
|-------------------------|---------|------|---|-------------------------|--------|-----|--|
| Prostate | 217 730 | 28% |  | Sein | 207090 | 28% | |
| Poumon & Bronches | 116750 | 15% | | Poumon & Bronches | 105770 | 14% | |
| Colon & Rectum | 72090 | 9% | | Colon & Rectum | 70480 | 10% | |
| Vessie | 52760 | 7% | | Utérus | 43470 | 6% | |
| Mélanome de la peau | 38870 | 5% | | Thyroïde | 33930 | 5% | |
| Lymphome Non-Hodgkinien | 35380 | 4% | | Lymphome Non-Hodgkinien | 30160 | 4% | |
| Rein & Pelvis rénal | 35370 | 4% | | Mélanome de la peau | 29260 | 4% | |
| Cavité orale & Pharynx | 25420 | 3% | | Rein & Pelvis rénal | 22870 | 3% | |
| Leucémie | 24690 | 3% | | Ovaires | 21880 | 3% | |
| Pancréas | 21370 | 3% | | Pancréas | 21770 | 3% | |
| Tous cancers | 789620 | 100% | Tous cancers | 739940 | 100% | | |

Estimation de la mortalité

| | | | Hommes | Femmes | | | |
|-------------------------|--------|------|--|-------------------------|-------|-----|--|
| Poumon & Bronches | 86220 | 29% |  | Poumon & Bronches | 71080 | 26% | |
| Prostate | 32050 | 11% | | Sein | 39840 | 15% | |
| Colon & Rectum | 26580 | 9% | | Colon & Rectum | 24790 | 9% | |
| Pancréas | 18770 | 6% | | Pancréas | 18030 | 7% | |
| Foie & voies biliaires | 12720 | 4% | | Ovaires | 13850 | 5% | |
| Intrahépatiques | | | | Lymphome Non-Hodgkinien | 9500 | 4% | |
| Leucémie | 12660 | 4% | | Leucémie | 9180 | 3% | |
| Œsophage | 11650 | 4% | | Utérus | 7950 | 3% | |
| Lymphome Non-Hodgkinien | 10710 | 4% | | Foie & voies biliaires | 6190 | 2% | |
| Vessie | 10410 | 3% | | Cerveau & | 5720 | 2% | |
| Rein & Pelvis rénal | 8210 | 3% | Système nerveux | | | | |
| Tous cancers | 299200 | 100% | Tous cancers | 739940 | 100% | | |

Figure 1: Nombre de décès et estimation de l'incidence de dix cancers majeurs aux Etats-Unis, par sexe, en 2010 (Adapté de Jemal, A. et al., 2010).

Les données sur la mortalité aux Etats-Unis ont été rescencées par le "National Center for Health Statistics" (NCHS) entre 1930 et 2007. Le nombre de nouveaux cas a été estimé après analyse des données d'incidence enregistrées entre 1995 et 2006 (programme SEER "Surveillance, Epidemiology, and End Results" et les registres nationaux sur le cancer ("National Program of Cancer Registries", NPCR).

Introduction

A. Cancers broncho-pulmonaires : étiologie, classification, prise en charge thérapeutique

A.1. Etiologie du cancer du poumon

Le cancer du poumon est une des maladies où le lien causal avec la consommation de tabac a été clairement démontré dès 1952 par les épidémiologistes anglais *Doll* et *Hill*. Les données chiffrées contemporaines estiment que 90% des cancers du poumon sont liés à un tabagisme (passé ou actuel ; actif ou passif) (**Figure 2**).

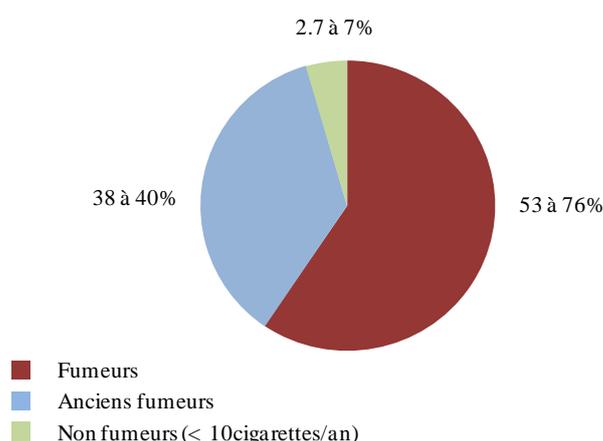


Figure 2: Lien causal tabagisme/cancer du poumon: pourcentage global de cancers broncho-pulmonaires en fonction de la consommation de tabac (D'après *Cataldo J.K. et al., 2010; Peto R. et al., 2000*)

Le risque de survenue du cancer broncho-pulmonaire est favorisé par une durée prolongée du tabagisme (Peto R. et al., 2000) et par le nombre de cigarettes consommées quotidiennement. L'âge du début de la consommation régulière influence également le risque (Le Faou A.L. & Scemama O., 2005). Après l'arrêt de la consommation, le risque diminue sans pour autant devenir nul (Williams M.D. & Sandler A.B., 2001). Le lien causal fort entre le tabagisme et le cancer du poumon est dû à la présence de très nombreuses substances chimiques carcinogènes contenues dans la fumée de cigarette. Parmi une soixantaine de substances ainsi identifiées (Hecht S.S., 2003), les membres des familles des hydrocarbures aromatiques polycycliques (en particulier le benzo- α -pyrène) (Zhong Y. et al., 2011), les nitrosamines, les

phénols, ou encore d'autres substances hautement toxiques telles que le polonium-210 et l'arsenic.

Cependant, 25% des cas de cancer du poumon dans le monde seraient dûs à des facteurs environnementaux indépendamment de la consommation de tabac (Parkin D.M. et al., 2005). Des expositions professionnelles au radon, gaz radioactif naturel sont responsables d'une minorité des cancers broncho-pulmonaires, chez les mineurs en particulier (Lubin J.H. et al., National Institute of Health, 1994), à des minéraux toxiques comme l'amiante (Thiberville L. & Paris C., 2004) ou le charbon, à des métaux comme l'arsenic, le nickel et le chrome, ou encore à certaines substances chimiques utilisées en industrie telles que les éthers de chlorométhyl et le chlorure de vinyl. Certaines personnes travaillant avec des radiations ionisantes ou exposées à une forte pollution atmosphérique peuvent développer un cancer broncho-pulmonaire, mais cela reste relativement marginal (Boffetta P., 2004) (Krewski D. et al., 2006).

Il a été également montré qu'un grand nombre de femmes en Chine n'ayant jamais fumé, développe des cancers du poumon suite à l'exposition prolongée aux vapeurs de cuisson de wok. Cette cuisine traditionnelle génère des substances volatiles carcinogènes telles que les hydrocarbures polycycliques aromatiques et les aldéhydes (Shields P.G. et al., 1995; Chiang T.A. et al., 1999; Yang S.C. et al., 2000).

La proportion importante de cancers du poumon diagnostiquée chez la femme non fumeuse par rapport à l'homme non fumeur semble indiquer un rôle possible des hormones dans l'apparition de ce cancer (Sun S. et al., 2007).

Enfin, il est également très envisageable que d'autres facteurs génétiques puissent influencer l'étiologie du cancer du poumon et expliquer notamment que seuls 10% à 20% des fumeurs développent un cancer (Brambilla E. & Gazdar A., 2009). Ces facteurs génétiques contribueraient aux inégalités de réponses des individus face à des différentes expositions environnementales susceptibles de favoriser le cancer du poumon.

A.2. Classification du cancer du poumon

Deux principales classifications coexistent pour caractériser les cancers du poumon : la classification histologique et la classification pathologique. Elles ont pour buts l'aide au diagnostic et au pronostic et la comparaison des résultats des différentes thérapies entre les groupes de patients. Par ailleurs, aux caractéristiques de classification correspondent très souvent des caractéristiques moléculaires servant d'appui pour le choix des traitements.

A.2.1. La classification histologique selon l'OMS

Une distinction intéressante entre deux catégories de tumeurs malignes a été faite dans le cancer du poumon grâce à la classification histologique. La première catégorie correspond aux Carcinomes Broncho-Pulmonaires à Petites Cellules (CBPC) qui représentent 15 à 25% des carcinomes broncho-pulmonaires. Ces tumeurs sont liées dans 95% des cas au tabagisme. Elles ont un haut grade de malignité, sont très invasives, ont un index mitotique très élevé et une nécrose tumorale souvent intense. Synonyme de mauvais pronostic, la survie des patients atteints de CBPC n'excède généralement pas 2.5 ans.

La seconde catégorie correspond aux **Carcinomes Broncho-Pulmonaires à Non-Petites Cellules (CBNPC)**. Les CBNPC représentent 75 à 85% des cancers du poumon (Herbst R.S. et al., 2008) et se composent de sous-types histologiques très différents : les carcinomes épidermoïdes, les adénocarcinomes et les carcinomes à grandes cellules, ou plus généralement, toute entité ne présentant pas de caractéristiques à « petites cellules » (Beasley M.B. et al., 2005). Une attention particulière sera apportée au cours de cet exposé au sous-type **adénocarcinome (ADC)**, le plus fréquemment diagnostiqué dans le monde (30 à 40% des cancers broncho-pulmonaires) (Travis W.D. et al., 1995 ; Brambilla E. et al., 2001) et le second, en France, après les carcinomes épidermoïdes.

A.2.2. La classification TNM (TNM) selon l'UICC

Il existe deux catégories de classification TNM. La classification clinique cTNM se base sur les données disponibles avant la réalisation du traitement grâce aux examens cliniques, biopsies et tout autre examen complémentaire telle que l'imagerie. Cette classification oriente le choix du traitement. La seconde catégorie est la classification pathologique pTNM qui consiste à évaluer l'extension tumorale après examen macroscopique et microscopique de la pièce de résection par le pathologiste. Elle intervient après le diagnostic histologique, sert de référence au clinicien pour adapter la thérapeutique avec un éventuel traitement adjuvant, permet d'évaluer le pronostic et constitue la base pour les études épidémiologiques. La classification TNM est recommandée par l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) qui a établi la 6^{ème} classification pTNM des cancers bronchiques en 2002 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(s) ganglionnaire(s) (ganglions locorégionaux ou « **N**odes »)

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

La classification pT NM permet d'évaluer l'avancement de la tumeur par stades:

Stade 0 : Cancer *in situ* non invasif

Stade I : Invasion très localisée, sans métastases 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)

A.3. La carcinogenèse du Cancer Broncho-Pulmonaire à Non-Petites Cellules (CBNPC)

Le cancer est une maladie « multi-étapes » résultant de l'accumulation d'aberrations génétiques et épigénétiques sur une période relativement longue, et aboutissant *in fine* à un comportement anarchique de prolifération et de survie cellulaire (**Figure 3**).

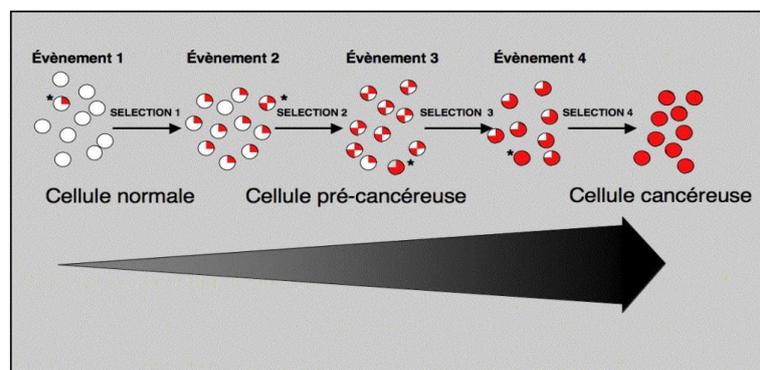


Figure 3: La carcinogenèse broncho-pulmonaire: une pathologie multi-étapes

(Graphisme: Soussi T., http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Multi_Onco.jpg).

En réponse à une exposition répétée et/ou prolongée à différents carcinogènes comme ceux du tabac, un certain nombre d'altérations génétiques et épigénétiques peuvent s'accumuler et conduire à la transformation d'un épithélium broncho-pulmonaire normal en un épithélium broncho-pulmonaire tumoral.

La tumorigenèse est attribuable à l'altération concomitante de deux grands types de gènes au sein d'une cellule: l'activation des **oncogènes** (s'ils sont mutés ou « proto-oncogènes » s'ils

sont sauvages) qui favorisent le déroulement de la division ou de la différenciation cellulaire, et l'inhibition des **gènes suppresseurs de tumeur**, freinant le cycle cellulaire ou induisant la mort cellulaire programmée (apoptose). Plus de vingt altérations génétiques et épigénétiques par tumeur sont identifiables dans les cancers du poumon (Sekido Y. et al., 2003).

Parmi un certain nombre d'oncogènes activés dans les CBNPC par surexpression ou mutation, ont été identifiés la protéine mutante K-Ras (Eberhard D.A. et al., 2005; Shigematsu H. et al., 2005) ou le récepteur de l'EGF (**Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR**) (Riely G.J, et al., 2006 ; Rosell R. et al., 2006 ; Liang Z. et al., 2010). D'autres oncogènes, identifiés dans les CBNPC avec une forte implication dans le développement des adénocarcinomes, sont présentés dans le **Tableau 1**. Le fort niveau d'expression du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) dans 50% des cancers du poumon complète l'action des oncogènes cités ci-dessus en instaurant une forte micro-vascularisation à proximité et dans la tumeur (O'Byrne K.J., et al., 2000 ; Yuan A., et al., 2000).

L'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur est une des étapes les plus précoces de la carcinogenèse broncho-pulmonaire. C'est le cas de la délétion du chromosome 9p21, avec pour conséquence l'inactivation de deux grandes voies de signalisation: la voie p53/p14^{ARF}-Hdm2 et la voie p16^{INK4a}/RB-E2F. De plus, la très haute fréquence de la perte allélique au niveau du bras court du chromosome 3 (70% des CBNPC) souligne également l'importance de plusieurs gènes suppresseurs de tumeur dans cette région du génome (Osada H. & Takahashi T., 2002) : FHIT (Fragile Histidine Triad) (Sozzi G. et al., 1996 ; Croce C.M. et al., 1999) ou l'isoforme A de RASSF1 (Ras Association domain Family protein 1A) (Liu Z. et al., 2010) (**Tableau 2**).

L'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur peut conduire à l'échappement aux programmes de mort cellulaire (apoptose) par la cellule cancéreuse et contribuer à la croissance et à la survie de la tumeur en conditions hostiles. Dans certains cas, une expression soutenue de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 est observable ou encore l'expression des télomérases hTERT est significativement augmentée à différents stades de la carcinogenèse broncho-pulmonaire pour favoriser l'immortalisation des cellules.

La cellule tumorale modifie la balance des signaux envoyés par les oncogènes et ceux envoyés par les gènes suppresseurs de tumeurs afin de favoriser unilatéralement les signaux de prolifération et de survie. C'est ce déséquilibre que les nouvelles thérapies anticancéreuses tendent à compenser notamment en bloquant les signaux anormaux des oncogènes.

| Nom | Fonction | Mécanismes principaux d'activation | Fréquence |
|------------|---|--|---|
| EGFR | Récepteur aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase (famille HER) | Mutations somatiques du domaine TK Amplification génique (copie du gène ou polysomie) Surexpression de la protéine | 10 à 40% ADC 32 à 42% ADC 60% CBNPC (44% ADC - 82% SCC) |
| ERBB2 | Récepteur aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase (famille HER) | Mutation du domaine TK Amplification génique Surexpression de la protéine | 2 à 4% CBNPC (principalement ADC) 2 à 6% ADC 20% CBNPC |
| ERBB3 | Récepteur aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase (famille HER) | Surexpression de la protéine | 16% ADC - 29% SCC |
| K-Ras | Protéine G sous membranaire, transduction du signal de croissance | Mutations somatiques des codons 12 et 13 | 10 à 50% CBNPC (principalement ADC) |
| MET | Récepteur Tyrosine Kinase | Mutations somatiques Amplification génique | 14% ADC 20% ADC |
| PI3KCA | Protéine kinase sous membranaire, transduction du signal de croissance | Amplification génique Mutations somatiques | 4 à 6% CBNPC (surtout SCC) 2% CBNPC |
| TTF-1 | Facteur de Transcription | Amplification génique et surexpression protéique | 15% ADC |
| ALK | Récepteur Tyrosine Kinase | Fusion du gène ALK avec le gène EML4 | 3 à 7% CBNPC (presque exclusivement dans ADC) |
| c-Myc | Facteur de transcription | Amplification/Surexpression | 2.5 à 10% CBNPC |
| β-caténine | Transducteur du signal de la voie Wnt | Mutations dans l'exon 3 | 10% des CBNPC (exclusivement ADC) |

Tableau 1 : Principaux oncogènes activés dans la tumorigenèse des CBNPC.

(D'après Herbst R.S. et al., 2008 ; Pao W. & Girard N., 2011). *Références complémentaires* : **EGFR**: Gazzeri S. et al., 1998 ; Risch A. & Plass C., 2008 ; **ERBB2** : Stephens P. et al., 2004 ; Shigematsu H. et al., 2005 ; Buttitta F. et al., 2006 ; **ERBB3**: Yi E.S. et al., 1997 ; **K-Ras** : Eberhard D.A. et al., 2005 ; Shigematsu H. et al., 2005 ; **PI3KCA** : Yamamoto H. et al., 2008 ; Herbst R.S. et al., 2008 ; Samuels Y. et al., 2004 ; **TTF-1** : Tanaka H. et al., 2007 ; Tang X. et al., 2008 ; **ALK** : Soda M. et al., 2007 ; Inamura K. et al., 2008 ; Horn L. et al., 2009 ; **c-Myc** : Gazzeri S. et al., 1990 ; Risch A. & Plass C., 2008 ; **β-catenin** : Sanders H.R. & Albitar M., 2010. CBNPC: Cancer Broncho-pulmonaire à Non Petites Cellules; ADC: adénocarcinome; SCC (squamous cell carcinoma): carcinome épidermoïde ; TK: tyrosine kinase; HER: Human Epidermal Receptor

| Nom | Fonction | Mécanismes principaux d'inactivation | Fréquence |
|----------------------|--|--|--|
| p53 | « Gardien du génome » : Facteur de transcription Contrôle du cycle cellulaire Réparation ADN Pro-apoptotique | Délétions homozygotes puis mutations | 50% des CBNPC (dont 39 à 50% des ADC) |
| p16 ^{INK4a} | Inhibiteur des CDK 4/6 Régulation transition G1/S | Hyperméthylation du promoteur LOH ou Mutations ponctuelles Délétions homozygotes | 40% à 58% des CBNPC (même fréquence SCC et ADC) |
| Rb | Contrôle du cycle cellulaire en G1/S par interaction avec E2F | LOH Inactivation de la protéine par hyper phosphorylation | 15 à 30% des CBNPC (principalement dans SCC) |
| p14 ^{ARF} | Contrôle du cycle cellulaire G1/S/G2 Pro-apoptotique | LOH Hyperméthylation du promoteur | 25% des CBNPC 40% des ADC |
| PTEN | Phosphatase à activité double (tyrosine et sérine/théonine). Cible majeure : AKT | Hyperméthylation du promoteur Délétions homozygotes Mutations ponctuelles | 24% des cancers broncho-pulmonaires |
| FHIT | Dinucleoside hydrolase Arrêt du cycle G0/G1 Pro-apoptotique | LOH perte du bras court 3p Délétions homozygotes | 40 à 80% CBNPC (principalement dans SCC) |
| RASSF1A | Régulateur négatif de G1/S Pro-apoptose | LOH perte du bras court 3p Hyperméthylation du promoteur | 30 à 40% CBNPC |
| LKB1 /STK11 | Sérine/théonine kinase Régulateur négatif du cycle en G1 | Mutations Ponctuelles Délétions | 8% des CBNPC (dont 34% ADC) |

Tableau 2 : Principaux gènes suppresseurs de tumeur inactivés dans la tumorigenèse des CBNPC.

(D'après Osada H. & Takahashi T., 2002 ; Sanchez-Cespedes M., 2003). Références complémentaires : **p53** : Zochbauer-Muller S., et al., 2002 ; **p16^{INK4a}** : Gazzeri et al., 1998; Sanchez-Cespedes M. et al., 1999 ; **p14^{ARF}** : Nicholson S.A. et al., 2001 ; Mori S. et al., 2004 ; **PTEN** : Forgacs E. et al., 1998; Kohno T. et al., 1998 ; Soria J.C. et al., 2002 ; Jin G. et al., 2010 ; **FHIT** : Sozzi G. et al., 1996 ; Sard L. et al., 1999 ; Croce C.M. et al., 1999 ; Risch A. & Plass C., 2008 ; **RASSF1A** : Liu Z. et al., 2010 ; **LKB1** : Ji H. et al., 2007a ; Rodriguez-Nieto S. & Sanchez-Cespedes M., 2009. CBNPC: Cancer Broncho-pulmonaire à Non Petites Cellules; ADC: adénocarcinome; SCC (squamous cell carcinoma) : carcinome épidermoïde; CDK: Cyclin-Dépendant Kinases 4/6; LOH (Loss of Heterozygosity): perte d'hétérozygotie

A.4. Prise en charge thérapeutique des CBNPC

A.4.1. Traitements conventionnels

Parmi les traitements « conventionnels » les plus anciens, la chirurgie thoracique consiste en la résection complète de la tumeur. Cette intervention efficace dans le cadre d'un diagnostic rapide est néanmoins traumatisante et justifie donc une grande rigueur dans ses indications.

La radiothérapie fut la seconde thérapie utilisée dans le traitement des CBNPC (Dautzenberg B. & Choukroun G., 1998). Il s'agit d'un traitement locorégional du cancer, c'est-à-dire que les rayons agissent directement sur la zone touchée par les cellules cancéreuses et son environnement immédiat.

La chimiothérapie anti-cancéreuse est un traitement systémique médicamenteux adapté pour traiter les cancers non opérables, à fort risque de dissémination ou déjà disséminés: la molécule bloque la division des cellules cancéreuse dans l'ensemble du corps. En dehors de certaines indications bien spécifiques (Sculier J.P. & Moro-Sibilot D., 2009), la monothérapie présente peu d'intérêt et les protocoles de polychimiothérapie sont en général préférés. Le traitement standard est une bithérapie avec un sel de platine (cisplatine (CYSPLATYL®) ou carboplatine (PARAPLATINE®)) et une molécule dite de « 3^{ème} génération » telle que la vironelbine (NAVELBINE®), la gemcitabine (GEMZAR®), paclitaxel (TAXOL®). Le pemetrexed (ALIMTA®) est également utilisé en combinaison avec le cisplatine dans le traitement des CBNPC non épidermoïdes à un stade localement avancé ou métastatique (Ricciardi S. et al., 2009). Dans le cadre d'un diagnostic rapide du cancer, le taux de réponse à la chimiothérapie peut atteindre 30% (Vignot S. & Besse B., 2007), avec une régression tumorale immédiatement après le traitement. Cependant, ces thérapies sont lourdes pour les patients de par la haute toxicité des molécules et les nombreux effets secondaires. De plus, des rechutes de la maladie sont presque systématiques observées (rémissions totales dans moins de 10% des cas (Shepherd F.A. et al., 2005)).

Les traitements conventionnels, généralement mal supportés par les patients, peuvent avoir une efficacité limitée et inégale selon le stade de développement de la tumeur. En effet, s'ils apportent certains résultats sur des patients ayant une tumeur localisée, et il n'y pas de guérison des patients en stades métastatiques. De plus, les résultats de ces thérapies sur la survie globale restent insatisfaisants puisque de très nombreuses rechutes de la maladie sont observées. Afin de potentialiser les effets thérapeutiques et d'offrir une meilleure qualité de vie

aux patients pendant et après la durée du traitement, de nouvelles approches ciblées ont été développées depuis une dizaine d'années grâce à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires des tumeurs broncho-pulmonaires.

A.4.2. Thérapies ciblées

Les thérapies ciblées bloquent spécifiquement l'action de certains oncogènes agissant sur la prolifération, la survie ou encore l'angiogenèse tumorale pour tuer les cellules cancéreuses tout en épargnant les cellules saines. Ces molécules sont généralement divisées en trois catégories :

1. Les anticorps monoclonaux spécifiques d'un oncogène : ces anticorps sont souvent dirigés contre le domaine de fixation du ligand au récepteur, pour bloquer l'activation de celui-ci ou sa dimérisation avec un autre récepteur membranaire.
2. Les « inhibiteurs de tyrosine kinase » (**Tyrosine Kinase Inhibitor, TKI**). Ces molécules chimiques inhibent l'activité enzymatique de certains autres oncogènes de façon réversible ou irréversible.
3. Les oligonucléotides anti-sens (Azim H.A. Jr. & Ganti A.K., 2006) : plus rarement utilisés, ils consistent à bloquer spécifiquement l'expression des oncogènes en entraînant la dégradation de leur ARNm.

Le CBNPC offre un bon exemple de cette « révolution moléculaire » avec à la fois un nombre croissant de molécules accessibles sur le marché et de molécules en cours d'essai clinique (Mahalingam D. et al., 2009) (**Figure 4**). Le facteur angiogénique VEGF peut être spécifiquement ciblé par l'anticorps monoclonal bevacizumab (AVASTIN®). L'autorisation de mise sur le marché (AMM) en Europe autorise en 1^{ère} ligne de traitement du CBNPC l'association du bevacizumab avec un doublet de sels de platine tel que le paclitaxel/carboplatine ou le cisplatine/gemcitabine (Reck M. & Crino L., 2009 ; Stinchcombe T.E. & Socinski M.A., 2009). Déjà utilisé dans le traitement du cancer colorectal, ce traitement optimise la survie sans progression tumorale de 30% et le taux de réponse à la chimiothérapie du CBNPC de 70%. Cependant, le bevacizumab ne semble pas avoir d'effet sur la survie globale, même en association avec de la chimiothérapie (Tassinari D., et al., 2011) ou d'autres thérapies ciblées de type TKI (Herbst R.S. et al., 2011). Le récepteur au VEGF constitue quant

à lui une cible privilégiée des TKI sorafenib (NEXAVAR®) et sunitinib (SUTENT®) dans les CBNPC.

L'EGFR constitue aussi une cible de choix dans le traitement de nombreux cancers (**Figure 4**). Le cetuximab (ERBITUX®) et la panitumumab (VECTIBIX®) sont deux anticorps monoclonaux chimériques humanisés spécifiques de l'EGFR approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis et l'AMM en Europe pour le traitements des cancers colorectaux et tête et cou (Bonner J.A. et al., 2006 ; Jonker D.J. et al., 2007). Des essais cliniques de phase III sont en cours pour évaluer leur efficacité dans le traitement des CBNPC (Pao W. & Chmielecki J. 2010). Par ailleurs, deux principaux EGFR-TKI réversibles ont été développés et sont actuellement utilisés dans le traitement des CBNPC de type adénocarcinome : le gefitinib (IRESSA®) et l'erlotinib (TARCEVA®).

D'autres cibles font actuellement l'objet de développements en clinique et pourraient être prometteuses dans le traitement des CBNPC (Neal J.W. & Sequist L.V., 2010) (**Figure 4**). C'est le cas du récepteur à l'insuline (IGF-1R) dont l'activité est bloquée par des anticorps monoclonaux ou des TKI. La voie de survie PI3K/AKT peut être ciblée à différents niveaux notamment par des inhibiteurs de mTOR (rapamycine) ou des inhibiteurs de PI3K et AKT (Liu P. et al., 2009). L'agent ABT-737 mime l'action des antagonistes des protéines à domaine BH3, dont fait partie la protéine anti-apoptotique Bcl-2, pour favoriser l'apoptose des cellules traitées (Wesarg E. et al., 2007). Enfin, l'inhibiteur d'histones déacétylases vorinostat (ZOLINDA®) (Miyana A. et al., 2008 ; Ramalingam S.S. et al., 2009) et l'inhibiteur du protéasome bortezomib (VELCADE®) (Dou Q.P. & Goldfarb R.H., 2002 ; Sánchez-Serrano I., 2006) ont également été développés afin de cibler respectivement les dérégulations épigénétiques (déacétylation des gènes suppresseurs de tumeur par exemple) et la dégradation des protéines.

Le nombre important de nouvelles thérapies en développement clinique permet d'envisager un élargissement des traitements disponibles en associant ces traitements spécifiques à des agents de chimiothérapie conventionnelle, afin de les ajuster en fonction du « profil » du patient (<http://clinicaltrials.gov>; <http://www.e-cancer.fr/les-essais-cliniques/registres-desessaiscliniques?>). Cependant, l'EGFR constitue actuellement l'unique cible thérapeutique « efficace » dans les CBNPC. Les EGFR-TKI permettent une amélioration de la survie sans progression tumorale, mais l'apparition systématique de mécanismes de résistance souligne la nécessité d'approfondir la compréhension sur le développement de ces cancers et les mécanismes biologiques mis en place par la cellule tumorale lors des traitements.

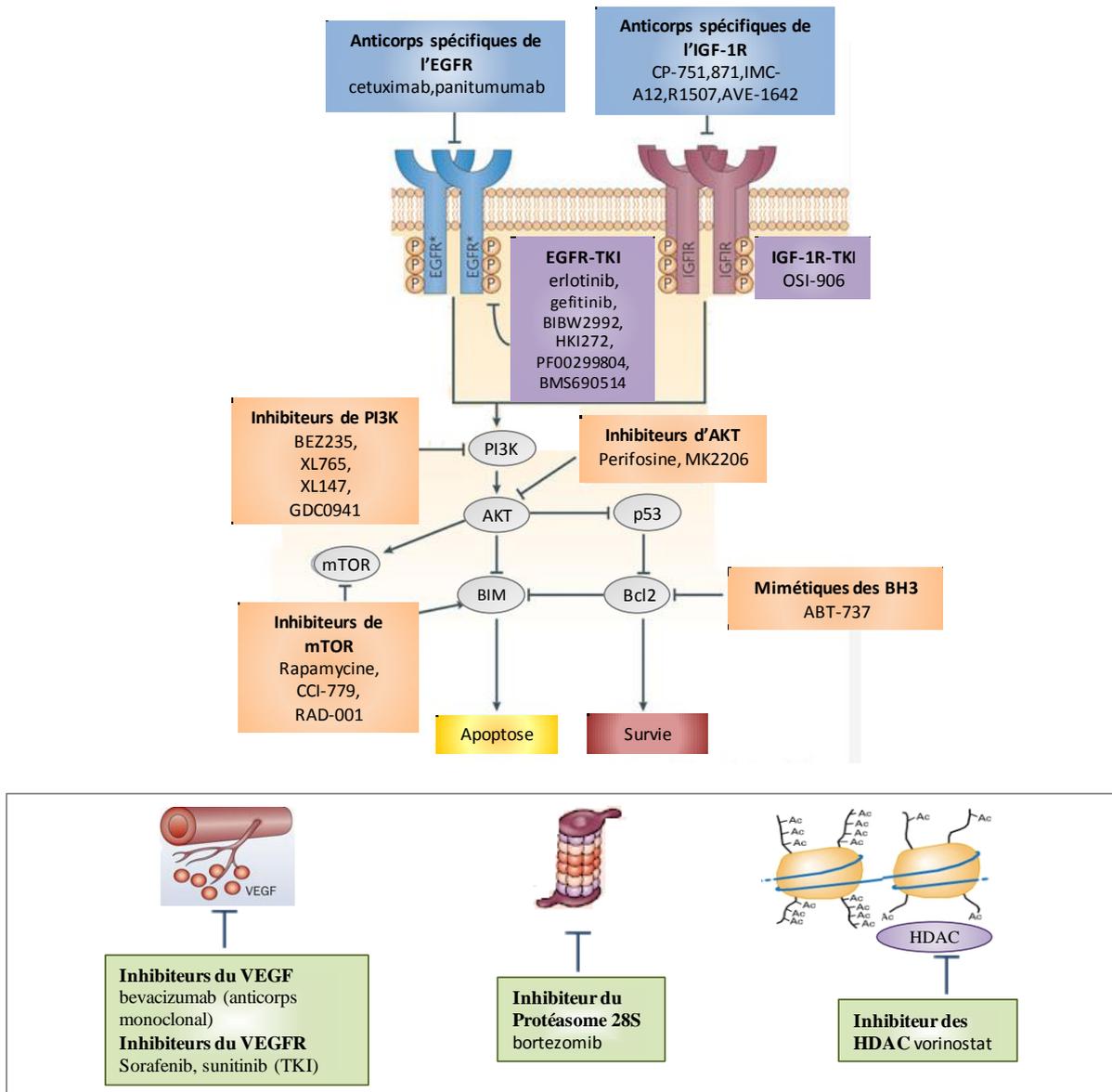


Figure 4: Thérapies ciblées pour le traitement des CBNPC (Adapté de Pao W. & Chmielecki J., 2010).

Les anticorps monoclonaux chimériques ciblent les domaines de liaison aux ligands de l'EGFR (cetuximab et panitumumab), de l'IGF-1R ou du VEGF (bevacizumab). Certaines molécules bloquent les activités enzymatiques en se logeant dans le site catalytique de la cible, tels que les inhibiteurs de tyrosine kinase spécifiques de l'EGFR (erlotinib, gefitinib), de l'IGF-1R (OSI-906) ou du VEGFR (sorafenib, sunitinib). D'autres inhibiteurs ciblent les activités sérine/théonine kinase de la PI3K, de mTOR (rapamycine), et l'activation d'Akt pourrait être bloquée directement par une inhibition allostérique (MK2206), ou indirectement suite à la perturbation de la formation des rafts lipidiques de la membrane plasmidique (perifosine). Le bortezomib se lie très spécifiquement au site catalytique du protéasome 26S afin de prévenir son activité, le vorinostat inhibe l'activité déacétylase des HDAC et l'ABT-737 est un mimétique de protéines BH3 se liant préférentiellement aux protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL pour favoriser l'apoptose des cellules.

B. Le récepteur à l'EGF

B.1. Membres et structure de la famille HER

L'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) est une glycoprotéine transmembranaire de 170 KDalton à activité tyrosine kinase. Ce récepteur est le prototype de la famille des Human Epidermal Receptor (HER) comprenant quatre membres (Sato J.D. et al., 1983): l'EGFR (ErbB1 ou HER1), ErbB2 (HER2 ou *neu*), ErbB3 (HER3) et ErbB4 (HER4) (Carpenter G., 1987). Leur appellation vient de leur homologie avec l'oncogène d'un virus d'érythroblastose aviaire « v-erb ». HER est une famille multigénique dont les membres partagent cependant une grande homologie de structure primaire (40 à 50%). D'une façon générale, les récepteurs de la famille HER possèdent trois domaines remarquables : le domaine extracellulaire, le domaine transmembranaire et le domaine intracellulaire (**Figure 5**). L'unité fonctionnelle des membres de la famille HER est le dimère (homo-ou hétérodimère).

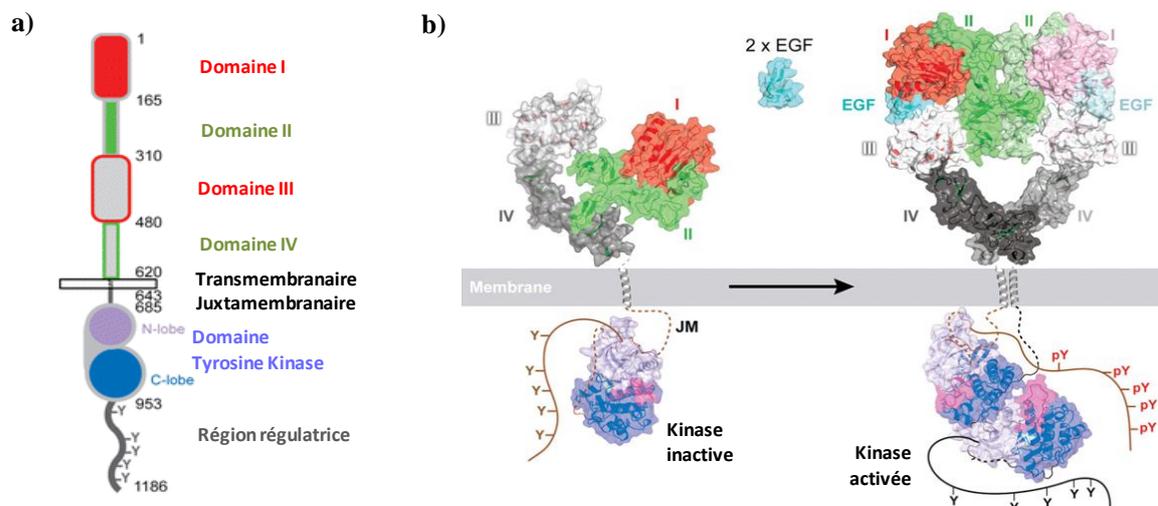


Figure 5: Caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'EGFR (Ferguson K.M., 2008).

a) Représentation schématique des domaines de l'EGFR. Le domaine extracellulaire de liaison au ligand comprend 4 domaines notés L1 (I), CR1 (II), L2 (III), and CR2 (IV). Les domaines I (rouge) and III (gris et bordure rouge) partagent environ 37% d'identité dans leurs séquences et sont nécessaires à la fixation du ligand. Les domaines II (vert) et IV (gris et bordure verte), riches en cystéines, augmentent l'affinité de liaison au ligand et permettent d'établir des contacts avec le second récepteur du dimère. Le domaine intracellulaire, porteur de l'activité tyrosine kinase, est constitué d'un lobe N (violet) et d'un lobe C (bleu).

b) Mécanisme d'activation de l'EGFR par un ligand spécifique et dimérisation du récepteur. Sous sa forme inactive, l'EGFR est monomérique. La fixation de deux molécules d'un ligand spécifique (ici, l'EGF) conduit à la dimérisation du récepteur. Les domaines I and III adoptent une configuration en hélice-β et les domaines II and IV établissent des liaisons disulfures. La tyrosine kinase inactive (marron) est activée (noir) suite à l'autophosphorylation sur différents résidus tyrosine de la queue cytoplasmique du récepteur dimérisé.

Le domaine extracellulaire (ou ectodomaine) assure la liaison au ligand spécifique à l'origine de l'activation du récepteur et facilite sa dimérisation (Lemmon M.A. et al., 1997). Il consiste en quatre sous-domaines répétés deux à deux: L1 (I), CR1 (II), L2 (III) et CR2 (IV). Les sous-domaines L1 et L2 servent à la fixation du ligand tandis que les domaines CR1 et CR2 (CR pour *Cytein-Rich*) augmentent l'affinité de fixation du ligand pour le récepteur et permettent d'établir des contacts avec le second récepteur du dimère (Jorissen R.N. et al., 2003).

La structure transmembranaire très hydrophobe n'avait initialement que pour fonction l'ancrage du récepteur dans la bicouche lipidique. Cependant, cette structure caractéristique en hélices α s'étend au niveau du domaine juxtamembranaire en intracellulaire et pourrait subir des phosphorylations sur des résidus thréonine (Heisermann G.J. et al., 1990) impliqués dans la régulation de l'internalisation du récepteur (Bao J. et al., 2000; He C. et al., 2002; Hsu S.C. & Hung M.C., 2007), l'association avec d'autres protéines intracellulaires telles que eps8 (Castagnino P. et al., 1995), la calmoduline ou la protéine kinase C (PKC) (Martin-Nieto J. et al., 1998 ; Li H. et al., 2002). Contrairement au rôle inhibiteur initialement identifié pour les récepteurs tyrosine kinase (Hubbart S.R. et al, 2004), il a été montré plus récemment que le domaine juxtamembranaire de l'EGFR pouvait également participer à l'activation du récepteur (Jura N. et al., 2009).

Enfin, le domaine intracellulaire constitue le point de départ d'activation des différentes voies de signalisation. Ce domaine, dont la séquence génique est hautement conservée entre les membres de la famille (59 à 81% d'homologie) (Jorissen R.N. et al., 2003), est le siège de l'activité tyrosine kinase des récepteurs de la famille HER. Le domaine intracellulaire regroupe également un grand nombre de résidus tyrosine pouvant être phosphorylé suite à l'activation du récepteur par le ligand spécifique.

Notons que les récepteurs ErbB2 et ErbB3 se distinguent par deux particularités : ErbB2 n'a pas de ligand connu et a été qualifié de récepteur « sourd » tandis que ErbB3 est dépourvu d'activité tyrosine kinase (ou très faible) et a été surnommé récepteur « muet ». Leur activation serait donc sous la dépendance d'une hétérodimérisation avec un autre membre de la famille HER (Citri A. & Yarden Y., 2006).

B.2. Activation de l'EGFR et voies de signalisations associées

B.2.1. Liaison au ligand spécifique

Les ligands sont des protéines solubles synthétisées sous forme de précurseurs et doivent être clivés par des protéases membranaires ou extracellulaires pour pouvoir se fixer au récepteur. Différents ligands des récepteurs de la famille HER ont été identifiés et sont classés en trois catégories selon leur sélectivité pour les récepteurs (Beerli R.R. & Hynes N.E., 1996) (**Figure 6**).

Le premier groupe se compose des neurégulines (NRGs) et se subdivise en deux sous-groupes selon leur capacité à se lier à ErbB4 (NRGs-3 et -4) ou à ErbB4 et ErbB3 à la fois (NRGs-1 et -2). Le second groupe de ligands a une affinité duale pour l'EGFR et ErbB4 : bêtacelluline (BTC), l'Heparin-binding EGF-like Growth Factor (HB-EGF) et l'épiréguine (EPR). Enfin, quatre ligands sont spécifiques de l'EGFR : l'Epidermal Growth Factor (EGF), le Tumor Growth Factor- α (TGF- α), l'amphiréguine (AREG) et l'épigène (EPG).

A souligner que, contrairement aux souris knock-out pour l'expression de l'EGFR, les souris knock-out pour des ligands donnés ne présentent pas de phénotypes létaux suggérant des mécanismes de compensation entre les ligands dans la plupart des tissus (Jorissen R.N. et al., 2003).

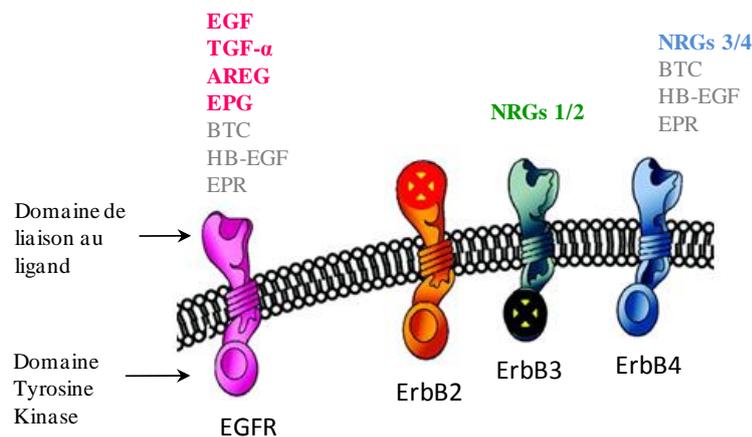


Figure 6: Les ligands des membres de la famille HER (D'après Ross J. S. et al., 2009).

L'EGFR et l'ErbB4 peuvent soit lier des ligands spécifiques (en violet et bleu), soit des ligands à activité duale (en gris).

L'ErbB2 est qualifié de récepteur « sourd » car aucun ligand ne lui a été attribué, tandis que l'ErbB4 est dit récepteur « muet » car il ne possède pas d'activité tyrosine kinase. En revanche, il est capable de lier spécifiquement les NRGs 1 et 2 (en vert).

EGF, Epidermal Growth Factor; TGF- α , Transforming Growth Factor- α ; EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor ; AREG, amphiréguine; EPG, épigène; HB-EGF, Heparin-Binding Epidermal Growth Factor; EPR, épiréguine; NRGs, neurégulines; BTC, bêtacelluline.

B.2.2. Voies de signalisation activées par l'EGFR

Suite à la fixation du ligand, l'EGFR se dimérise avec un autre EGFR (homodimère) ou un autre membre de la famille HER (hétérodimère). Cette dimérisation est suivie d'une transphosphorylation sur les résidus tyrosine intracellulaires de chacun des deux partenaires (Olayioye M.A. et al., 2000). Les phosphotyrosines servent de sites de fixation à des protéines intracellulaires de nature diverse appelées « protéines adaptatrices » grâce à des motifs de reconnaissance de type SH2 (Src Homology Domain 2) et PTB (PhosphoTyrosine Binding) (**Figure 7**).

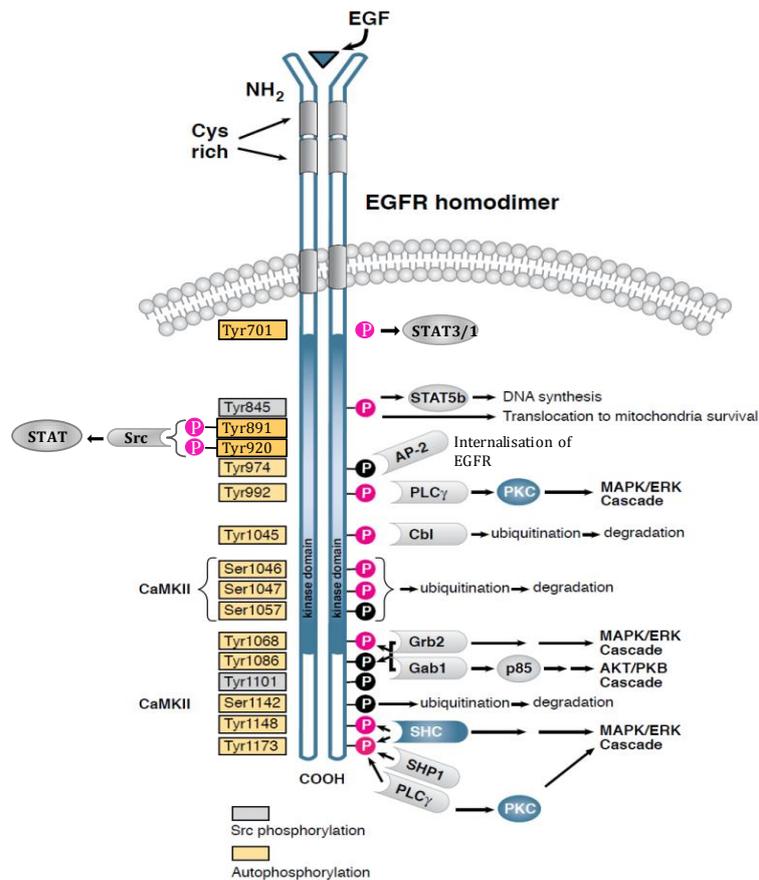


Figure 7: Les tyrosines phosphorylées de l'EGFR servent de sites de liaison des protéines adaptatrices pour activer les voies de signalisation intracellulaires. (Adapté de Sebastian S. et al., 2006; Nyati M.K. et al., 2006; <http://www.cellsignal.com/pdf/2236.pdf>).

Tyr, TYrosine; Ser, SERine; STAT, Signal Transducer and Activator of Transcription; JAK, JANus Kinase; PI3K, Phosphatidyl Inositol-3 Kinase; Akt = PKB, Protéine Kinase B; PTEN, Phosphatase and TENsin homolog; ERK: Extracellular signal-Regulated Kinases; MAPK, Mitogen Activated Protein Kinase; CaMKII, Calmodulin Kinase II; PLCγ, Phospholipase C-γ

Parmi les protéines adaptatrices se trouvent les protéines « d'architecture » (scaffold proteins) telles que Shc, Grb7, Grb2, PLC-gamma (PLCγ), des tyrosine kinases Src, Janus Kinase (JAK) et Phosphatidyl Inositol-3 Kinase (PI3K) constituant le premier maillon

d'activation d'une cascade de phosphorylations de protéines intracellulaires appartenant à différentes voies de signalisation. Les tyrosines phosphatases SHP1 et SHP2 ou encore l'ubiquitine-ligase Cbl-E3 sont également des protéines adaptatrices mais elles vont, à l'inverse, canaliser l'activation du récepteur (Marmor M.D. & Yarden Y., 2004 ; Pennock S. & Wang Z., 2008).

L'EGFR est au centre de l'intégration et de la redistribution de signaux très variés aboutissant à une haute diversification des effets biologiques activés. C'est le système de « redistribution de l'information avec amplification de signal ». Trois grandes voies de prolifération et de survie sont ainsi activées par l'EGFR (**Figure 8**): la voie ras/raf/MEK/MAPK, la voie PI3K/AKT/mTOR et la voie JAK/STAT que nous allons décrire.

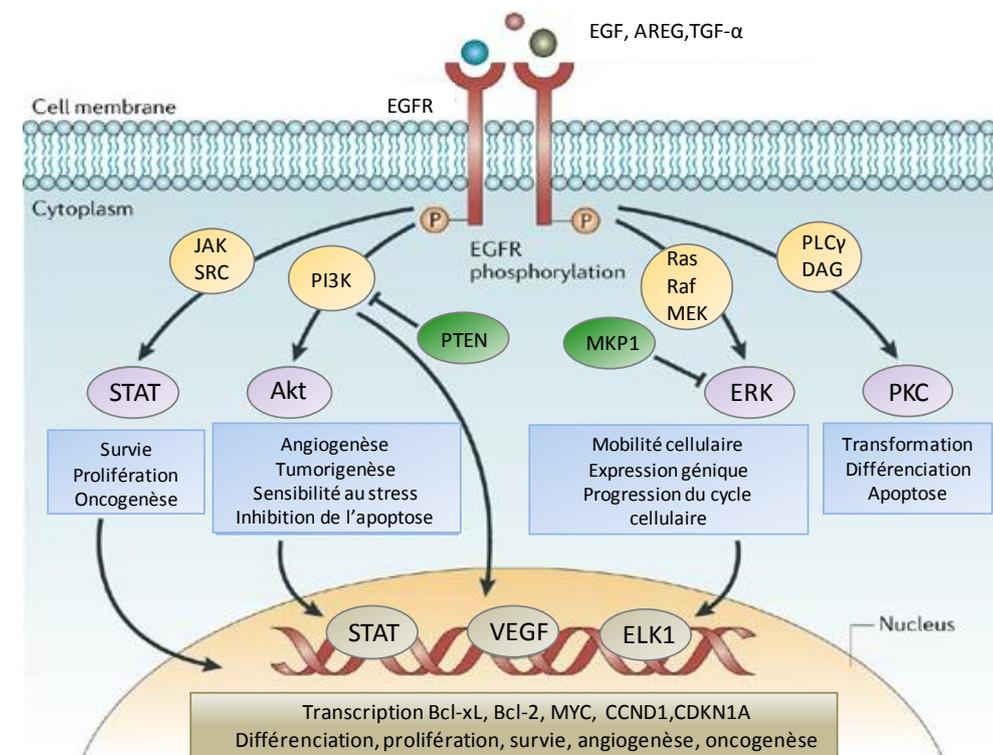


Figure 8: Les principales voies de signalisation activées par l'EGFR (D'après Nyati M.K. et al., 2006).

L'EGFR active directement ou indirectement, *via* Src ou JAK, la voie des "signal transducer and activator of transcription" (STAT). Les facteurs de transcription STAT activés migrent dans le noyau pour réguler l'expression de gènes cruciaux pour la survie et la prolifération de la cellule. L'EGFR active également la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) qui en retour active la sérine/théronine kinase AKT à l'origine d'effets sur différentes cibles cytoplasmiques et nucléaires. L'un des régulateurs majeurs de la voie PI3K/AKT est la phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin homologue). L'EGFR active aussi la voie des MAPK (mitogen-activated protein kinase) par une cascade de phosphorylations de Ras, RAF, MEK1/2 (mitogen-activated protein kinase 1/2) puis ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2) qui activent différents facteurs de transcription nucléaires impliqués notamment dans la mobilité ou le cycle cellulaire. Un régulateur négatif majeur de la voie Ras-MAPK est la phosphatase MKP1 (MAPK phosphatase 1). Enfin, la voie PLCγ/PKC constitue une autre voie importante activée par l'EGFR. Le DAG est un cofacteur nécessaire à l'activation de la sérine/threonine kinase-C (PKC) impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, la transformation, la différenciation et l'apoptose.

VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor; ELK1, (ETS)-like transcription factor 1; Bcl-xL et Bcl-2, gènes codant pour les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2; Myc, gène codant pour l'oncogène c-Myc; CCND1, gène codant pour la cycline D1; CDKN1A, gène codant pour la protéine p21.

B.2.2.1. La voie des MAPK

La voie des Ras/Raf/MEK/MAPK (**Figure 9**) est initiée par liaison des protéines adaptatrices Shc ou Grb2 sur l'EGFR.

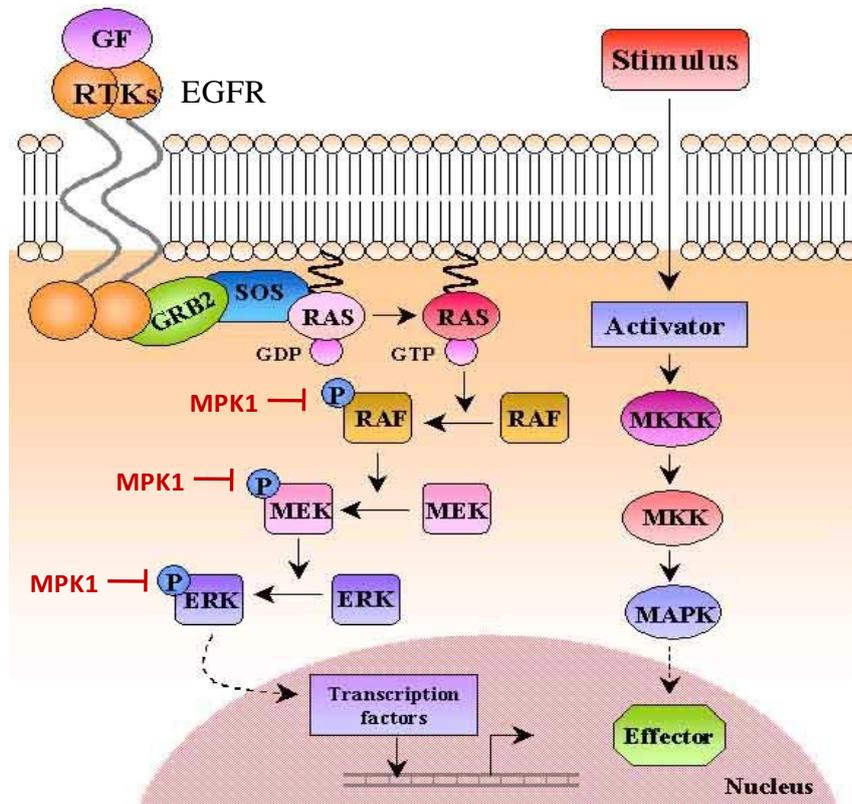


Figure 9: La voie des MAPK après activation par l'EGFR (D'après Kabbarah O. & Chin L., 2006).

L'activation de la voie Ras-MAPK par l'EGFR peut se faire par deux mécanismes: directement par liaison du domaine SH2 de Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) à l'EGFR ou par recrutement indirect de Grb2 par l'adaptateur Shc. La protéine Grb2, constitutivement liée à Sos (Son of Sevenless), active à son tour la GTPase Ras. Une cascade de phosphorylations est ainsi initiée permettant l'activation successive des sérine/thréonine kinases RAF (MKKK), MEK1/2(MKK) et ERK1/2 (MAPK). Les kinases ERK1/2 migrent dans le noyau où elles activent différents facteurs de transcription impliqués notamment dans le contrôle de l'expression de gènes de prolifération cellulaire. La phosphatase MKP1 (MAPK phosphatase 1), régulateur négatif essentiel de la voie Ras-MAPK, est capable d'inactiver par déphosphorylation différents acteurs de cette voie.

GF: Growth Factor; RTK: récepteur tyrosine kinase (EGFR); Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2; Sos: Son of Sevenless; MEK/ERK: Mitogen-kinase/Extracellular signal-Regulated Kinases; MAPK, Mitogen Activated Protein Kinase; MKKK: MAPKKK = MAPK3; MKK: MAPKK = MAPK2; MKP1, MAPK phosphatase 1;

La protéine Grb2, constitutivement liée à Sos (Son of Sevenless), peut soit interagir indirectement avec l'EGFR par l'intermédiaire de Shc, soit lier directement les phosphotyrosines du récepteur (Sasaoka T. et al., 1994). Dans ce cas, le complexe Grb2/Sos active la GTPase Ras en lui apportant de l'énergie sous forme de GDP qui en retour active les sérine/théonine kinases de la famille RAF, A-RAF, B-RAF et en particulier RAF-1 (Hallberg

B. et al., 1994). Une cascade de phosphorylations passant par les kinases MEK-1/2 aboutit à la phosphorylation des kinases ERK-1/2, elles-mêmes responsables de la phosphorylation de facteurs de transcription (Vaillancourt R.R. et al., 1994). La voie des MAPK contrôle ainsi essentiellement l'expression de protéines impliquées dans la différenciation et la prolifération cellulaire.

Elle possède en outre un système de rétrocontrôle négatif impliquant la dissociation de Grb2/Sos ou à des déphosphorylations par des phosphatases générales telle que PP2A ou plus spécifiques telle que la MAPK phosphatase 1 (MKP1).

B.2.2.2. La voie PI3K/AKT

L'EGFR peut également prendre part à la régulation du métabolisme des phospholipides par association des phosphotyrosines du récepteur à la sous-unité p85 de la PI3K (Carpenter C.L. et al., 1993) (**Figure 10**).

A partir du phosphatidylinositol-4,5-triphosphate (PIP₂), la PI3K catalyse la production de phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP₃) servant de point d'ancrage à la sérine-théonine kinase AKT (PKB, protéine kinase B) (Jones P.F. et al., 1991). AKT est alors elle-même activée par phosphorylation, essentiellement par la kinase-1 dépendante des phosphoinositides (Phosphoinositide-dépendant kinase-1, PDK-1) (Nicholson K.M. & Anderson N.G., 2002). Les sérine/thréonine kinases AKT et mTOR, ainsi que le facteur de transcription NF-κB, sont des relais essentiels de cette voie impliquée respectivement la transformation cellulaire, la croissance et l'apoptose. Si nous retenons que la voie **PI3K/AKT** est un composant majeur dans la survie et prolifération cellulaire, elle est participe également à de nombreux effets biologiques tels que la mobilité cellulaire ou encore le métabolisme du glycogène avec la sérine/thréonine kinase GSK-3β (**Figure 10**).

Un régulateur négatif essentiel de cette voie est la phosphatase PTEN (Phosphatase and TENSin homolog). PTEN déphosphoryle la PIP₃ sur le troisième phosphate de l'anneau inositol et s'oppose ainsi à l'action de la PI3K (Maehama T. & Dixon J.E., 1998).

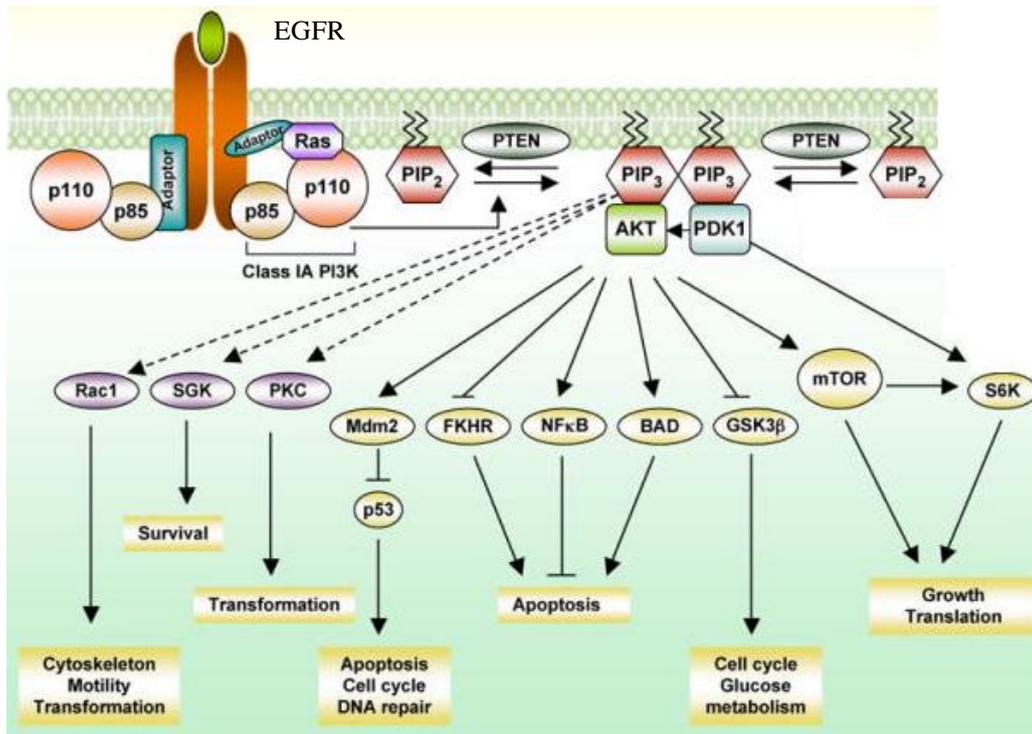


Figure 10: La voie PI3K/AKT après activation par l'EGFR (D'après Liu P. et al., 2009).

La PI3K est constituée d'une sous-unité régulatrice (p85) et d'une sous-unité catalytique (p110). La sous-unité p85 permet l'ancrage directement aux phosphotyrosines de l'EGFR ou *via* un adaptateur tel que "l'insulin receptor substrate 1" (IRS1). La sous-unité p110 convertit le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate en phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate servant de sites de liaison aux protéines possédant un domaine "pleckstrin-homology" (PH) telles que la sérine/thréonine kinase AKT ou son activateur, la kinase PDK1. La protéine AKT exerce des effets multiples sur des facteurs cytoplasmiques et nucléaires impliqués notamment dans le contrôle de l'apoptose (inhibition de la voie p53, et activation de la voie NF-κB), la progression du cycle cellulaire (inhibition de la voie p53, induction de la GSK-3β) et le métabolisme du glucose (induction de la kinase S6 et de mTOR).

PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase; PIP₂, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate; PIP₃, phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate; PDK1, phosphoinositide-dependent kinase 1; PKC, protein kinase C; GSK-3β, Glycogen Synthase Kinase-3β; NF-κB, Nuclear factor-kappa B; PTEN, Phosphatase and Tensin homologue; mTOR, mammalian target of rapamycin; FKHR, forkhead transcription factor; SGK, Serum and glucocorticoid-inducible kinase; BAD, Bcl-2-associated death promoter protein; S6K, ribosomal protein S6 kinase.

B.2.2.3. La voie des STAT

L'EGFR peut également recruter sur ses phosphotyrosines les protéines de la voie des **Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)** (**Figure 11**). Les STAT sont au nombre de sept chez les mammifères (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6). Ces protéines ont été initialement identifiées comme relai du signal généré par les cytokines et leurs récepteurs (Darnell J.E. Jr., 1997 ; Ihle J.N. et al., 1997), en particulier l'interleukine-6 (IL-6) et son récepteur gp130 (Hirano T. et al., 1997 ; Hirano T. et al., 2000).

Dans ce cadre, les récepteurs des cytokines n'ayant pas d'activité kinase capable d'activer les STAT par phosphorylation, les kinases JAK (JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk2) assurent la transmission de l'activation entre le récepteur et les STAT.

L'activation des STAT1, 3 et 5 par l'EGFR peut se faire par les JAK, par l'intervention de la kinase Src ou encore directement par liaison au récepteur par interaction avec leur domaine SH2 (Park O.K. et al., 1996 ; David M. et al., 1996 ; Leaman D.W. et al., 1996 ; Mertens C. & Darnell J.E. Jr., 2007). Les STAT sont principalement phosphorylées sur un résidu tyrosine (Y~700), en particulier **Y705** pour **STAT3** et **Y694** pour **STAT5**. Cette phosphorylation induit leur dimérisation et leur translocation nucléaire par des importines- α , notamment l'importine- α 3 pour STAT3 et l'importine- α 5 pour STAT1 (Meyer T. & Vinkemeier U., 2004). En tant que facteurs de transcription, les STAT se fixent sur des séquences consensus répétées et inversées 5'-TT(N4-6)AA-3' (ou « GAS element ») (Aaronson D.S. & Horvath C.M., 2002) de gènes cibles impliqués dans l'angiogenèse, la survie et la prolifération cellulaire.

Différents régulateurs négatifs plus ou moins spécifiques de la voie JAK/STAT ont été identifiés (Espert L. et al., 2005). Après stimulations par des cytokines ou des hormones, les SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling) se fixent sur les résidus tyrosine phosphorylés des récepteurs ou des JAK pour empêcher la fixation des STAT. Les PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) sont exprimées constitutivement mais interagissent avec les STAT après stimulation, notamment par des cytokines. Les PIAS1 interagissent spécifiquement avec STAT1, les PIAS γ et PIASx interagissent avec STAT1 ou STAT4, et les **PIAS3** sont spécifiques de STAT3 (Espert L. et al., 2005). Les fonctions des PIAS sont encore mal caractérisées mais certaines pourraient être des co-répresseurs transcriptionnels, telle que les protéines PIASx qui agiraient en tant que co-répresseur de STAT4 (Arora T. et al., 2003) et PIASy comme co-répresseur de STAT1 (Liu B. et al., 2001). Enfin, les phosphotyrosines phosphatases exercent un rétrocontrôle négatif par déphosphorylation des différentes protéines de la signalisation JAK/STAT et se distinguent par leur localisation sub-cellulaire : les phosphatases CD45, SHP1, SHP2, TC-48/TC-PTP β (T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase β) et PTP1B (phosphotyrosine phosphatase 1B), spécifique de JAK2 et Tyk2, sont cytosoliques, tandis que la phosphatase **PTP-RT (Protein Tyrosine Phosphatase Receptor T)**, spécifique de la déphosphorylation de STAT3 (Zhang X. et al., 2007) et la phosphatase TC-45/TC-PTP α (T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase α), spécifique de STAT1 (ten Hoeve J. et al., 2002), sont nucléaires.

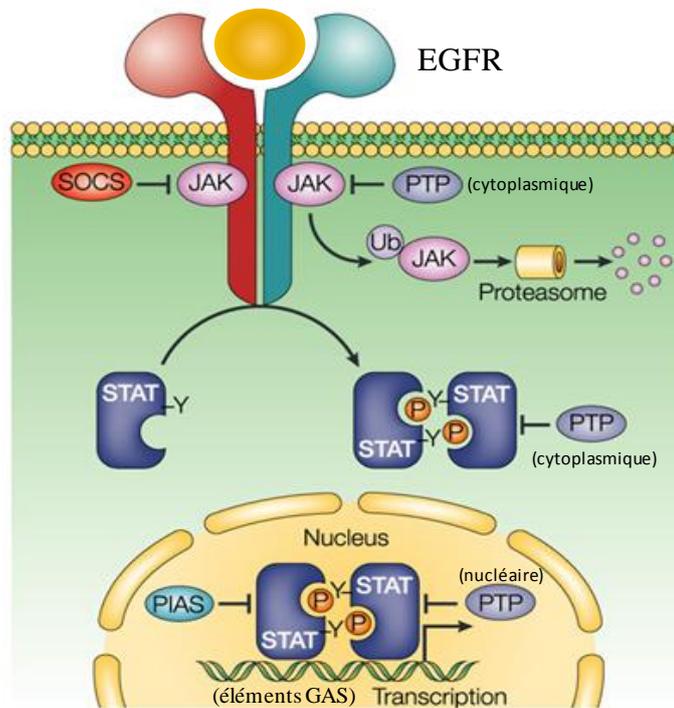


Figure 11: La voie JAK/STAT après activation par l'EGFR (Adapté de Shuai K. & Liu B., 2003).

Les kinases JAK peuvent servir de relais entre l'EGFR activé et les facteurs de transcription STAT. Cependant, l'EGFR peut également directement phosphoryler les protéines STAT pour induire la signalisation. Les facteurs de transcription STAT activés migrent dans le noyau, se fixent sur les éléments promoteurs "GAS" afin de réguler l'expression de gènes impliqués dans la survie et la prolifération de la cellule. Différents régulateurs négatifs de la voie des STAT agissent au niveau du cytoplasme (SOCS, les phosphatases cytoplasmiques PTP) ou dans le noyau (PIAS, les phosphatases nucléaires PTP). L'ubiquitination des JAK, puis leur dégradation par le protéasome constitue également un élément régulateur de la voie.

JAK: Janus Kinase; STAT, Signal Transducer and Activator of Transcription; PTP: Protein Tyrosine Phosphatase; SOCS: Suppressor Of Cytokine Signaling; PIAS: Protein Inhibitor of Activated STAT.

L'EGFR s'intègre dans un réseau complexe finement régulé (Citri A. & Yarden Y., 2006). Afin de contrôler l'intensité et la durée des signaux émergents de l'EGFR, différents mécanismes biologiques sont mis en place. Cependant, au cours du processus de carcinogenèse, l'EGFR peut se transformer en puissant oncogène, avec une déstabilisation des systèmes de surveillance des voies et une activation incontrôlée de toutes les voies de prolifération et de survie.

B.3. Altérations de la signalisation de l'EGFR dans les CBNPC

B.3.1. Altérations des ligands de l'EGFR

Dans le cadre d'une stimulation autocrine et paracrine des cellules tumorales, les facteurs de croissance capable de lier l'EGFR sont très souvent surexprimés notamment le Tumor Growth Factor- α (TGF- α) et l'amphiréguline (AREG).

Le TGF- α est surexprimé chez plus de 60% de patients atteints de CBNPC, tout type histologique et tout stade tumoral confondu (Rusch V. et al., 1993). L'expression aberrante du TGF- α contribue en grande partie au développement d'un phénotype tumoral des cellules épithéliales humaines de poumon exprimant un EGFR sauvage (Hamburger A.W. et al., 1998), et la surexpression concomitante de l'EGFR sauvage et du TGF- α est souvent observée dans les stades précoces de développement des CBNPC (Rusch V. et al., 1997). La surexpression du TGF- α a été principalement observée chez les patients hommes, non-ADC et chez les fumeurs (Ishikawa N. et al., 2005). Enfin, la sécrétion accrue de TGF- α dans le sérum de patients atteints de CBNPC a également été corrélée à une résistance aux traitements ciblés de type EGFR-TKI (Ishikawa N. et al., 2005 ; Masago K. et al., 2008).

Un autre ligand de l'EGFR est très fréquemment surexprimé dans les CBNPC : il s'agit de l'AREG (40%) (Fontanini G. et al., 1998). Cette étude, menée sur une large cohorte de patients atteints de CBNPC, montre que l'AREG est plus fréquemment exprimée dans les ADC (~58%) que dans les carcinomes épidermoïdes (~40%), et corrèle dans les deux cas à une diminution significative de la survie globale de ces patients (Fontanini G. et al., 1998). Dans une étude ultérieure, la surexpression de l'AREG a été davantage observée chez les patients hommes, non-ADC ou certains sous-type d'ADC et chez les fumeurs (Ishikawa N. et al., 2005). Par ailleurs, l'AREG est capable d'activer le récepteur à l'IGF-1 selon une boucle autocrine (Hurbin A. et al., 2002) et les surexpressions de l'AREG et de l'IGF-1R induisent une résistance aux EGFR-TKI dans les ADC pulmonaires mucineux (Hurbin A. et al., 2011).

L'expression anormale d'autres ligands de l'EGFR (en particulier BTC, HB-EGF) pourrait également être impliqué dans le processus de transformation tumorale de cellules épithéliales de poumon et le développement CBNPC (Fernandes A.M. et al., 1999). A souligner que, de façon surprenante, la surexpression de l'EGF n'a pas été mise en évidence ni dans les lignées cellulaires, ni dans les tumeurs (Rusch V. et al., 1993).

Compte-tenu de l'importance de ces observations, bloquer la production des ligands de l'EGFR et/ou l'association de l'EGFR à ses ligands auto-produits a constitué un projet attractif

pour l'émergence de thérapies ciblées par des anticorps monoclonaux (Mendelsohn J. et al., 1992 ; Mendelsohn J. et al., 2003).

B.3.2. Altérations de l'EGFR dans les CBNPC

L'EGFR fut l'un des premiers proto-oncogènes cellulaires caractérisés (Ushiro H. & Cohen S., 1980 ; Downward J. et al., 1984) et dont l'expression aberrante fut détectée *in vitro* dans des tumeurs humaines de CBNPC, principalement de type épidermoïdes (Veale D. et al., 1987).

De plus, l'activité tyrosine kinase aberrante du récepteur fut corrélée à une prolifération accrue et à un mauvais pronostic (Gschwind A., et al., 2004). L'activation anormale de l'EGFR peut relever de l'augmentation du nombre de copies du gène de l'*egfr*, de la surexpression de la protéine EGFR ou encore de la présence de mutations somatiques affectant le domaine tyrosine kinase du récepteur.

B.3.2.1. Augmentation du nombre de copies du gène de l'egfr

Le gène de l'*egfr*, porté par le chromosome 7p12, est souvent la cible d'aberrations chromosomiques dans les CBNPC (Testa J.R. & Siegfried J.M. et al, 1992). Le nombre de copies du gène de l'*egfr* sauvage, généralement détecté par une méthode d'hybridation *in situ* (FISH), est augmenté par polysomie ou amplification génique dans 32 à 42% des ADC (Cappuzzo F. et al., 2005 ; Liang Z. et al., 2010). L'augmentation du nombre de copies du gène de l'*egfr* semble être davantage observé chez le patient non-fumeur (Jeon Y.K. et al., 2006 ; Liang Z. et al., 2010), mais n'a pas été statistiquement corrélé au sexe (Hirsch F.R. et al., 2003). Enfin, cette augmentation est généralement associée à un mauvais pronostic des patients atteints de CBNPC (Hirsch F.R. et al., 2003) et certaines études ont montré que le marquage FISH corréle à des ADC de stade avancé (Kim Y.T. et al., 2008).

B.3.2.2. Surexpression de la protéine EGFR

La surexpression de la protéine EGFR survient dans plus de 60% des CBNPC (Hirsch F.R. et al., 2003 ; Liang Z. et al., 2010). Elle est cependant davantage détectée dans les carcinomes épidermoïdes (82%) que dans les ADC (44%) (Hirsch F.R. et al., 2003).

Par ailleurs, si un nombre faible de copies du gène de l'*egfr* dans la cellule n'influence pas l'expression du récepteur, un nombre important de copies du gène (par amplification ou polysomie) se traduit par une surexpression de l'EGFR (Hirsch F.R. et al., 2003).

La surexpression de l'EGFR corrèle souvent à un mauvais pronostic (rechute de la maladie ou diminution de la survie globale) dans différents types de cancers (tête/cou, ovaire, œsophage, vessie, cervical) (Nicholson R.I. et al., 2001). En revanche, dans les CBNPC, la relation entre la surexpression de l'EGFR et le pronostic clinique ont fait l'objet d'études contradictoires : certains travaux n'ont pas établi de corrélation entre les deux (Hirsch F.R. et al., 2003), alors que d'autres données indiquent que la surexpression de l'EGFR pourrait être prédictive d'un mauvais pronostic dans les ADC pulmonaires et carcinomes épidermoïdes (Selvaggi G. et al., 2004). Une autre étude montre que les surexpressions concomitantes de l'EGFR et de ErbB2 sont prédictives d'un plus fort risque de rechute du CBNPC et d'une diminution de la survie des patients (Onn A. et al., 2004). A souligner que l'hétérogénéité des populations et/ou des techniques utilisées lors de ces études peut être à l'origine de certaines discordances.

B.3.2.3. Mutations du domaine tyrosine kinase de l'EGFR

Le domaine tyrosine kinase de l'EGFR fait l'objet de mutations confinées aux exons 18 à 21. Différentes mutations relativement anecdotiques ont été identifiées (10% à 15% des cas) (substitutions ponctuelles, rares insertions). En revanche, deux mutations de l'EGFR d'importance majeure ont été identifiées : la substitution de l'arginine par la leucine au niveau du codon 858 de l'exon 21 du gène de l'*egfr*, appelée **L858R**, et la délétion sans perte du cadre de lecture de l'exon 19 des codons 746-750 aboutissant à la perte du motif LREA très conservé chez les vertébrés. Cette mutation est plus communément nommée « **Del19** ».

(a) Incidence

Les analyses moléculaires ont mis en évidence que 85 à 90% des mutations de l'EGFR observées dans les CBNPC sont représentées par deux mutations (Shigematsu H. et al., 2006 ; Sequist L.V. et al., 2007) (**Figure 12**). D'une part, la substitution **L858R** constituant 40 à 45% des cas de mutations de l'EGFR, et d'autre part, la délétion **Del19** qui survient dans 44 à 46% des cas de mutations de l'EGFR (Riely G.J, et al., 2006 ; Rosell R. et al., 2006 ; Sharma S.V., et al., 2007). Quelques très rares cas (3.4%) de double mutation L858R et Del19 ont été observés chez des patients asiatiques (Zhang G.C. et al., 2007). A noter que les mutations L858R et Del19 sont presque exclusivement observées dans les CBNPC de type ADC, puisqu'elles n'ont été identifiées que dans de très rares cas de CBPC.

Par ailleurs, 40% des tumeurs exprimant l'une ou l'autre de ces mutations présentent également une augmentation du nombre de copies de l'allèle muté (Shigematsu H. et al., 2005). Il a été suggéré que cette augmentation favorise la survenue et la pression sélective pour l'émergence des mutations de l'EGFR (Gazdar A.F. et al., 2004).

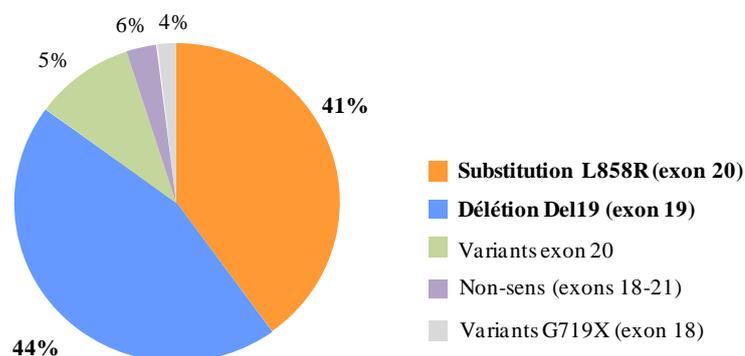


Figure 12: Les principales mutations de l'EGFR observées dans les CBNPC (Adapté de: Shigematsu H. et al., 2006).

Les mutations somatiques qui affectent le domaine tyrosine kinase de l'EGFR sont confinées aux exons 18 à 21. Dans 85 à 90% des cas, deux mutations d'incidence majeure sont observées: la substitution d'un résidu arginine en leucine au niveau du codon 858 de l'exon 20 (L858R), et la délétion sans perte du cadre de lecture des codons 746-750 (Del19) de l'exon 19.

(b) Epidémiologie et étiologie

Ces deux mutations sont observées chez 10 à 20% des patients caucasiens (Europe de l'Ouest et Amérique du Nord) contre 30 à 40% des patients asiatiques (Asie de l'Est essentiellement). Elles sont aussi préférentiellement observées chez les femmes, les non-

fumeurs et les CBNPC de type adénocarcinome (Kosaka T. et al., 2004 ; Haneda H. et al., 2006) (**Figure 13**).

Cette particularité semble indiquer un lien entre la présence de telles mutations, le sexe, les facteurs géographiques et environnementaux, et des polymorphismes associés (Gazdar A.F. et al., 2004). Par exemple, le premier intron du gène de l'*egfr* contient une répétition polymorphique du dinucléotide CA (CA-SSR1) dont la longueur varie de 14 à 21 répétitions. Si la taille de l'intron est significativement augmentée par les répétitions, la transcription du gène de l'*egfr* est réduite. Or, le polymorphisme est considérablement plus long chez les populations japonaises et chinoises, que chez les populations caucasiennes et afro-américaines. Cela pourrait traduire un défaut de transcription favorisant l'émergence de ces mutations dans les populations asiatiques.

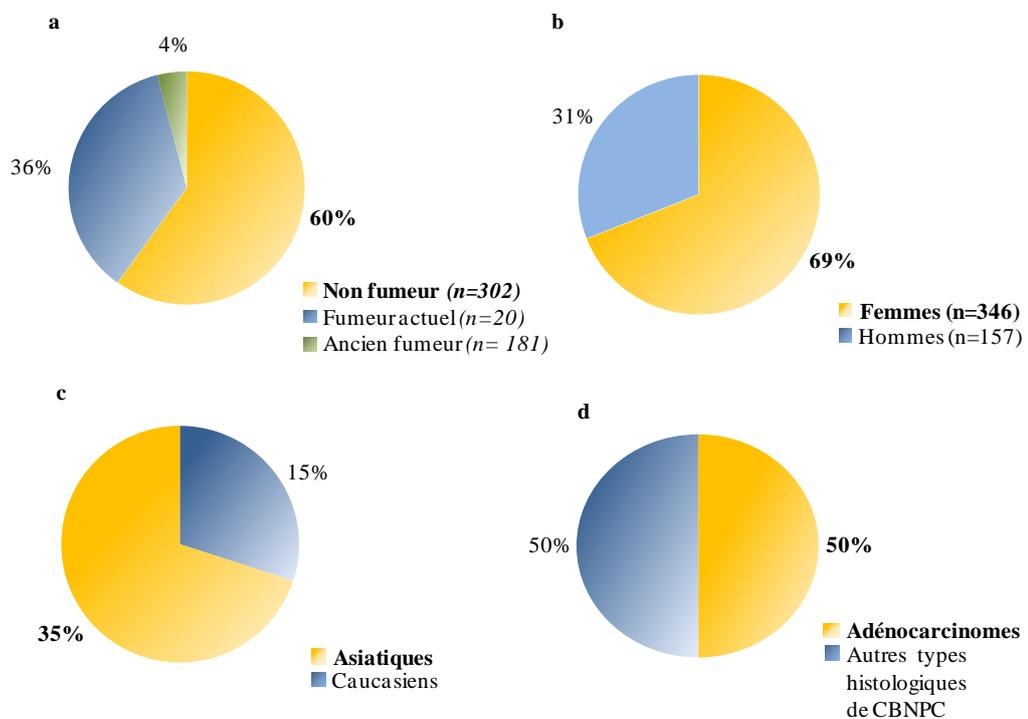


Figure 13: Statut mutationnel de l'EGFR (L858R et Del19) observé dans les CBNPC: a) selon l'activité tabagique, b) le sexe, c) l'origine ethnique, d) le type histologique de cancer (D'après D'Angelo S.P. et al., 2011).

Les mutations L858R et Del19 au niveau du domaine tyrosine kinase de l'EGFR sont davantage observées chez le non-fumeur, les femmes, les populations asiatiques et dans le sous-type adénocarcinome.

(c) *Conséquences structurales et biologiques*

- *Résistance du récepteur muté à la dégradation*

La présence des mutations sur le domaine tyrosine kinase de l'EGFR altère la reconnaissance par la protéine ubiquitine ligase Cbl (Shtiegman K. et al., 2007) à l'origine de l'ubiquitination du récepteur actif, de son endocytose puis de sa dégradation dans le lysosome (Haglund K. et al., 2002). Si la dégradation du récepteur muté est défectueuse, son internalisation est cependant toujours observée (Padrón D. et al., 2007) (**Figure 14**).

Certaines études suggèrent que l'hétérodimérisation privilégiée du mutant avec le récepteur ErbB2 pourrait être à l'origine du blocage du rétrocontrôle négatif de l'EGFR muté (Shtiegman K. et al., 2007), tandis que d'autres travaux expliquent la stabilisation des mutants de l'EGFR par son association avec la protéine chaperonne Heat Shock Protein 90 (HSP90) (Yang S. et al., 2006).

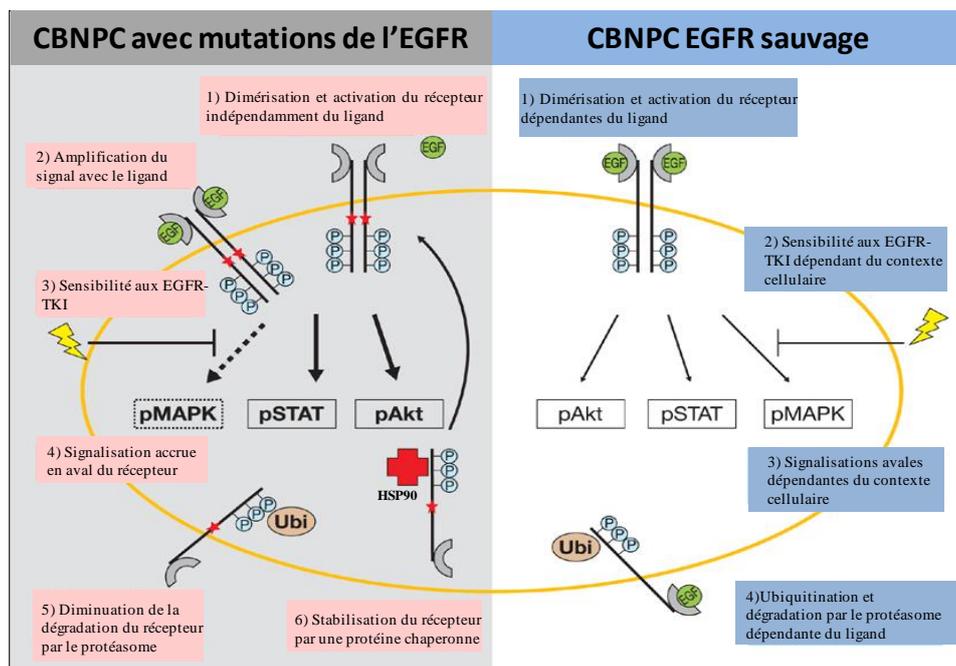


Figure 14: Conséquences biologiques des mutations L858R et Del19 de l'EGFR dans les CBNPC.

(Adapté de Imer D., Funk J.O. & Blaukat A., 2007).

Références complémentaires: Indépendance envers le ligand: Lynch T.J., et al, 2004 ; Paez J.G., et al., 2004 ; Amann J., et al., 2005; *Sensibilité aux EGFR-TKI:* Lynch T.J., 2004 ; Paez J.G. et al., 2004 ; Pao W. et al., 2004; *Activation continue des voies STAT et AKT:* Sordella R. et al., 2004 ; Haura E.B. et al., 2005 ; Alvarez J.V et al., 2006; *Activation nuancée des MAPK:* Amann J. et al., 2005; *Ubiquitination:* Shtiegman H. et al., 2007; *Stabilisation par HSP90:* Yang S. et al., 2006

- **Activation constitutive du récepteur muté**

Les mutations de l'EGFR sont situées à proximité de la poche de liaison à l'ATP du récepteur. Si ces mutations n'ont pas toutes la même incidence, avec des conséquences biologiques à nuancer (Sharma S.V. et al., 2007), les mutations L858R et Del19 induisent des changements conformationnels au niveau du domaine tyrosine kinase de l'EGFR conduisant à son « activation constitutive ». Il a été proposé dans le cas de la mutation L858R que la substitution soit à l'origine du blocage de l'EGFR dans une conformation active (Zhang X. et al., 2006).

L'activité enzymatique de la kinase de l'EGFR est augmentée par la présence de la mutation L858R ou Del19 de l'EGFR mais la spécificité au substrat ATP en est altérée (Mulloy R. et al., 2007). Dans des lignées de CBNPC présentant l'un des deux mutants, l'activation de l'EGFR pourrait être indépendante du ligand mais l'activité kinase est prolongée si le ligand est présent dans les conditions de culture (Lynch T.J. et al., 2004 ; Paez J.G., et al., 2004 ; Amann J. et al., 2005). L'indépendance vis-à-vis du ligand reste néanmoins un sujet controversé et dépendrait beaucoup des conditions utilisées *in vitro* (Sharma S.V. et al., 2007).

Consécutivement à l'activation de l'EGFR par les mutations L858R ou Del19, les voies PI3K/AKT et STAT 3/5 sont particulièrement actives (Sordella R. et al., 2004 ; Haura E.B. et al., 2005 ; Alvarez J.V. et al., 2006) (**Figure 14**). L'activation de la voie des MAPK est moins évidente puisque certaines études montrent une phosphorylation prolongée des intervenants de la voie suite à l'activation par les mutants de l'EGFR en comparaison au récepteur sauvage (Amann J. et al., 2005), tandis que d'autres n'observent pas de différence d'activation (Sordella R. et al., 2004).

- **Pouvoir transformant des mutants de l'EGFR**

Des études *in vitro* ont mis en évidence le pouvoir transformant des mutants EGFR-L858R et EGFR-Del19 à la fois dans des fibroblastes murins (Greulich H. et al., 2005 ; Carey K.D. et al., 2006) et dans des cellules épithéliales humaines de poumon (Greulich H. et al., 2005). L'augmentation du nombre de colonies témoigne de cette capacité transformante et s'accompagne d'une croissance indépendante du ligand et de l'adhésion au support, d'une perte de l'inhibition de contact, ainsi que de l'activation des protéines des voies de survie et de

prolifération par l'EGFR muté (STAT, AKT, Src, Shc) (Greulich H. et al., 2005 ; Chung B.M. et al., 2009).

De façon très intéressante, des modèles murins de tumorigenèse d'ADC pulmonaire humain porteur de mutants de l'EGFR ont été développés. Un ADNc humain codant pour l'EGFR-L858R ou l'EGFR-Del19 est cloné en aval d'un élément de réponse à la tétracycline. L'adjonction de la doxycycline constitue le signal d'activation de la transcription et permet l'expression du mutant de l'EGFR. L'induction des ces mutants dans l'épithélium pulmonaire de souris conduit à la formation de tumeurs analogues aux tumeurs pulmonaires humaines (Ji H. et al., 2006 ; Politi K. et al., 2006). En outre, ces modèles constituent un outil indispensable pour l'étude de la biologie des ADC pulmonaires et de leur réponse aux thérapies ciblées de type EGFR-TKI (Politi K. et al., 2010).

B.3.3. Altérations majeures des voies de signalisations de l'EGFR dans les CBNPC

B.3.3.1. La voie Ras/MAPK

L'altération majeure de cette voie correspond à la mutation K-Ras. Le gène *K-Ras*, situé sur le bras court du chromosome 12 (12p12.1), est muté au niveau du codon 12 dans 90% des cas (Herbst R.S. et al., 2008). Si les mutations activatrices pour H-Ras et N-Ras dans les cancers du poumon sont très rares (1% des cas) (Osada H. et al., 2002), la mutation K-Ras est observée 10% à 30% (Aviel-Ronen S. et al., 2008), voire dans 50% des CBNPC de type ADC (Shigematsu H. et al., 2005). La mutation généralement précoce de K-Ras consiste dans ce cas en une transversion G→T (purine→pyrimidine). Cependant, une transition G→A a été plus récemment identifiée chez des non-fumeurs (Riely G.J. et al., 2008). Soulignons que les mutations de K-Ras, observées majoritairement dans les ADC de fumeurs, sont mutuellement exclusives des mutations L858R et Del19 et définiraient donc des profils mutationnels distincts en fonction de l'exposition ou non aux carcinogènes du tabac.

Des mutations de la sérine/thréonine kinase B-RAF ont été identifiées dans 1 à 3% des CBNPC surtout de type adénocarcinome. Les mutations surviennent très majoritairement dans le domaine kinase à l'origine de l'activation de B-RAF puis de sa cible MAPK2 (MEK) (Davies H. et al., 2002 ; Naoki K. et al., 2002 ; Sasaki H. et al., 2006 ; Ding L. et al., 2008). Dans les modèles murins, l'expression d'un mutant de B-RAF contribue au maintien de la

tumeur (Ji H. et al., 2007b). A noter qu'en présence de la mutation de B-RAF, les mutations de l'EGFR et de K-Ras ne sont pas identifiables.

Enfin, de façon beaucoup plus anecdotique (1% des cas) et principalement dans les adénocarcinomes, des mutations de la sérine/thréonine kinase MEK-1 ont été observées (Marks J.L. et al., 2008 ; Sasaki H. et al., 2009). Ces mutations excluent la présence d'autres mutations telles que celles de l'EGFR, K-Ras, ErbB2, PI3KCA et B-RAF. Ces dernières données suggèrent que le blocage spécifique d'un EGFR sauvage pourrait ne pas s'avérer aussi efficace que la neutralisation thérapeutique d'un EGFR muté, puisque les altérations situées en aval maintiendraient une activation de la voie.

B.3.3.2. La voie PI3K/AKT

La région du gène *PIK3CA* (3q26) codant pour la sous-unité catalytique p110 α de la PI3K, est amplifiée dans 4.7% des lignées de CBNPC et dans seulement 1.6% des tumeurs de CBNPC étudiées. Des études précisent que l'incidence d'une telle amplification est plus forte dans les carcinomes épidermoïdes que dans les ADC (Yamamoto H. et al., 2008), chez l'homme et le fumeur (Kawano O. et al., 2007). Cette région est très rarement le siège de mutations (Samuels Y. et al., 2004), mais elles corréleraient dans ce cas avec une activation de la PI3K et de l'expression de AKT, faisant alors de la *PI3KCA* mutée un oncogène (Kang S. et al., 2005 ; Samuels Y. & Waldman T., 2010). Si les tumeurs ayant des mutations activatrices de *PI3KCA* ne présentent pas systématiquement une amplification de l'allèle muté (Okudela K. et al., 2007 ; Kawano O. et al., 2007), la mutation de la sous-unité catalytique p110 α de la PI3K peut co-exister avec les mutants de l'EGFR (Kawano O. et al., 2006 ; Yamamoto H. et al., 2008).

De façon plus significative, la phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin homologue), régulateur négatif essentiel de la voie PI3K/AKT, est souvent le siège de mutations inactivatrices dans les CBNPC et le gène *pten* subit fréquemment des délétions homozygotes, en particulier dans les carcinomes épidermoïdes (Forgacs E. et al., 1998; Kohno T. et al., 1998 ; Jin G. et al., 2010). D'autre part, l'hyperméthylation du promoteur du gène *pten* entraîne une perte de l'expression de la protéine PTEN dans 24% des CBNPC de stade précoce (Soria J.C. et al., 2002). La perte du rétrocontrôle négatif consécutivement à l'inactivation de PTEN constituerait un des mécanismes fondamentaux de l'activation aberrante de la voie PI3K/AKT.

Les mutations de AKT, en particulier de la forme ubiquitaire AKT-1, chez des patients atteints de CBNPC sont exceptionnelles (Sasaki H. et al., 2008; Kim M.S. et al., 2008 ; Do H. et

al., 2010). Elles ne sont observées que dans 1% des cas, principalement dans les carcinomes épidermoïdes (Ding L. et al., 2008 ; Malanga D. et al., 2008). Ces données suggèrent que l'activité soutenue de AKT résulterait davantage de l'activation en amont par les mutants de l'EGFR et/ou de la PI3K, que des mutations activatrices de AKT dans les CBNPC.

B.3.3.3. La voie des STAT

De façon surprenante, aucune mutation activatrice ni surexpression des acteurs de la voie JAK/STAT n'a jusqu'à présent été décrite dans les CBNPC. Pourtant, une activation persistante de STAT3 est détectée dans 54% des adénocarcinomes pulmonaires porteurs ou non de mutations activatrices de l'EGFR (Haura E.B. et al., 2005). Ce phénomène s'expliquerait par les dérégulations de facteurs impliqués dans l'activation ou l'inhibition de la voie.

L'activation anormale des STAT directement suite aux mutations activatrices du domaine tyrosine kinase de l'EGFR n'est pas le seul mécanisme d'activation de la voie. En effet, la tyrosine kinase Src est particulièrement exprimée dans les CBNPC (Masaki T. et al., 2003; Chung B.M. et al., 2009). Elle serait une autre source activatrice de la voie. D'autre part, notamment dans le cas de STAT3, l'activation serait davantage favorisée par le récepteur à l'IL-6 « gp130 » suite à la stimulation par son ligand spécifique (Gao S.P. et al., 2007).

Parallèlement, les phosphatases à l'origine du rétrocontrôle négatif à différents niveaux de la voie peuvent être inactivées. C'est le cas de SOCS-3, qui se lie aux sites de fixation des JAK sur les récepteurs des cytokines et empêchent la phosphorylation de STAT3 dans un contexte physiologique. Or, SOCS-3 est fréquemment perdue dans les tumeurs broncho-pulmonaires humaines par hyperméthylation de son promoteur (He B. et al., 2003) et lève ainsi un des contrôles négatifs de la phosphorylation des STAT3. De même, PIAS-3, à l'origine de l'inhibition de la fixation de STAT3 sur les sites consensus des promoteurs de ses cibles, est très faiblement exprimée dans certains adénocarcinomes pulmonaires, surtout dans les carcinomes épidermoïdes. Cette expression anormalement diminuée ne serait attribuée ni à des mutations du gène PIAS-3, ni à une méthylation aberrante de son promoteur, mais plutôt à une dégradation excessive de la protéine (Kluge A. et al., 2011). Enfin, une étude révèle que 18% des cancers broncho-pulmonaires humains étudiés présentent une perte de la phosphatase spécifique de STAT3, la PTP-RT (Wang Z. et al., 2004).

B.4. Thérapies anti-EGFR dans les CBNPC

L'EGFR constitue une cible de choix dans le traitement des CBNPC. Les thérapies utilisant les anticorps monoclonaux ciblant le domaine extracellulaire de l'EGFR ont été approuvées pour le traitement des cancers du sein, tête et cou et colorectal. En revanche, ces thérapies n'ont pas encore obtenu l'autorisation pour le traitement des CBNPC et seuls deux inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) spécifiques de l'EGFR sont actuellement utilisés dans ce cadre: le gefitinib (ZD 1839, IRESSA®) et l'erlotinib (OSI-774, TARCEVA®) (Nyati M.K. et al., 2006).

B.4.1. Principe général d'action des EGFR-TKI

La vaste famille des inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) se compose de petites molécules pharmacologiques actives oralement (Barker A. et al., 2001; Wakeling A.E. et al., 2002) et utilisées dans le traitement de nombreuses pathologies tumorales. Parmi les pharmacophores identifiés lors du développement des TKI, la classe des anilquinazolines est aujourd'hui la plus représentée dans les essais cliniques.

Le noyau quinazoline se fixe de façon réversible ou irréversible dans la poche ATP du récepteur. L'ATP ne peut plus fournir le groupement phosphate à transférer sur le substrat à phosphoryler ce qui inhibe l'activité tyrosine kinase de la cible (EGFR). Consécutivement, les voies de signalisation de survie et de prolifération cellulaire se trouvent également bloquées, et la cellule meurt par apoptose.

B.4.2. Le gefitinib et l'erlotinib : des études cliniques à l'utilisation thérapeutique dans les CBNPC

Les premiers essais cliniques sur le gefitinib et l'erlotinib (Lynch T.J., 2004 ; Paez J.G. et al., 2004 ; Pao W. et al., 2004), ont permis d'identifier les deux mutations activatrices L858R et Del19 de l'EGFR, puis de les caractériser comme facteurs de sensibilité aux EGFR-TKI dans les CBNPC de type ADC. En effet, les mutations de l'EGFR occupent un rôle central presque exclusif pour la croissance et la survie de ces tumeurs qui sont donc totalement dépendantes aux signaux de croissance, de survie et de prolifération induits par l'EGFR muté (Sordella R. et al., 2004 ; Tracy S. et al., 2004 ; Sharma S.V. et al., 2006). Les EGFR-TKI ciblent ce « tendon

d'Achille » et provoquent une rupture soudaine de l'ensemble des signaux de survie et de prolifération aboutissant à un « choc oncogénique » (Weinsten I.B., 2002) (**Figure 15**) au cours duquel l'absence de ces signaux induit un arrêt du cycle cellulaire, puis l'apoptose de la cellule tumorale (Tracy S. et al., 2004).

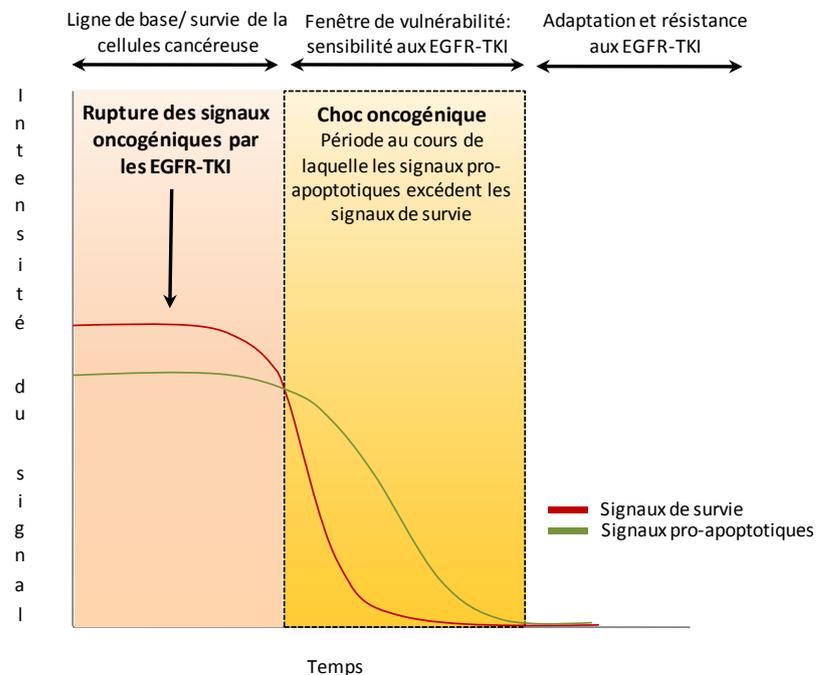


Figure 15: Mécanisme d'action des EGFR-TKI: Principe du « choc oncogénique » (Adapté de Sharma S.V. et al., 2007).

Le modèle du « choc oncogénique » repose sur la dépendance des cellules tumorales notamment *vis-à-vis* des signaux de survie contrôlés par certains oncogènes, et s'explique par les variations de la balance des signaux pro-apoptotiques et de survie. Les signaux de survie (courbe rouge) émanant d'un oncogène actif au sein de la cellule cancéreuse prédominent sur les signaux pro-apoptotiques (courbe verte). Les EGFR-TKI bloquent la fonction oncogénique créant ainsi une chute des signaux de survie en faveur des signaux pro-apoptotiques. Il s'agit de la « fenêtre de sensibilité » conduisant à l'apoptose de la cellule tumorale. Dans certains cas, cet effet pourrait être transitoire: la cellule s'adapterait aux EGFR-TKI, développerait des résistances et surmonterait ainsi le phénomène de « choc oncogénique ».

Les premières études cliniques ont permis de vérifier cette théorie en montrant une activité tumorale importante du gefitinib (« IDEAL-1 », Fukuoka M. et al., 2003 ; « IDEAL-2 », Kris M.G. et al., 2003) et de l'erlotinib (Perez-Soler R., 2004) en monothérapie, chez des patients ayant préalablement reçu une ou plusieurs lignes de chimiothérapie aux sels de platine. Les études plus récentes de phase III ont été effectuées sur une population dont le statut mutationnel de l'EGFR a été préalablement défini après biopsie. Les taux de réponse peuvent atteindre 75% avec une augmentation de la survie sans progression tumorale de 9.7 mois (Inoue A. et al., 2006). L'efficacité des deux EGFR-TKI en monothérapie de 2^{ème} et 3^{ème} ligne est confirmée

(Shepherd F.A. et al., 2005 ; « INTEREST » ; Kim E.S. et al., 2008 ; « iPASS », Mok T.S. et al., 2009) et il a été également montré que le gefitinib est efficace en 1^{ère} ligne de traitement (Sequist L.V. et al., 2008 ; Inoue A. et al., 2009). L'efficacité de l'erlotinib en première ligne de traitement est longtemps restée controversée (Pao W. & Chmielecki J., 2010), mais une étude très récente semble indiquer un bénéfice sur la survie sans progression tumorale d'un tel traitement par rapport à la chimiothérapie (Zhou C. et al., 2011). Cependant, ces études montrent invariablement une rechute de la maladie en moyenne après 12 mois de traitement, suggérant fortement l'apparition de mécanismes de résistance.

Enfin, à noter l'absence de bénéfice de la combinaison du gefitinib (« INTACT-1 », Giaccone G. et al., 2004 ; « IDEAL-2 », Herbst R.S. et al., 2004 ; « iPASS », Mok T.S. et al., 2009) ou de l'erlotinib (« TALENT », Gatzemeier U. et al., 2007 ; Moore M.J. et al., 2007) avec des agents conventionnels de chimiothérapie sur le taux de réponse et la survie médiane par rapport aux EGFR-TKI seuls. Une inhibition réciproque des actions des EGFR-TKI et des agents de chimiothérapie a été suggérée pour expliquer ces données (Perez-Soler R., 2007, Sharma S.V. et al., 2007).

Actuellement, la FDA et la Commission Européenne (Rapport-EMeA, juillet 2009) préconisent une utilisation restreinte des EGFR-TKI pour le traitement des ADC pulmonaires avec une mutation activatrice de l'EGFR, sauf pour l'erlotinib qui peut être prescrit en seconde ligne de traitement (ou plus) en cas d'échec des traitements conventionnels, et ce quelque soit le statut de l'EGFR (sauvage ou muté). Le gefitinib peut-être utilisé au Japon et en Europe dès la première ligne de traitement en remplacement d'une chimiothérapie à base de sels de platine. En novembre 2011, suite à l'étude EURTAC de phase III, l'erlotinib a également reçu l'AMM pour être utilisé dans cette indication.

Les EGFR-TKI offrent, en plus d'une toxicité moindre, un bénéfice sur la survie sans progression tumorale comparativement aux traitements conventionnels aux sels de platine. En revanche, le schéma actuel des essais cliniques (essais croisés des bras de traitement chimiothérapie/EGFR-TKI) ne permet pas de mettre en évidence un bénéfice des EGFR-TKI sur la survie globale des patients. Cependant, le manque d'efficacité durable et les rechutes de la maladie des patients traités par EGFR-TKI laissent suggérer que des facteurs autres que les mutants de l'EGFR participent à la réponse à ces traitements.

B.4.3. Les facteurs de réponse aux EGFR-TKI

Comme nous l'avons vu préalablement, les mutations L858R et Del19 de l'EGFR ont été décrites comme facteurs majeurs de sensibilité aux EGFR-TKI. Cependant, environ 25% des patients possédant un EGFR muté ne répondent pas au traitement (Oxnard G.R. et al., 2011). A l'inverse, 1 à 20% des patients n'ayant pas de mutation de l'EGFR présentent une réponse radiographique après traitement aux EGFR-TKI (Han S.W. et al., 2005a; Yang C.H. et al., 2008; Mok T.S. et al., 2009).

Si ces mutations jouent un rôle crucial dans la réponse aux traitements ciblés EGFR-TKI, d'autres facteurs interviennent très probablement, en faveur ou non, de la réponse au traitement (**Tableau 3**).

| Facteurs de sensibilité aux EGFR-TKI | Altérations | Mécanisme(s) d'action envisagé(s)/démontré(s) |
|--|--|---|
| Mutations somatiques du domaine TK de l'EGFR | L858R (exon 21) Del19 (exon 19) G719(C) (exon 18) L851Q (exon 21) | Augmentation de l'affinité pour l'EGFR-TKI, augmentation de la constante de dissociation de l'ATP * (modification conformationnelle) |
| Augmentation du nombre de copies du gène <i>egfr</i> | Amplification ou polysomie | Non identifié |
| Surexpression de l'EGFR | / | Non identifié |
| Facteurs de résistance aux EGFR-TKI | Altérations | Mécanismes d'action envisagé(s)/démontré(s) |
| Mutations somatiques du domaine TK de l'EGFR | T790M (exon 20) [⊗] D761Y (exon 19) T854A (exon 21) | Diminution de l'affinité pour l'EGFR-TKI (modification conformationnelle) |
| Perte de PTEN [◇] | Hyperméthylation du promoteur LOH Mutation | Levée du rétrocontrôle négatif sur la voie AKT/PI3K |
| PI3KCA [◇] | Mutation de la sous-unité activatrice | Activation persistante de la voie AKT/PI3K |
| Amplification de MET [⊗] | Génique/protéique | Substitution à l'EGFR pour activer les voies de survie (PI3K/AKT) |
| EMT [⊗] | Acquisition des caractéristiques phénotypiques de l'EMT | Atténuation de la dépendance aux signaux de survie issus de l'EGFR |
| CBPC [⊗] | Transition CBNPC en CBPC | Non identifié |
| ErbB2, ErbB3, IGF1-R [◇] | Hétérodimérisation avec l'EGFR muté | Blocage de l'efficacité de fixation de l'EGFR-TKI à l'EGFR |

Tableau 3: Principaux facteurs de sensibilité ou de résistance (primaire ou acquise) aux EGFR-TKI.

* Carey D. et al., 2006

Résistances décrites principalement comme primaires

[⊗] Résistances décrites principalement comme acquises, après traitement aux EGFR-TKI

B.4.3.1. Facteurs de sensibilité aux EGFR-TKI

D'autres **mutations activatrices** que L858R et Del19 dans le domaine tyrosine kinase de l'EGFR affectent les exons 18, 19, 20 et 21 (**Figure 16**) et pourraient aussi favoriser la sensibilité aux EGFR-TKI. C'est le cas des substitutions G719C (exon 18) (Lynch T.J. et al., 2004) et de L851Q (exon 21) (Paez J.G. et al., 2004 ; Lynch T.J. et al., 2004) (Wu J.Y. et al., 2011). Des études complémentaires sont nécessaires afin de déterminer si les patients exprimant ces mutations pourraient être traités efficacement par les EGFR-TKI.

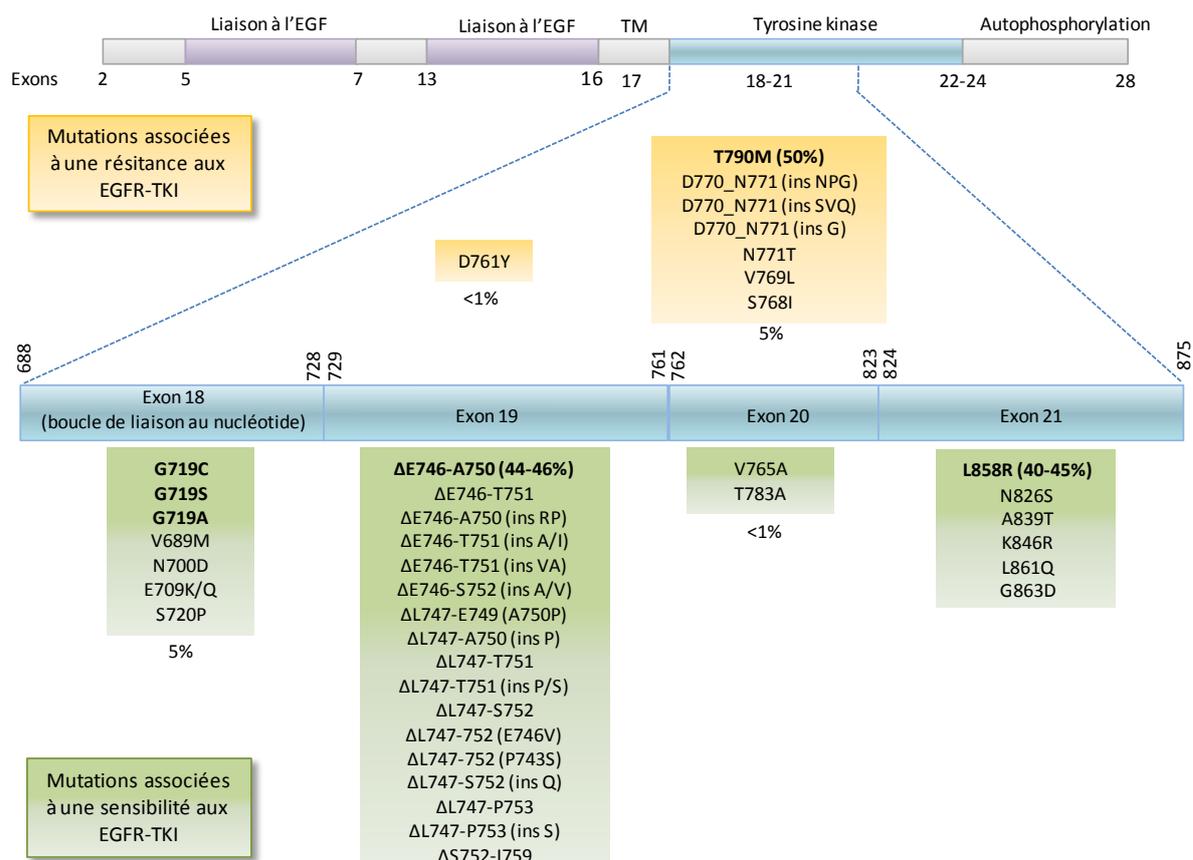


Figure 16: Les différentes sensibilités aux EGFR-TKI

selon les mutations du domaine tyrosine kinase de l'EGFR dans les CBNPC (D'après Sharma S.V. et al., 2007).

Le schéma représente le gène de l'*egfr* et la distribution des exons de son domaine extracellulaire (liaison à l'EGF), du domaine transmembranaire (TM) et du domaine intracellulaire incluant l'activité tyrosine kinase et les régions d'autophosphorylation du récepteur. Les exons 18-21 du domaine tyrosine kinase, porteurs des mutations d'intérêt, sont représentés sur la barre bleue agrandie. La liste détaillée des mutations de ces exons associées à la sensibilité aux EGFR-TKI (erlotinib ou gefitinib) apparaît dans les cadres inférieurs verts et celle des mutations associées à une résistance aux EGFR-TKI apparaît dans les cadres supérieurs jaunes. Les mutations les plus importantes de chaque classe sont notées en gras. Les deux mutations les plus fréquentes du domaine tyrosine kinase de l'EGFR dans les CBNPC sont les délétions (Δ) sans perte du cadre de lecture de l'exon 19 (ΔE746-A750 ou "Del19") et la substitution d'un résidu arginine en leucine au niveau du codon 858 de l'exon 21 (L858R). Ces deux mutations sont des facteurs majeurs de sensibilité aux EGFR-TKI. Plus récemment, les mutations G719X, qui affectent l'exon 18, ont également été associées à une sensibilité aux EGFR-TKI, mais sont d'incidence mineure. À l'inverse, la substitution d'un résidu méthionine en thréonine au niveau du codon 790 de l'exon 20 du gène de l'*egfr* constitue une mutation majeure de résistance acquise aux EGFR-TKI.

D'autre part, l'**augmentation du nombre de copies du gène sauvage *egfr***, par amplification ou polysomie, semble corrélér à une meilleure réponse aux EGFR-TKI, à une progression sur la survie sans progression tumorale et globale dans les CBNPC (Cappuzzo F. et al., 2005 ; Tsao M.S. et al., 2005) excepté chez les patients Japonais chez qui la survie globale reste inchangée (Takano T. et al., 2005). A noter une fréquente augmentation concomitante du nombre de copies du gène sauvage et muté : la sensibilité aux EGFR-TKI pourrait alors davantage résulter de la présence accrue de l'allèle muté que de l'augmentation du nombre de copies du gène sauvage. Les données sur une potentielle corrélation entre cette augmentation et la réponse aux EGFR-TKI sont par conséquent appréhendées avec précaution.

Enfin, l'étude clinique IDEAL ainsi qu'un certain nombre de travaux (Cappuzzo F. et al., 2003 ; Parra H.S. et al., 2004 ; Han S.W. et al., 2005b), n'ont pas établi de lien entre la **surexpression de la protéine sauvage** et la réponse aux EGFR-TKI. L'augmentation du nombre de copies du gène ou la surexpression du récepteur sauvage, deux phénomènes pouvant être indépendants, sont principalement observées chez les fumeurs et ne prédisposeraient pas à la même sensibilité aux EGFR-TKI que les mutations de l'EGFR majoritairement identifiées chez les non-fumeurs (Bell D.W. et al., 2005). Une nuance est tout de fois apportée par une étude plus récente indiquant que l'augmentation du nombre de copies du gène concomitante à la surexpression de la protéine constituerait un facteur prédictif positif dans le traitement au gefitinib (Hirsh F.R. et al., 2007).

B.4.3.2. Facteurs de résistance aux EGFR-TKI

Les résistances peuvent apparaître suite au traitement par EGFR-TKI qui favorise leur émergence. Nous distinguerons donc les facteurs de résistance dite « primaire », des facteurs de résistance « acquise ».

L'un des facteurs de résistance « primaire » aux EGFR-TKI correspond à l'activation persistante de la voie PI3K/AKT. La **perte de PTEN**, régulateur négatif essentiel de cette voie, décroît la sensibilité à l'erlotinib dans des cellules ayant un EGFR muté (Sos M.L. et al., 2009). A l'inverse, restaurer son expression sensibilise les cellules aux EGFR-TKI (She Q.B. et al., 2003 ; Bianco R. et al., 2003 ; Yamamoto C. et al., 2010 ; Kim S.M. et al., 2010). D'autre part, l'activité constitutive du mutant E545K de la PI3K induit une résistance au gefitinib *in vitro* (Engelman J.A. et al., 2006). Enfin, si l'incidence de la **mutation de la PI3KCA** est faible dans

les ADC pulmonaires, une étude récente montre une corrélation entre cette mutation et la résistance aux EGFR-TKI (Ludovini V. et al., 2011).

La mutation K-Ras est un cas particulier de résistance primaire: généralement exclusive des mutations de l'EGFR, il est relativement complexe de déterminer le réel facteur de résistance, les cellules ayant un EGFR sauvage étant moins enclines à répondre aux EGFR-TKI. Dans les très rares cas de co-existence des deux types de mutations, une résistance aux EGFR-TKI est observée (Han S.W. et al., 2006) sans amélioration notable de la survie des patients (Eberhard D.A. et al., 2005). De même, la mutation EML4-ALK détectée récemment dans un patient également porteur de mutation de l'EGFR et résistant à l'erlotinib, reste un cas à part de résistance primaire aux EGFR-TKI (Tiseo M. et al., 2011).

Des mécanismes de résistance peuvent également apparaître suite au traitement par EGFR-TKI. Comme nous venons de l'aborder, certaines mutations somatiques du domaine tyrosine kinase de l'EGFR peuvent constituer des facteurs de sensibilité, mais d'autres sont davantage des freins à l'efficacité des EGFR-TKI. La substitution de la méthionine par la thréonine au niveau de l'exon 20 (**T790M**), constitue une mutation de résistance acquise majeure détectée chez 50% des patients après traitement par gefitinib ou erlotinib (Kosaka T. et al., 2004 ; Kobayashi S. et al., 2005 ; Pao W. et al., 2005 ; Kwak E. L. et al., 2005 ; Gow C. H. et al., 2005 ; Inukai M. et al., 2006) (**Figure 16**). La mutation T790M est localisée à très grande proximité de la poche de liaison à l'ATP et, à l'inverse des mutations L858R et Del19, pourrait la modifier structurellement de façon à rendre difficile ou impossible la liaison aux EGFR-TKI. D'autres mutations situées entre les exons 19 et 21 (Balak M.N. et al. , 2006; Costa D.B. et al., 2008 ; Bean J. et al., 2008) ont une incidence plus anecdotique que la T790M mais sont nettement moins sensibles aux EGFR-TKI que les mutations L858R et Del19 (Greulich H. et al., 2005). De plus, les patients ayant différents types d'insertions sur l'exon 20 ont une croissance tumorale persistante même sous traitement aux EGFR-TKI (Wu J.Y. et al., 2008). Une étude *in vitro* plus globale suggère que les cellules doublement mutées pour l'EGFR avec les mutations « rares » décrites précédemment, répondraient moins bien au gefitinib que les cellules mutées L858R ou Del19 (Tam I.Y. et al., 2009).

L'**amplification de MET** est un mécanisme de résistance acquise notable puisque, dans certaines études, elle a été identifiée chez environ 20% des patients traités aux EGFR-TKI (Bean J. et al., 2007 ; Engelman J.A. et al., 2007 ; Beau-Faller M. et al., 2008) (**Figure 17**). L'amplification de MET se substituerait aux mutants de l'EGFR dans l'activation de différentes voies de prolifération après traitements aux EGFR-TKI en activant notamment une voie de survie PI3K/AKT dépendante de ErbB3 (Engelman J.A. et al., 2007). D'autres études

soulignent que la production autocrine de l'HGF, le ligand de MET, favorise aussi la résistance aux EGFR-TKI (Yano S. et al., 2008; Turke A.B. et al., 2010).

Il a été montré récemment que environ 30% des patients résistants aux EGFR-TKI possèdent un **phénotype de transformation EMT** (Epithelial to Mesenchymal Transition) (Chung J.H. et al., 2011 ; Sequist L.V. et al., 2011) (**Figure 17**). La dépendance des signaux de survie et de prolifération émanent des mutants de l'EGFR seraient amoindris au profit de signalisations différentes avec pour conséquence une moins bonne sensibilité aux EGFR-TKI (Frederick B.A. et al., 2007; Uramoto H. et al., 2010). Ces données démontrent la participation du stroma lors de l'acquisition de la résistance aux EGFR-TKI réversibles (Mink S.R. et al., 2010) et sollicitent l'étude de l'expression de marqueurs caractéristiques de la transition EMT dans la réponse aux EGFR-TKI.

Une observation surprenante a également été faite sur des patients ayant développé des adénocarcinomes avec mutation de l'EGFR évoluant vers un Cancer Broncho-pulmonaire à Petites Cellules (CBPC) lors de la rechute après traitements aux EGFR-TKI (Sequist L.V. et al., 2011) (**Figure 17**). Etonnement, les patients ne présentent ni mutation T790M, ni amplification de MET, mais conservent les mutations L858R ou Del19 de l'EGFR (Zakowski M.F. et al., 2006 ; Morinaga R. et al., 2007 ; Tatematsu A. et al., 2008). D'autres études sont actuellement en cours pour expliquer ce phénomène.

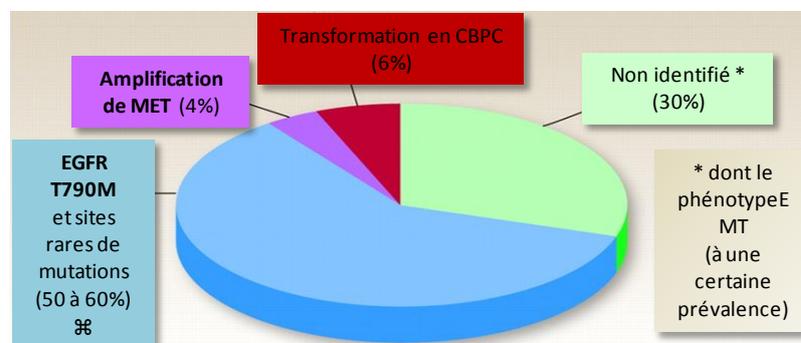


Figure 17: Répartition des facteurs de résistance acquise aux EGFR-TKI (Oxnard G.R. et al., 2011).

Les proportions ont été établies à partir de deux séries de biopsies, celle d'Arcila et collègues ($N = 99$) d'une part, et d'autre part celle de Sequist et collègues ($N = 37$). Le mécanisme majeur de résistance acquise aux EGFR-TKI est la mutation T790M de l'EGFR. L'amplification de MET représente ici les cas où la mutation T790M ne coexiste pas. Cependant, 3 à 4% des cas d'amplification de MET présentent aussi la mutation T790M. Dans le cadre d'une transformation en Cancer Broncho-pulmonaire à Petites Cellules (CBPC), les patients conservent les mutations de sensibilité aux EGFR-TKI (Del19 et L858R), mais n'expriment pas la mutation T790M, et ne présente aucune amplification de MET. Dans les mécanismes "non identifiés" sont compris les rares sites secondaires de mutation de l'EGFR, un cas unique de mutation acquise de la PIK3CA, de très rares mutations acquises de la β -caténine (comprenant la mutation T790M) et le phénotype EMT ("Epithelial Mesenchymal Transition"). L'EMT a été étudiée sur une faible proportion de patients et la prévalence s'avère être incertaine. Environ un quart des mécanismes de résistance acquise ne sont actuellement pas identifiés.

⌘Références complémentaires: D761Y (Balak M.N. et al., 2006); L747S (Costa D.B. et al., 2008); T854A (Bean J. et al., 2008).

B.4.4. Mutations de l'EGFR, CBNPC et réponse aux EGFR-TKI : le trio infernal

L'utilisation des EGFR-TKI sur une population sélectionnée de patients atteints de CBNPC de type adénocarcinome avec soit la mutation L858R ou Del19 de l'EGFR s'avèrerait bénéfique dans les protocoles de traitement de ces patients. Cependant, l'évidente complexité des mécanismes moléculaires mobilisés au cours du traitement par EGFR-TKI dépasse largement le schéma mécanistique initialement observé dans les premières études cliniques avec une cible (l'EGFR muté) et une conséquence biologique (le choc oncogénique suivi de la mort de la cellule tumorale).

La réalité fonctionnelle dans une cellule cancéreuse met à l'épreuve ce schéma binaire simple, suggérant fortement la participation de multiples autres acteurs protéiques dans la signalisation aberrante des mutants de l'EGFR et dans la réponse aux EGFR-TKI. Affiner les connaissances des mécanismes moléculaires impliqués d'une part, dans la tumorigenèse des ADC pulmonaires mutés pour l'EGFR et, d'autre part, dans la réponse aux EGFR-TKI, est devenu un impératif afin d'appréhender l'efficacité des traitements et d'ajuster au mieux les traitements en fonction des caractéristiques génétiques des patients.

C. La protéine suppresseur de tumeur p14^{ARF} : structure, fonctions et statut dans les cancers

La protéine p14^{ARF} est issue de l'expression d'un locus porté par le chromosome 9p21 codant aussi pour deux autres protéines suppresseur de tumeur, p16^{INK4a} et p15^{INK4b}. Cette région est très fréquemment altérée dans les tumeurs humaines, et pendant longtemps, la protéine p16^{INK4a} fut considérée comme la cible principale de cette délétion, suggérant son importance prépondérante par rapport à p15^{INK4b} et p14^{ARF} dans la prévention du développement tumoral. Cependant, il est désormais établi que p15^{INK4b} et p14^{ARF} tiennent des fonctions probablement tout aussi importantes dans la surveillance tumorale. La protéine p14^{ARF} occupe notamment une place centrale dans la signalisation dépendante de p53, mais s'intègre aussi dans des signalisations totalement indépendantes de p53.

Nous décrirons dans ce chapitre la structure, la régulation ainsi que le statut de p14^{ARF} dans les cancers, et notamment dans les CBNPC, en précisant les dernières études pertinentes effectuées sur p14^{ARF}. Nous axerons la description des données existant sur p14^{ARF} et non sur son homologue murin p19^{Arf}, car les deux protéines ne possèdent que 50% d'homologie à l'origine de certaines différences fonctionnelles.

C.1. Le locus INK4b/ARF/ INK4a : une structure atypique

La protéine p14^{ARF} est codée par le locus INK4b/ARF/INK4a situé en position p21 du chromosome humain 9 (Quelle D.E. et al., 1995). Ce locus code également pour deux protéines inhibitrices des cyclines dépendantes des kinases 4/6 (CDK), p15^{INK4b} et p16^{INK4a}, impliquées dans la régulation de la phase G1 du cycle cellulaire. La protéine p14^{ARF} provient de l'épissage alternatif de l'exon 1 β mais incorpore également des séquences codées par les exons 2 et 3 d'*INK4a*, d'où son nom « **Alternative Reading Frame** » (**Figure 18**). Si les gènes *Arf* et *p16^{INK4a}* partagent deux exons en commun, leurs régulations géniques sont potentiellement indépendantes du fait de la présence d'un promoteur propre. Les protéines p14^{ARF} et p16^{INK4a} ne sont donc pas des isoformes, elles n'ont aucune homologie de séquences et possèdent des fonctions biologiques distinctes. En effet, la protéine p16^{INK4a} est un régulateur essentiel dans la voie Rb/E2F, tandis que la protéine p14^{ARF} a été initialement décrite pour s'intégrer dans la

voie p53/Hdm2 (Human double-minute 2 pour la forme humaine ; Mdm2, Mouse double-minute 2 pour la forme murine).

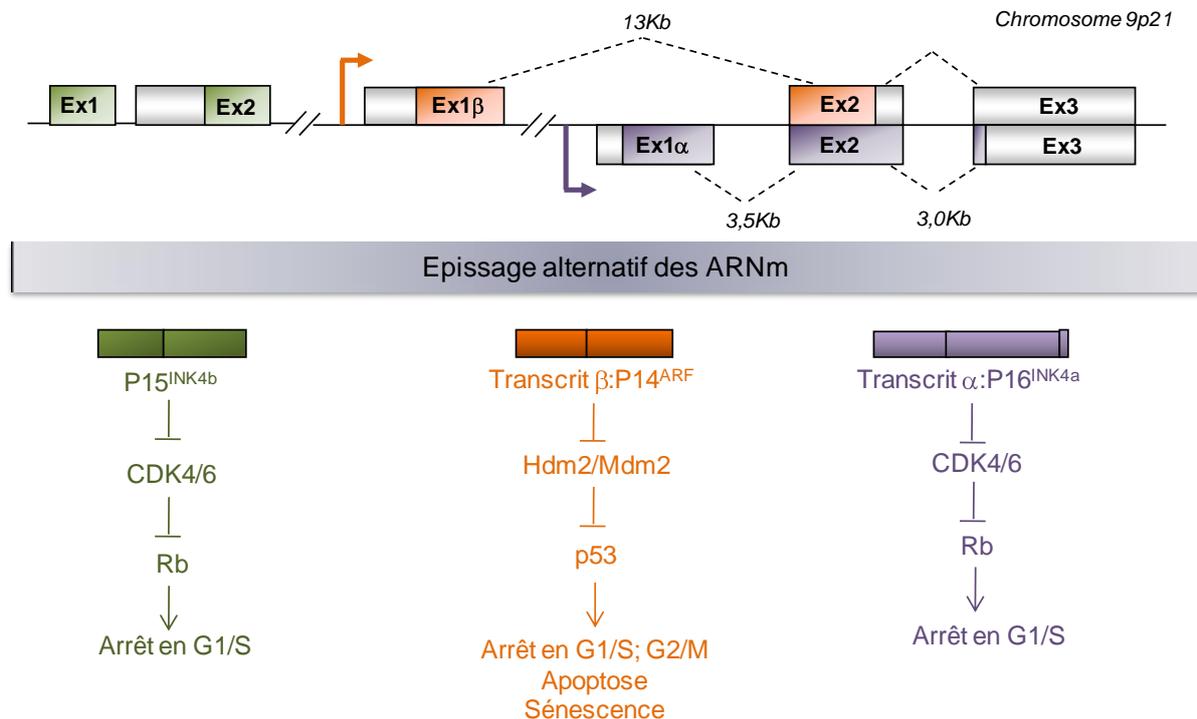


Figure 18: Structure du locus INK4a/ARF/INK4b et fonctions biologiques initialement identifiées pour les protéines suppresseur de tumeur p15^{INK4b}, p14^{ARF} et p16^{INK4a}

(D'après Quelle, D.E. et al., 1995; Gil J. & Peters, G. et al., 2006).

Le locus INK4b/ARF/INK4a, situé sur le chromosome humain 9p21, porte 3 gènes. La transcription de ces gènes, puis l'épissage alternatif de leurs ARNm conduit à la production finale de trois protéines suppresseur de tumeur distinctes: p15^{INK4b} et p16^{INK4a} principalement impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire *via* la voie Rb/E2F, et p14^{ARF} qui contrôle le cycle cellulaire et/ou l'apoptose notamment *via* la voie p53/Hdm2. A noter que les gènes p16^{INK4a} et p14^{ARF} sont chacun situé en aval d'un promoteur (flèche orange pour p14^{ARF} et flèche violette pour p16^{INK4a}) permettant une régulation transcriptionnelle individuelle des deux gènes.

La structure primaire de p14^{ARF} est surprenante. Composée 132 acides aminés, dont plus de 20% d'arginine mais sans aucune lysine, p14^{ARF} est une protéine très basique et hautement hydrophobe. De façon intéressante, aucun motif consensus de reconnaissance n'a pu être identifié pour p14^{ARF} mais de nombreux partenaires lui ont été accordés (Sherr C.J., 2006). Il est suggéré que p14^{ARF} s'associe avec différents partenaires protéiques qui lui assurent une certaine conformation et neutralisent son pH hyperbasique en conditions physiologiques. Une autre particularité structurale consiste en la présence d'une méthionine interne (Met48) pouvant être le point de départ d'une transcription alternative produisant une isoforme courte de p14^{ARF} appelée smARF (Small Mitochondrial ARF) et qui se localise dans la mitochondrie (Reef S. et al., 2006). Cependant, la protéine intégrale se localise préférentiellement dans le nucléole grâce à la présence de séquences de localisation nucléaire NoLS (Nuclear Localization Signal). Deux

NoLS ont été identifiés pour p14^{ARF} : le premier site se trouve également dans l'exon 1β et la délétion de cette séquence empêche p14^{ARF} de se lier à Hdm2 et de bloquer le cycle cellulaire, suggérant une contribution aux fonctions antiprolifératives de p14^{ARF} (Rizos H. et al., 2000). Le second site se localise dans l'exon 2 (acides aminés 83-101) et serait impliqué dans la capacité de p14^{ARF} à sumoyler certains de ses partenaires (Xirodimas D.P. et al., 2002).

C.2. La régulation de p14^{ARF} : originale et complexe

La protéine p14^{ARF} est un senseur de différents stimuli, mais, de par la structure génomique du locus INK4b/ARF/INK4a, il est souvent difficile de distinguer les mécanismes moléculaires et épigénétiques gouvernant spécifiquement la régulation de p14^{ARF}.

C.2.1. Stabilité et renouvellement de p14^{ARF}

La demi-vie de p14^{ARF} varie de 1h à 6h selon les modèles cellulaires (Rodway H. et al., 2004 ; Kuo M-L. et al., 2004). Mais les mécanismes impliqués dans le renouvellement de p14^{ARF}, ne sont pas encore pleinement élucidés.

Des premières études montrèrent une stabilisation de p14^{ARF} suite à des traitements par des inhibiteurs du protéasome, suggérant que la dégradation de p14^{ARF} est en partie prise en charge par le protéasome 26S (Pollice A. et al., 2004 ; Kuo M-L. et al., 2004 ; Rodway H. et al., 2004). La dégradation d'une protéine par le protéasome 26S implique généralement l'ubiquitination de cette protéine sur des résidus lysine. Ces mêmes études indiquent que malgré le manque de résidu lysine, la dégradation de p14^{ARF} par le protéasome 26S dépendrait d'un mécanisme d'ubiquitination rare dans les cellules eucaryotes sur trois résidus N-terminaux de p14^{ARF} (Méthionine-Valine-Arginine). De façon surprenante, l'interaction de p14^{ARF} avec une ATPase du complexe régulateur 19S du protéasome 26S, la « Tat-Binding Protein-1 » (TBP-1) (Pollice A. et al., 2004), protège p14^{ARF} de la dégradation par le protéasome 26S (Pollice A. et al., 2007). Enfin, d'autres données montrent que le protéasome REG-γ pourrait également assurer une dégradation de p14^{ARF} indépendante de l'ubiquitination (Chen X. et al., 2007).

D'autre part, la localisation sub-cellulaire de p14^{ARF} constitue aussi un autre mécanisme d'influence sur sa stabilité. En effet, si la protéine est relativement stable lorsqu'elle est confinée dans le nucléole, sa dégradation et son renouvellement sont beaucoup plus rapides

dans le nucléoplasme, ou le cytoplasme. La localisation sub-cellulaire de p14^{ARF} dépend étroitement de ses partenaires, notamment la nucléophosmine (NPM, B23, numatine or encore NO38). La NPM est une abondante phosphoprotéine nucléolaire de 37 kDa, partenaire fondamental pour la compartimentalisation, la stabilité (Kuo M-L. et al., 2004) mais également pour la fonctionnalité de p14^{ARF} (Itahana K. et al., 2003 ; Colombo E. et al., 2006).

C.2.2. Induction de p14^{ARF}

Généralement faiblement exprimée dans les cellules humaines normales, l'expression de p14^{ARF} peut être induite par des stimulus oncogéniques spécifiques tel que E2F-1 (del Arroyo A.G. et al., 2007), notamment dans des cellules en sénescence (Dimri G.P. et al., 2000). D'autres membres de la famille E2F, E2F-2 et E2F-3, peuvent également induire l'expression de p14^{ARF} (Parisi T. et al., 2002). De façon intéressante, l'expression de p14^{ARF} est inchangée après stimulation par Ras seul (Sharpless N.E., 2004), mais peut être stimulée par une action coopérative de Ras avec Sp-1 et E2F-1 (Berkovich E. et al., 2003).

L'exposition à des stress génotoxiques variés tels que le cisplatine, le cyclophosphamide, la doxorubicine ou encore aux carcinogènes tabac induisent aussi l'accumulation de p14^{ARF} (Eymin B. et al., 2006a). Plus récemment, il a été montré que l'expression de p14^{ARF} pouvait être induite suite à un stress oxydatif et un choc thermique (Damalas A. et al., 2011). En revanche, l'exposition à des doses modérées de radiations ionisantes, induiraient davantage une redistribution de p14^{ARF} du nucléole vers le nucléoplasme, en vue d'une interaction avec Hdm-2, que son accumulation (Lee C. et al., 2005).

Enfin, de façon beaucoup plus rare, l'expression de p14^{ARF} pourrait être favorisée par certaines infections virales pour contrecarrer l'action virale (Garcia M.A. et al., 2006).

C.2.3. Régulation de la transcription de p14^{ARF}

L'étude de l'expression de facteurs de transcription dans les cancers humains, a permis d'en identifier certains comme régulateurs spécifiques du gène *Arf* ou du locus INK4a/ARF (**Tableau 4**). Parmi eux, les facteurs Twist (Kwok W.K. et al., 2007), TBX-3 (T-Box 3) (Brummelkamp T.R. et al., 2002) ou TBX-2 (Jacobs J.J. et al., 2000) répriment spécifiquement la transcription de p14^{ARF}. Par ailleurs, une étude décrit une corrélation inverse entre

l'expression de Bmi-1, membre du groupe Polycomb (Pc-G), et l'expression des protéines p14^{ARF} et p16^{INK4a} dans les CBNPC (Vonlanthen S. et al., 2001). Ces données corrélerent avec une étude montrant qu'un second membre du groupe Pc-G, la protéine CBX-8, interagit avec Bmi-1 pour se lier au locus INK4a/ARF et réprimer sa transcription dans les cellules humaines d'ostéosarcome (Dietrich N. et al., 2007).

A l'inverse, d'autres facteurs de transcription sont activateurs de la transcription de p14^{ARF} tels que l'hétérodimère AP-1 contenant Fra-1, sous activation de Ras (Ameyar-Zazoua M. et al., 2005). Les membres de la famille E2F (E2F-1, E2F-2 et E2F-3) sont capables d'activer la transcription de p14^{ARF} par une liaison directe à son promoteur, ou grâce à leur interaction avec le facteur Sp-1 (Parisi T. et al., 2002). En effet, en collaboration avec Sp-1, E2F-1 peut se fixer sur le promoteur de p14^{ARF} grâce à des éléments de réponse distincts de ses sites consensus, pour promouvoir sa transcription (Komori H. et al., 2005).

| Facteurs de transcription inhibiteurs | Spécificité d'action | Références |
|--|----------------------------------|--|
| Bmi-1/CBX8 Groupe Pc-G | Locus INK4a/ARF | Vonlanthen S. et al., 2001 ; Dietrich N. et al., 2007 |
| Twist | Spécifique de p14 ^{ARF} | Kwok W.K. et al., 2007 |
| TBX2 | Spécifique de p14 ^{ARF} | Jacobs J.J. et al., 2000 |
| TBX3 | Spécifique de p14 ^{ARF} | Brummelkamp T.R. et al., 2002 |
| Facteurs de transcription activateurs | Spécificité d'action | Références |
| AP-1 (avec Fra-1) | Spécifique de p14 ^{ARF} | Ameyar-Zazoua M. et al., 2005 |
| Famille E2F +/-Sp1 | Spécifique de p14 ^{ARF} | Parisi T. et al., 2002 Komori H. et al., 2005 |

Tableau 4 : Facteurs de transcription impliqués dans la régulation du locus INK4a/ARF ou de p14^{ARF} spécifiquement.

Bmi-1, B-lymphoma Moloney murine leukaemia virus insertion region-1; CBX8, ChromoBoX homolog 8; Pc-G, Groupe Polycomb; TBX2, T-Box 2; TBX3, T-Box 3.

Par ailleurs, une étude montre que des cellules humaines d'ostéosarcome traitées par un inhibiteur des ADN méthyltransférases (5-aza-2'-deoxycytidine) présentent une augmentation significative et spécifique de la quantité d'ARNm et de la protéine p14^{ARF} (Badal V. et al., 2008). Ces résultats laissent suggérer que la régulation transcriptionnelle de p14^{ARF} pourrait aussi mettre en jeu un mécanisme méthylation spécifique sur son promoteur.

C.3. Fonctions physiologiques de p14^{ARF}

C.3.1. p14^{ARF} : un constituant essentiel de la voie p53

L'une des fonctions la mieux caractérisée de p14^{ARF} est sa capacité à activer la signalisation dépendante de p53 (**Figure 19**).

L'induction de p14^{ARF} entrainerait une interaction et une relocalisation dans le nucléole de l'inhibiteur de p53, l'ubiquitine-ligase Hdm2. Cela permettrait la stabilisation et l'activation de p53 (Sherr C.J., 2006). Cependant, des données suggèrent que l'inactivation de Hdm2 ne nécessite pas de relocalisation dans le nucléole. Dans ce modèle, p14^{ARF} sortirait du nucléole, où il est à l'état « inactif » en interaction avec NPM, vers le nucléoplasme pour interagir avec Hdm2 et induire la voie p53 (Lee C. et al., 2005). En tant que facteur de transcription, p53 active l'expression de différents gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Weber H.O. et al., 2002 ; Zhang W. et al., 2010) et G2 (Weber H.O. et al., 2002), la sénescence (Kwok W.K. et al., 2007) ou l'apoptose (Sharpless N.E., 2005).

Cependant, une partie des effets de p14^{ARF} dépendants de p53 n'impliquent pas Hdm2. En effet, après une activation oncogénique, p14^{ARF} peut stimuler la voie p53 en interagissant avec l'ubiquitine-ligase ARF-BP1/Mule (ARF-binding protein1/Mcl1-ubiquitin ligase E3). Cette interaction prévient la dégradation de la protéine p53 qui peut alors induire un arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose (Chen D. et al., 2005). D'autre part, certaines études ont montré que NF-κB était capable d'inhiber les effets suppresseurs de tumeur de p53 (Webster G.A. & Perkins N.D., 1999 ; Tergaonkar V., 2002). Or, en réponse aux dommages de l'ADN, p14^{ARF} induit la voie ATM/Chk1 nécessaire à la fois à l'inhibition par phosphorylation (Thréonine 505) de la sous-unité RelA de NF-κB impliquée dans la transcription de facteurs anti-apoptotiques, et à l'activation de p53 par phosphorylation sur le résidu sérine 15 (Rocha S. et al., 2005).

L'ensemble de ces données suggèrent fortement que l'inhibition de l'activité de NF-κB en réponse à p14^{ARF} régule l'activation des signalisations dépendantes de p53.

Enfin, dans des cellules humaines de carcinome colorectal, l'apoptose induite par p14^{ARF} dépend de la voie p53/PUMA/Bax, et serait facilitée par l'inhibition de p21^{WAF1} (Hemmati P.G. et al., 2010).

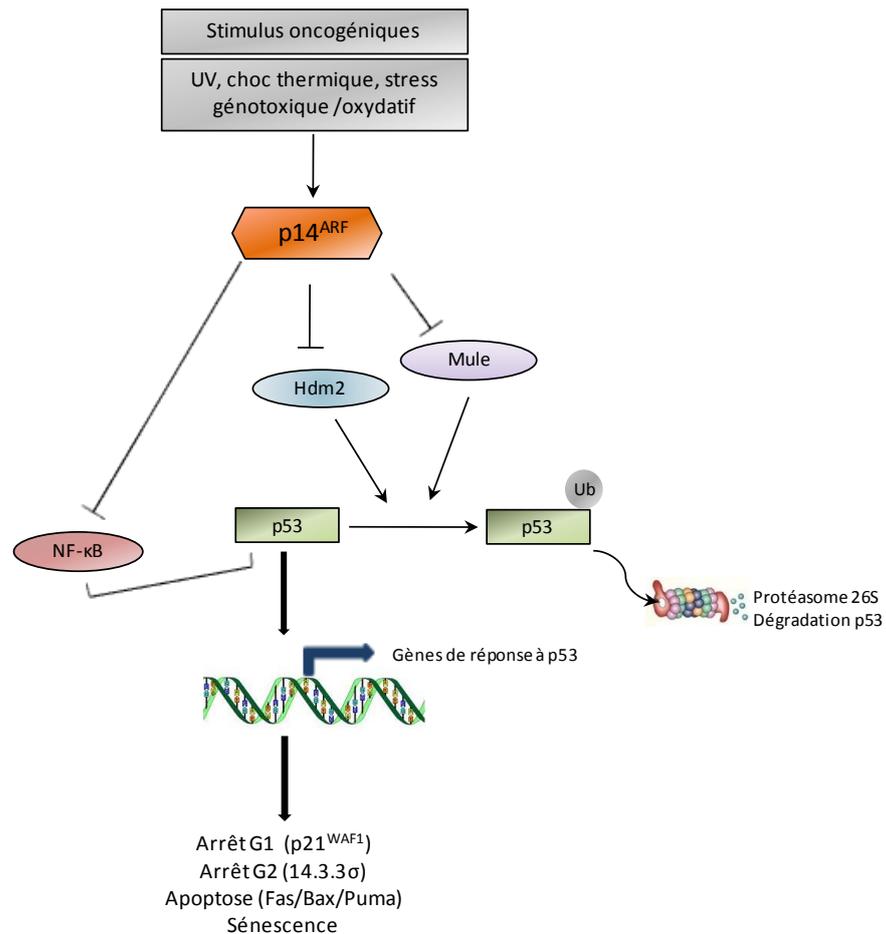


Figure 19: p14^{ARF} est un régulateur essentiel de la voie p53.

(Adapté de Bullock A.N. & Fersht A.R., 2001; Van Maerken T. et al., 2009; Brambilla E. & Gazdar A., 2009).

Suite à des stimulations oncogéniques (notamment E2F-1, E2F-2, E2F-3) ou l'exposition de la cellule à différents stress (génotoxiques, thermiques, UV, oxydatifs), l'expression de p14^{ARF} est induite, ce qui lui permet d'interagir avec l'ubiquitine-ligase Hdm2, le régulateur négatif essentiel de p53. La protéine p14^{ARF} peut également favoriser l'induction de la signalisation dépendante de p53 en bloquant l'ubiquitine-ligase ARF-BP1/Mule, ou en inhibant l'activité de NF-κB *via* la voie de réponse aux dommages de l'ADN, ATM/Chk1. La protéine p53 va ensuite induire un arrêt du cycle cellulaire en G1 (induction de la protéine p21^{WAF1}), en G2 (induction de la protéine 14.3.3σ), l'apoptose (par la voie Fas/Bax/Puma) ou encore la sénescence.

C.3.2. p14^{ARF} : un acteur indépendant de p53

C.3.2.1. Cycle cellulaire

La protéine p14^{ARF} est capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire en phase G2, suivi d'une apoptose dans des cellules humaines d'adénocarcinome pulmonaire. Ce mécanisme implique une inhibition de l'activité de la « Cyclin Dependant Kinase-1 » (Cdk1 ou CDC2), responsable de l'entrée en phase M, suite à l'inactivation de la phosphatase CDC25C et à l'induction de l'inhibiteur de Cdk, p21^{WAF1} (Eymin B. et al., 2003) (**Figure 20**). L'inactivation de CDC25C implique une phosphorylation sur son résidu sérine 216 par les kinases ERK1/2, suivie de son ubiquitination et de sa dégradation (Eymin B. et al., 2006b).

Plus récemment, il a été montré que p14^{ARF} freine la transition G1/S dans les cellules humaines de carcinome colorectal, par induction de la voie MEK/ERK et de l'expression de p21^{WAF1} indépendamment de p53 (Du H. et al., 2011). Dans ces cellules, p21^{WAF1} est nécessaire à l'arrêt en G1. En l'absence de p21^{WAF1}, les cellules s'arrêtent en G2 et/ou entrent en apoptose (Hemmati P.G. et al., 2005) en coopérant avec la protéine 14.3.3σ (Hemmati P.G. et al., 2008) ou en induisant la diminution de la kinase p34^{cdc2} (Normand G. et al., 2005).

Enfin, p14^{ARF} peut également contrecarrer les effets de protéines favorisant une progression anormale du cycle cellulaire tels que E2F-1 (Eymin B. et al., 2001 ; Mason S.L. et al., 2002) et plus récemment E2F-3 (Zhang H.J. et al., 2010), ou encore l'oncogène c-Myc (Datta A. et al., 2004) (**Figure 20**). p14^{ARF} s'oppose à la transcription de leurs cibles en empêchant le recrutement de co-activateurs et/ou séquestre ces facteurs dans le nucléole. Ainsi, p14^{ARF} interagit avec le facteur DP-1 (DRTF-1 Polypeptide-1) dans le nucléole pour prévenir son recrutement par E2F-1 en tant que co-activateur transcriptionnel (Datta A. et al., 2005). En outre, ces données mettent en évidence une boucle de rétrocontrôle entre p14^{ARF} et les membres de la famille E2F.

C.3.2.2. Apoptose

Suite à des stimulations oncogéniques ou des stress encore non identifiés, des motifs très hydrophobes situés en N-terminal de p14^{ARF} seraient démasqués et serviraient de signal d'import vers la mitochondrie (Irvine M. et al., 2010). Il a été montré que l'interaction avec

Hdm2, NPM ou la protéine mitochondriale p32 n'était pas nécessaire à la translocation de p14^{ARF} du nucléole vers la mitochondrie. En revanche, il a été suggéré que p32 favorise la rétention de p14^{ARF} dans la mitochondrie où elle pourrait interagir avec au moins douze partenaires, dont la protéine anti-apoptotique Bcl-xL (Itahana K, Zhang Y., 2008 ; Pimkina J. et al., 2009). L'importation nucléaire de p14^{ARF}, puis la formation de ces complexes mitochondriaux semblent induire une dépolarisation de la membrane mitochondriale et l'apoptose des cellules (**Figure 20**).

Par ailleurs, dans des cellules humaines de carcinome colorectal exprimant p53, p14^{ARF} induit une apoptose dépendante de l'expression des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak, tandis que dans les cellules n'exprimant pas une protéine p53 fonctionnelle, l'apoptose induit par p14^{ARF} est indépendante de Bax (Hemmati P.G. et al., 2006). En effet, les clones n'exprimant pas la protéine Bax ont une fragmentation de l'ADN et une activation des caspases aussi marquées en réponse à p14^{ARF} que les clones exprimant Bax. Ces données suggèrent que les signalisations apoptotiques induites par p14^{ARF} sont en partie distinctes en fonction de la présence ou non d'une protéine p53 fonctionnelle.

C.3.2.3. *Migration et Néo-angiogenèse*

Parallèlement à ses effets sur le cycle cellulaire et l'apoptose, p14^{ARF} bloque la migration et la capacité invasive *in vitro* et *in vivo* de cellules d'adénocarcinome ductal métastatique du pancréas dans lesquelles la protéine p53 est inactivée (Muniz V.P. et al., 2011). Ce mécanisme implique la dégradation d'un corépresseur transcriptionnel CtBP2 (C-terminal Binding Protein 2) ayant également des fonctions anti-apoptotiques (Paliwal S. et al., 2006) (**Figure 20**).

Une étude démontre également que p14^{ARF} module la néo-angiogenèse en coopération avec NPM, en bloquant l'expression de la forme pro-angiogénique VEGF α (Kawagishi H. et al., 2010) (**Figure 20**).

Ces travaux démontrent que p14^{ARF} peut agir indépendamment de l'axe p53/Hdm2 et lui accordent une importance bien plus grande que celle initialement suggérée dans la prévention du développement tumoral. p14^{ARF} étant de plus capable d'interagir avec de nombreux partenaires protéiques, d'autres activités contribuent à ses fonctions suppresseur de tumeur.

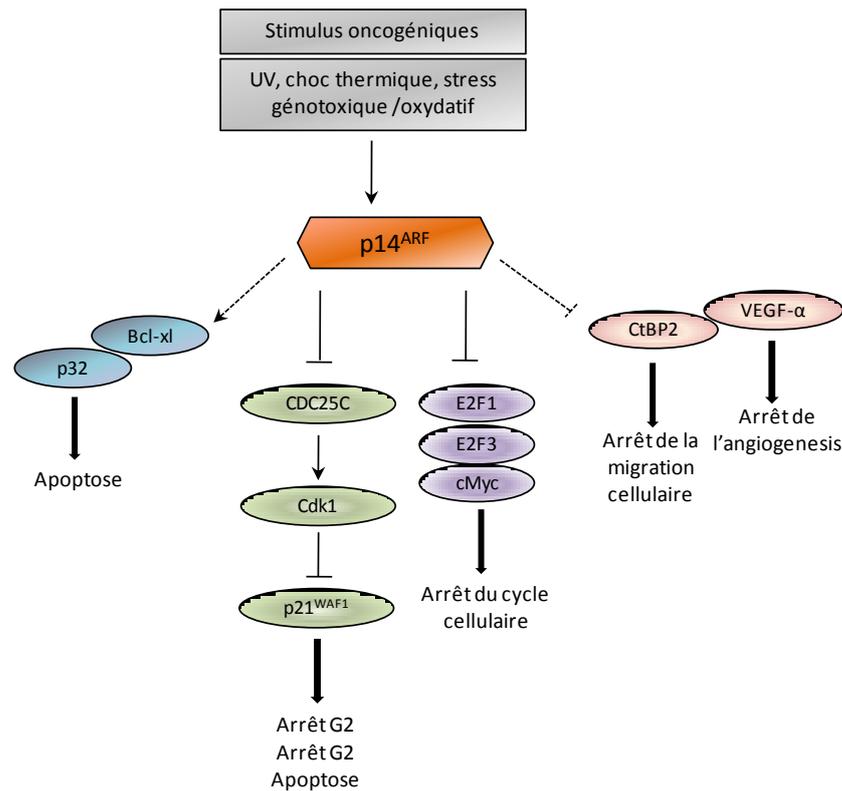


Figure 20: p14^{ARF} exerce des fonctions suppresseur de tumeur indépendamment de p53.

La protéine p14^{ARF} peut exercer des effets suppresseurs de tumeur indépendamment de la signalisation p53. p14^{ARF} peut induire un arrêt du cycle cellulaire (G1 ou G2) et/ou l'apoptose en favorisant l'expression de p21^{WAF1} par inactivation de CDC25C. p14^{ARF} peut aussi induire un arrêt du cycle cellulaire en s'opposant aux effets des membres de la famille E2F (E2F-1 et E2F-3) ou de l'oncogène c-Myc. p14^{ARF} s'intégrerait également dans une signalisation pro-apoptotique mettant en jeu le recrutement de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL et de la protéine mitochondriale p32 au niveau de la mitochondrie, dans l'arrêt de la migration cellulaire *via* la dégradation du corépresseur transcriptionnel CtBP2 ou encore dans le blocage de la néo-angiogenèse en inhibant l'expression de la forme pro-angiogénique VEGF- α .

C.3.3. Transcription et maturation des ARN ribosomiaux

Un des mécanismes clés de p14^{ARF} consiste à inhiber la biogenèse des ribosomes (Sugimoto M. et al., 2003). Depuis, d'autres études ont suggéré différentes explications mécanistiques pour décrire l'implication de p14^{ARF} dans le contrôle de la machinerie ribosomiale.

La protéine NPM prend part à de nombreuses fonctions cellulaires parmi lesquelles la biogenèse des ribosomes (Grisendi S. et al., 2006). En réponse à certains stress non identifiés, les deux protéines s'associeraient dans le nucléole de MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts) pour retarder la maturation et la synthèse des ARNr, et nuire à l'export des ribosomes du noyau vers le cytoplasme (Bertwistle D. et al., 2004). Dans des cellules humaines d'ostéosarcome, il a été montré que le complexe p14^{ARF}/NMP interagit avec la sous-unité ribosomique pré-60S afin

d'inhiber la formation des polysomes puis l'initiation de la traduction des protéines de la cellule (Rizos H. et al., 2006). Récemment, une étude indique également que p14^{ARF} interagit *in vitro* et *in vivo* avec la séquence d'importation nucléolaire de TTF-1 (ARN polymérase I Transcription Termination Factor-1), un facteur impliqué non seulement dans l'induction de la transcription des gènes des ARNr, mais également dans leur maturation (Lessard F. et al., 2010). Dans cette même étude, la protéine NPM aide TTF-1 à transiter dans le nucléole pour permettre la transcription des gènes des ARNr : il a été suggéré que p14^{ARF} s'oppose à ce transport en interagissant à la fois avec NPM dans le nucléole, et avec TTF-1 dans le nucléoplasme. La diminution de la quantité des ARNr totaux ainsi que le ralentissement de la maturation des précurseurs ribosomiaux concordent donc à l'accumulation de TTF-1 dans le nucléoplasme par p14^{ARF}.

D'autres travaux ont montré que p14^{ARF} pouvait également former un complexe avec la topoisomérase I (TOPO I) sur la chromatine contenant le promoteur des gènes des ARNr (Ayrault O. et al., 2003; Ayrault O. et al., 2004) pour favoriser les cassures de l'ADNr pour nuire à la synthèse ribosomique. Ce mécanisme pourrait impliquer un autre partenaire de p14^{ARF}, la protéine kinase CK2, responsable de la phosphorylation de TOPO I sur des résidus sérine (Bandyopadhyay K. et al., 2007 ; Bandyopadhyay K. & Gjerset R.A., 2011).

A noter que la perte de p14^{ARF} *in vivo* conduit à une activité ostéoclastique et ostéoblastique accrue liée à l'augmentation de la biogenèse ribosomique (Rauch D.A. et al., 2010), illustrant la nécessité d'un tel contrôle par p14^{ARF} pour maintenir une prolifération normale dans les cellules.

C.3.4. Réponse aux dommages de l'ADN

Nous avons montré au sein de l'équipe, que p14^{ARF} active la signalisation ATM/ATR/Chk en réponse à divers agents génotoxiques, induit un arrêt du cycle cellulaire en G2 et une apoptose indépendamment de p53. L'activation des kinases ATM/ATR/Chk1/2 implique une interaction entre p14^{ARF} et l'histone acétyltransférase TIP60, puis la stabilisation de celle-ci (Eymin B. et al., 2006a). Ces données positionnent p14^{ARF} en amont de la voie ATM/ATR en tant que senseur des différents dommages que peut subir une cellule.

Par ailleurs, contrairement au taxane, le traitement par cisplatine de cellules humaines de cancer ovarien ayant une protéine p53 mutée, induit l'expression de p14^{ARF} (Vaskivuo L. et al.,

2006). Ces travaux suggèrent une activation et une implication de p14^{ARF} dans la réponse aux traitements anticancéreux classiquement utilisés en chimiothérapie.

Enfin, p14^{ARF} est également un acteur de la stabilité chromosomique dans des cellules dépourvues de p53 (di Tommaso A. et al., 2009). Des études ont précédemment décrit que la majeure partie des activités anti-prolifératives de p14^{ARF} dépendent de résidus situés en N-terminal de la protéine et codés par l'exon 1β (Zhang Y. et al., 1998 ; Llanos S. et al., 2001 ; Korgaonkar C. et al., 2002). L'étude de di Tommaso A. et al. a également montré l'importance cruciale de quatre résidus (Valine²⁴, Thréonine³¹, Alanine⁴¹ et Histidine⁶⁰) afin que p14^{ARF} maintienne et/ou favorise la stabilité chromosomique dans les cellules humaines n'exprimant pas de protéine p53 fonctionnelle.

C.3.5. L'autophagie par p14^{ARF} : une auto-digestion aux conséquences ambiguës

Comme décrit en introduction de ce chapitre, il existe une forme tronquée rare de la protéine p14^{ARF} (< 5% du niveau total) nommée smARF qui est rapidement dégradée par le protéasome dans en conditions physiologiques, mais qui s'accumule dans la mitochondrie en réponse à des signaux prolifératifs anormaux. Souvent associée à une privation en nutriments, l'autophagie permet aux cellules de digérer leurs propres organelles pour obtenir de l'énergie.

Dans des cellules qui n'expriment pas p53 et/ou surexpriment Bcl-2, l'autophagie pourrait constituer un mécanisme alternatif à l'apoptose classique. En effet, la protéine smARF altère le potentiel de la membrane mitochondriale et déclenche une mort cellulaire indépendante des caspases dite de « type II » (Reef S. et al., 2006).

Les effets biologiques résultants de l'autophagie demeurent assez complexes à interpréter dans la mesure où ce mécanisme peut, selon le contexte, favoriser la mort cellulaire ou au contraire l'empêcher (Maiuri M.C. et al., 2007). Selon certains (Balaburski G.M. et al., 2010), une exacerbation de l'autophagie en réponse à p14^{ARF} pourrait contribuer à l'émergence de la tumeur et expliquerait l'expression persistante de p14^{ARF} dans certains types de cancers.

C.3.6. La sumoylation des partenaires de p14^{ARF} : une modification post-traductionnelle aux effets multiples

La protéine p14^{ARF} est capable d'induire la sumoylation sur des résidus lysine de certains de ses partenaires protéiques, notamment Hdm2 et NPM (Tago K. et al., 2005). La sumoylation est un processus au cours duquel un motif SUMO (Small Ubiquitin-like protein) est lié séquentiellement de façon covalente à la lysine d'une protéine cible. Les mécanismes impliqués dans la sumoylation par p14^{ARF} sont mal inconnus.

Les activités des protéases nécessaires pour le clivage des protéines SUMO avant conjugaison du motif sur la cible ne semblent pas être contrôlées par p14^{ARF} (Chen L. & Chen J., 2003). En revanche, sa capacité à lier la protéine Ubc9 (E2) indique que p14^{ARF} pourrait faciliter le transfert du groupement SUMO du complexe E2 vers la protéine cible.

D'une façon générale, les impacts biologiques du processus de sumoylation sont relativement mal caractérisés mais semblent hétéroclites, suggérant que la sumoylation induite par p14^{ARF} pourrait s'intégrer dans ses fonctions indépendantes de p53 (Tago K. et al., 2005).

C.4. Dérégulations de p14^{ARF} dans les cancers humains et CBNPC

La protéine p14^{ARF} est majoritairement inactivée dans les CBPC (65%, Gazzeri S. et al., 1998). Cependant, p14^{ARF} est également inactivée dans 55% des lignées cellulaires de CBNPC (Park M-J. et al., 2003) et dans 25% des tumeurs de CBNPC de type ADC (Gazzeri S. et al., 1998). La difficulté pour analyser les mécanismes responsables de l'inactivation spécifique de p14^{ARF} dans les CBNPC est en grande partie attribuable à la complexité du locus INK4a/ARF.

C.4.1. Délétion homozygote du locus INK4a/ARF: un pour tous, tous pour un

Dans la plupart des tumeurs humaines, la délétion homozygote du locus INK4a/ARF affecte à la fois l'expression de la protéine p16^{INK4a} et p14^{ARF}, et constitue un mécanisme majeur de la perte d'expression de p14^{ARF} notamment dans le cancer du poumon (Kohno T. et al., 2010). Dans les lignées de CBNPC, la délétion homozygote du locus INK4a/ARF survient dans > 35% des cas (Nicholson S.A. et al., 2001 ; Park M-J. et al., 2003). Dans les tumeurs de CBNPC, la délétion homozygote du locus a été observée dans 19% (Nicholson S.A. et al., 2001) à 31% des

tumeurs (Sanchez-Cespedes M. et al., 1999), avec une incidence similaire dans les ADC et les carcinomes épidermoïdes (Sanchez-Cespedes M. et al., 1999) (**Tableau 5**).

La perte d'hétérozygotie du locus a également été décrite dans différents cancers humains : tête/cou (Weber A. et al., 2003), sein (Silva J. et al., 2003) et dans 42% des CBNPC avec une prédominance dans les carcinomes épidermoïdes (26%) par rapport ADC pulmonaires (16%) (Sanchez-Cespedes M. et al., 1999) (**Tableau 5**).

Ces deux mécanismes aboutissent à la perte d'expression des protéines p16^{INK4a} et p14^{ARF} (Park M-J. et al., 2003).

| Altération | Spécificité | Fréquence | Références |
|--------------------------------|--|---------------------------------------|---|
| Délétion homozygote | Locus INK4a/ARF | Lignées : > 35% Tumeurs : 19 - 31% | Sanchez-Cespedes M. et al., 1999; Nicholson S.A. et al., 2001 ; Park M-J. et al., 2003 |
| LOH | Locus INK4a/ARF | Tumeurs : 42% | Sanchez-Cespedes M. et al., 1999 |
| Hyperméthylation | Promoteur de p14 ^{ARF} | Tumeurs : 5%, 9%, 30% | Zöchbauer-Müller S. et al., 2001; Esteller M. et al., 2000; Kim D.H. et al., 2003 ; Hsu H.S. et al., 2004 |
| Mutation exon 2 | p14 ^{ARF} et p16 ^{INK4a} | Lignées : 23% Tumeurs : 5% | Park M-J. et al., 2003 Sanchez-Cespedes M. et al., 1999 |
| Mutation exon 1β | p14 ^{ARF} | Non détectée | Gazzeri S. et al., 1998 ; Sanchez-Cespedes M. et al., 1999 ; Nicholson S.A. et al., 2001 ; Park M-J. et al., 2003 |
| Facteur de transcription Bmi-1 | p14 ^{ARF} et p16 ^{INK4a} | 4% et 5% respectivement | Vonlanthen S. et al., 2001 |

Tableau 5 : Altérations de l'expression de p14^{ARF} dans les CBNPC.

C.4.2. Hyperméthylation spécifique du promoteur de p14^{ARF}

La méthylation spécifique du promoteur de p14^{ARF} a été décrite à fréquence variable dans un grand nombre de cancers humains (cancers colorectaux, Esteller M. et al., 2000) (cancers gastriques, Tsujimoto H. et al., 2002 ; Tahara T. et al., 2010) (carcinomes épidermoïdes oraux, Kordi-Tamandani D.M. et al., 2010) (carcinomes de prostate, Konishi N. et al., 2002) (cancers

du sein, Silva J. et al., 2001) (neuroblastones après traitements, Carr-Wilkinson J. et al., 2010). L'expression de p14^{ARF} est également fréquemment perdue dans les ostéosarcomes humains par mécanisme de méthylation (Oh J.H. et al., 2006), donnée qui a été corrélée au développement de ces cancers dans un modèle murin (Rauch D.A. et al., 2010).

Les études sur l'hyperméthylation du promoteur de p14^{ARF} dans les CBNPC présentent des résultats hétérogènes. Dans certaines études, aucun cas de méthylation sur le promoteur spécifique de p14^{ARF} n'a été détecté dans les CBNPC (Kim D.H. et al., 2001 ; Sato M. et al., 2002 ; Park M-J. et al., 2003), tandis que certaines autres présentent des fréquences de méthylation très variables allant de 5-9% (Zöchbauer-Müller S. et al., 2001; Esteller M. et al., 2000) jusqu'à 30% (Hsu H.S. et al., 2004) (**Tableau 5**). Les techniques utilisées, les caractéristiques ethniques des patients donneurs ainsi que le type histologique et le stade d'avancement tumoral sont autant de paramètres susceptibles d'influencer les résultats.

L'étude de Hsu (Hsu H.S. et al., 2004) a également montré que les faibles niveaux d'expression de l'ARNm et de la protéine p14^{ARF}, observés plus fréquemment dans les CBNPC de type ADC que dans les carcinomes épidermoïdes, corrélaient avec l'hyperméthylation du promoteur de p14^{ARF}.

C.4.3. Mutations des exons 1β et 2

Quelques cas de mutations de l'exon 2 commun à p16^{INK4a} et p14^{ARF} ont été observés dans différents cancers, en particulier dans 23% des lignées cellulaires de CBNPC, tout type histologique confondu (Park M-J. et al., 2003), et dans 5% des tumeurs de CBNPC (Sanchez-Cespedes M. et al., 1999) (**Tableau 5**). Il en résulte presque systématiquement deux protéines non fonctionnelles (Park M-J. et al., 2003).

Les mutations affectant spécifiquement l'exon 1β sont très rares, voire inexistantes dans les CBNPC (Sanchez-Cespedes M. et al., 1999 ; Nicholson S.A. et al., 2001 ; Park M-J. et al., 2003) (**Tableau 5**).

Notre équipe a montré que la forte diminution de l'expression de la protéine p14^{ARF} n'est associée à aucune mutation délétère dans les exons 1β et 2, et que le transcrit « beta » est toujours exprimé dans la majorité des CBNPC, suggérant un éventuel mécanisme d'inhibition post-transcriptionnel (Gazzeri S. et al., 1998).

C.4.4. Autres mécanismes

L'expression aberrante de protéines contrôlant l'expression de p14^{ARF} pourrait conduire aussi à sa dérégulation dans les tumeurs.

Une étude réalisée dans des MEFs met en évidence une régulation spécifique de p19^{Arf} *in vitro* et *in vivo* par le répresseur transcriptionnel Pokemon (Maeda T. et al., 2005). Par ailleurs, la protéine Pokemon, codée par le gène *ZBTB7A*, est souvent amplifiée dans les CBNPC (Apostolopoulou K. et al., 2007). De plus, une corrélation inverse entre les expressions de Pokemon et de p14^{ARF} dans des tumeurs et lignées cellulaires de CBNPC a été établie (Zhao Z.H. et al., 2008), suggérant que Pokemon réprime la transcription de p14^{ARF} dans certaines tumeurs humaines.

Par ailleurs, si aucun lien n'a été établi entre la protéine Bmi-1 et la modulation d'expression de p14^{ARF} dans la carcinogenèse hépatique (Xu C.R. et al., 2009), et dans les carcinomes primaires de sein (Silva J. et al., 2006), cette protéine du groupe Pc-G réprime l'expression de p14^{ARF} dans les cancers colorectaux (Kim J.H. et al., 2004), lors de la transformation de cellules humaines de kératinocyte (Wang Q. et al., 2009) et dans les CBNPC (Vonlanthen S. et al., 2001) (**Tableau 5**).

De même, les répresseurs de la famille T-box, TBX-2 et TBX-3, sont capables de se fixer sur des sites de fixation « T-sites » différents des sites consensus jusqu'ici identifiés, sur le promoteur de p14^{ARF}. Une étude associe même la répression transcriptionnelle spécifique de p14^{ARF} par TBX-2 surexprimé et le développement du cancer du sein (Jacobs J.J. et al., 2000).

Dans les leucémies aigues, l'une des translocations chromosomiques les plus fréquemment observées t(8;21) crée une protéine de fusion « AML1-ETO » capable de réprimer spécifiquement la transcription de p14^{ARF} (Linggi B. et al., 2002).

C.4.5. L'inactivation de p14^{ARF}, un indicateur clinique

L'inactivation du locus INK4a/ARF ou de p14^{ARF} dans les tumeurs humaines peut être, dans certains cas, corrélée à un pronostic clinique. La perte d'expression de p14^{ARF} corrélerait très souvent à un mauvais pronostic dans les cancers du colon (Lee M. et al., 2006), du sein et dans les carcinomes de la vessie (Dominguez G. et al., 2003), dans les carcinomes épidermoïdes de la langue (Kwong R.A. et al., 2005), ou encore dans les carcinomes épidermoïdes tête/cou (Zhang Y. et al., 2011).

Si une étude indique que la survie de patients atteints d'ADC pulmonaires est plus longue lorsque p14^{ARF} est exprimée (Hsu H.S. et al., 2004), nos travaux n'ont pas établi de corrélation entre le statut de p14^{ARF} et le grade des tumeurs de CBNPC (Gazzeri S. et al., 1998). En revanche, nous avons montré que l'expression de p14^{ARF} et celle de phospho-Chk2 (thréonine 68), élément majeur de la réponse aux dommages de l'ADN, étaient directement liées (Eymin B. et al., 2006b). En accord avec les travaux de l'équipe montrant que p14^{ARF} est un acteur clé de l'activation de la voie ATM/Chk dans la réponse aux dommages de l'ADN, ce dernier résultat suggère que la perte de l'expression de p14^{ARF} dans les cancers du poumon pourrait permettre à la cellule de s'affranchir du point de contrôle géré par Chk2, favorisant ainsi l'instabilité génétique et la tumorigenèse.

Considérant l'importance de la perte de p14^{ARF} dans la plupart des mécanismes de tumorigenèse, une équipe a récemment testé *in vivo*, dans un modèle murin de xénogreffe de gliome humain, les effets d'un peptide fusion p14^{ARF}-TAT couplé à un vecteur cationique pour faciliter la distribution du complexe. L'introduction de ce peptide dans la tumeur permet d'en réduire le volume par action cytotoxique (Niu G. et al., 2011). D'autres études sont à envisager pour approfondir les possibilités thérapeutiques ayant pour objectifs de favoriser l'expression de p14^{ARF} dans les cancers humains.

Comme nous l'avons vu dans ce chapitre dédié à la protéine suppresseur de tumeur p14^{ARF}, cette protéine est devenue un acteur fondamental dans les tumeurs humaines, de par son rôle décisif dans la veille de l'homéostasie cellulaire. Si un grand nombre d'études ont ainsi éclairé les rôles de p14^{ARF}, dépendants ou non de la voie p53, l'identification de nouveaux partenaires de p14^{ARF} complexifie le réseau dans lequel agit cette protéine suppresseur de tumeur.

Objectifs du travail

Depuis plusieurs années, notre équipe s'attache à décrire les mécanismes mis en place au cours de la cancérogenèse pulmonaire. Dans ce cadre, le laboratoire a montré que p14^{ARF} est inactivée dans 65% des CBPC et dans 25% des CBNPC de type adénocarcinome (Gazzeri S. et al., 1998). Des travaux ultérieurs ont précisé le rôle de p14^{ARF} comme frein fondamental au développement du cancer du poumon grâce à la caractérisation des effets de p14^{ARF} indépendants de p53 à la fois *in vitro* et *in vivo* (Eymin B. et al., 2001 ; Eymin B. et al., 2003 ; Eymin B. et al., 2006a ; Eymin B. et al., 2006b).

A mon arrivée au laboratoire, une étude collaborative avec l'équipe du Professeur Pierre Hainaut (Mounawar M. et al., 2007) avait montré que l'expression de la protéine suppresseur de tumeur p14^{ARF} est très fortement inhibée dans 80% des adénocarcinomes pulmonaires humains avec un EGFR muté (L858R ou Del19). Ces travaux ont conduit à émettre les hypothèses suivantes:

- 1) La protéine p14^{ARF}, en tant que suppresseur de tumeur, constituerait un frein essentiel aux puissants signaux oncogéniques induits par les mutants de l'EGFR ;
- 2) Les mutants de l'EGFR auraient besoin d'inactiver p14^{ARF} pour s'affranchir de cette barrière et acquérir toutes les caractéristiques des cellules tumorales.

Mon projet s'est donc attaché à étudier les relations fonctionnelles entre p14^{ARF} et les mutants de l'EGFR, en particulier le mutant L858R, dans des lignées humaines d'adénocarcinome pulmonaire. Nous décrivons ainsi que p14^{ARF} s'oppose à la prolifération des cellules exprimant la mutation L858R en induisant leur apoptose. Ce mécanisme met en jeu une fonction pro-apoptotique de STAT3, jusqu'à présent très peu décrite dans la littérature. L'activation de cette voie pro-apoptotique par p14^{ARF} induit l'inhibition de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Les cellules exprimant la mutation L858R de l'EGFR contrecarrent les effets anti-prolifératifs de p14^{ARF} en diminuant son expression et, par conséquent, en bloquant l'activation de la voie pro-apoptotique p14^{ARF}/STAT3/Bcl-2 afin de maintenir leur avantage prolifératif et de survie.

De plus, nous montrons dans différents modèles cellulaires que STAT3 régule de façon positive l'expression de p14^{ARF} et nos données semblent identifier p14^{ARF} comme une nouvelle cible transcriptionnelle de STAT3. Les résultats mettent en évidence une boucle de

rétrocontrôle positif entre STAT3 et p14^{ARF} qui pourrait entretenir l'activation de la signalisation pro-apoptotique médiée par STAT3.

Résultats

A. Matériels et Méthodes

A.1. Culture cellulaire

A.1.1. Lignées cellulaires et conditions de culture

Les lignées NCI-H1975, NCI-H3255, NCI-H1299, NCI-HCC827 et NCI-H358 sont des lignées cellulaires humaines d'adénocarcinome pulmonaire. Les lignées NCI-HCC827, NCI-H1975 et NCI-H3255 ont été données par le Professeur Adi F. Gazdar (Hamon Center for Therapeutic Oncology Research, Texas USA). Les lignées NCI-H1975 et NCI-H3255 expriment la substitution L858R de l'EGFR (exon 21), la lignée NCI-HCC827 exprime le mutant Del19 de l'EGFR (délétion LREA, exon 19), tandis que les lignées NCI-H1299 et NCI-H358 expriment un EGFR sauvage. La lignée NCI-H358 présente également une mutation de K-Ras et la lignée NCI-H1975 exprime la mutation de résistance aux EGFR-TKI, T790M.

Toutes les cellules sont adhérentes et sont cultivées dans du RPMI-1640 contenant de la L-glutamine (PAA) et supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF)(PAA) préalablement décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes. Les cellules sont cultivées en atmosphère humide à 5% de CO₂ et à 37°C.

A.1.2. Transfection transitoire de vecteurs plasmidiques d'expression

Nous avons utilisé le vecteur plasmidique d'expression pcDNA3.1 comme contrôle de transfection et pour cloner les séquences codantes d'intérêt. Ce vecteur contient les séquences du promoteur fort du cytomégalo virus (CMV) et un gène codant pour la protéine néomycine de résistance aux antibiotiques, permettant une sélection des cellules transfectées par la généticine sulfate (G418)(PAA) (**Figure 21**). Les séquences codantes pour la protéine p14^{ARF} (pcDNA3.1-p14^{ARF}), le mutant L858R de l'EGFR (pcDNA3.1-EGFR-L858R) ou le mutant Del19 de l'EGFR (pcDNA3.1-EGFR-Del19) ont été clonées dans le vecteur pcDNA3.1 en aval du promoteur CMV.

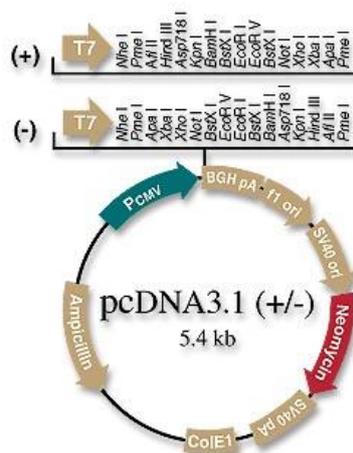


Figure 21: Représentation du vecteur plasmidique d’expression pcDNA3.1 (Invitrogen)
 +: site de clonage en orientation sens; -: site de clonage en orientation anti-sens0

Le vecteur d’expression de la protéine STAT3 constitutivement active est marqué par une étiquette Flag (STAT3-C Flag pRC/CMV) et provient de chez Addgene.

Les cellules sont transfectées à 50-70% de confluence, 24 heures après l’ensemencement, par l’agent de transfection X-tremGENE HP (Roche Applied Science), par le vecteur contrôle pcDNA3.1 ou les vecteurs exprimant p14^{ARF}, l’EGFR-L858R, l’EGFR-Del19 ou l’EGFR sauvage. Pour une pétri, mélanger le volume nécessaire de vecteur pour une quantité de 1µg ou 3µg avec 1 ml de milieu OptiMEM (sans SVF, ni antibiotique) et le X-tremGENE HP à raison de 3µl pour 1 µg d’ADN. Le mélange est incubé pendant 20 minutes à température ambiante, avant d’être réparti de façon homogène dans les pétris. Pour les expériences d’immunofluorescence, les transfections ont été réalisées sur 48h. Pour les expériences de western-blotting, la G418 est ajoutée au milieu de culture à une concentration finale 800 µg/ml (à partir d’une solution stock à 100 mg/ml dans de l’HEPES 0.1M) 24 heures après la transfection et les cellules transfectées sont ainsi sélectionnées pendant 6 jours.

Aux termes de cette sélection, les cellules sont lavées au PBS 1X (Dulbecco’s Phosphate Buffer Saline, sans calcium, ni magnésium, PAA) avant d’être trypsinées (trypsine 1X obtenue à partir d’une solution stock de trypsine-EDTA 10X, 0.5%/0.2% dans du PBS, PAA). Les cellules viables sont dénombrées après coloration au bleu Trypan (Invitrogen) avec le conteur automatique de cellules (Countess, Invitrogen). Le culot cellulaire est ensuite divisé pour réaliser une extraction des protéines (voir *Matériels & Méthodes, paragraphe A.3*), une extraction d’ARN (voir *Matériels & Méthodes, paragraphe A.2*) et /ou un marquage de la

caspase 3 active pour l'étude de l'apoptose en FACS (voir *Matériels & Méthodes*, paragraphe A.4).

A.1.3. Transfection transitoire d'ARN interférents

Nous avons défini les séquences qui ciblent des séquences codantes des gènes humains de p14^{ARF}, de PTP-RT, de l'EGFR et de ses mutants l'EGFR-L858R et l'EGFR-Del19 (**Tableau 6**). Pour neutraliser spécifiquement l'expression de p14^{ARF}, nous avons déterminé une séquence de siARN ciblant l'exon 1 β . Les siARN sont synthétisés par Eurogentec et repris dans un volume donné d'eau RNase-free pour obtenir une concentration finale de 100 μ M. Les siARN de STAT3 proviennent de chez Invitrogen (Validated Stealth RNAi™ : siRNA 12935-027-VHS40497).

Le « mismatch » a été utilisé comme contrôle pour chaque expérience de neutralisation.

| Nom de la séquence | Séquence sens |
|----------------------------|---------------------------------|
| <i>Mismatch (Contrôle)</i> | 5'-UCGGCUCUUACGCAUUCAA-3' |
| <i>p14^{ARF}</i> | 5'-GAACAUGGUGCGCAGGUUCTT-3' |
| <i>PTP-RT</i> | 5'-GGAGGAGCCACUUCAGAAGUCACGG-3' |
| <i>EGFR</i> | 5'-CUCUGGAGGAAAAGAAAAGAAAGU-3' |
| <i>EGFR-L858R</i> | 5'-CACAGAUUUUGGGCGGGCCAA-3' |
| <i>EGFR-Del19</i> | 5'-GCUAUCAAAACAUCUCCGAAA-3' |
| <i>TIP60</i> | 5'-AUAGUACAGUGUCUUAUGGUCAAGG-3' |

Tableau 6: Séquences des siARN utilisées au cours des études.

Les cellules sont transfectées à 50-70% de confluence, 24 heures après l'ensemencement, par l'Oligofectamine™ (Invitrogen). Pour une pétri, 30 μ l de siARN à 20 μ M est mélangé à 530 μ l de RPMI (sans SVF) dans un tube de polypropylène. Dans un autre tube, 12 μ l d'Oligofectamine™ sont mélangés à 33 μ l de RPMI (sans SVF). Le mélange (45 μ l) est incubé pendant 10 minutes à température ambiante. Suite à cette incubation, les siARN sont mis en présence de l'Oligofectamine™ pendant 20 minutes à température ambiante. Pendant cette incubation, les cellules sont rincées deux fois au PBS 1X pour éliminer toute trace de SFV, puis 2.4 ml de

RPMI (sans SVF) sont ajoutés à la pétri. A la fin des 20 minutes d'incubation permettant la formation du complexe des siARN avec l'Oligofectamine™, le mélange (600µl) est réparti uniformément dans la pétri, puis incubé 4h à 37°C. Au terme de cette incubation, 1.5 ml de milieu contenant 30% de SFV sont ajoutés à la pétri pendant 72h à 37°C. Aux termes de cette incubation, les cellules sont trypsinisées, dénombrées, et les culots cellulaires sont divisés pour des extractions protéiques, d'ARN et/ou un marquage de la caspase 3 active.

A.1.4. Traitement à la Cucurbitacine I (JSI-124)

La cucurbitacine I (JSI-124) est un inhibiteur très efficace de la phosphorylation de la tyrosine 705 de STAT3 (10µM-4h) (Blaskovich M.A. et al., 2003). La cucurbitacine I est également décrite pour inhiber la phosphorylation de Jak-2, mais ne bloque pas son activité tyrosine kinase.

La cucurbitacine I stock est sous forme de poudre conservée à -20°C (Santa Cruz Biotechnology). Après reconstitution dans du DMSO à une concentration finale à 2 mM, les aliquots sont stockés à -20°C pendant 3 mois maximum.

Les cellules sont traitées soit par le DMSO (contrôle), soit par la cucurbitacine I à 2µM pendant 24h. Aux termes de ce traitement, les cellules sont trypsinisées et les culots cellulaires sont divisés pour des extractions protéiques et d'ARN.

A.2. Analyse de l'expression des ARNm par RT-qPCR

A.2.1. Extraction des ARN totaux

Les ARN sont extraits à partir des lignées humaines d'adénocarcinome pulmonaire décrites précédemment, à l'aide des colonnes RNeasy Mini Kit (Qiagen).

La quantification, la pureté et l'intégrité des ARN sont déterminées à l'aide du spectrophotomètre et du logiciel Nanodrop ND-1000 (Thermo Fischer Scientific).

A.2.2. RT-PCR

La synthèse des ADNc par transcription inverse est faite à partir de 1 µg d'ARN à l'aide du kit Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix pour qPCR (Invitrogen). Le programme suivant est utilisé : 25°C pendant 10 minutes ; 50°C pendant 30 secondes ; 85°C pendant 5 minutes. Les tubes sont mis sur la glace et 1 µl de RNase H (2U) est ajouté afin d'éliminer les ARN restants. Le programme se termine par une étape à 37°C pendant 20 minutes (Appareil Mastercycler Personal, Eppendorf).

A.2.3. PCR quantitative (qPCR)

Les échantillons d'ADNc sont préparés avec le Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Nous avons déterminé à l'aide du logiciel « Primer 3 (v.0.4.0) » (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) les séquences nucléotidiques sens et anti-sens utilisées pour amplifier spécifiquement les ARNm de nos gènes d'intérêt (**Tableau 7**). Pour amplifier spécifiquement l'ARNm de p14^{ARF}, nous avons choisi des séquences nucléotidiques ciblant l'exon 1β.

| Nom de la séquence | Séquence sens/anti-sens |
|-------------------------------|--|
| <i>GAPDH</i> (gène référence) | SENS 5'-CGAGATCCCTCCAAAATCAA-3' AS 5'-ATCCACAGTCTTCTGGGTGG-3' |
| <i>p14^{ARF}</i> | SENS 5'-GCGCAGGTTCTTGGTGAC-3' AS 5'-GGCTCCTCAGTAGCATCAGC-3' |
| <i>PTP-RT</i> | SENS 5'-GGTTGCTAATCTGGGCAAGT-3' AS 5'-CTGAGCTCTGTCCACCACAA-3' |
| <i>HDAC7</i> | SENS 5'-GCACCCAGCAAACCTTCTAC-3' AS 5'-AGCCCCTACCTCATCCACAG-3' |
| <i>TIP60</i> | SENS 5'-AGGGCACCATCTCCTTCTTT-3' AS 5'-GTTAGGATGCAGGCCACATT-3' |

Tableau 7: Séquences nucléotidiques utilisées au cours des qPCR.

Après vérification avec nos différentes séquences nucléotidiques, l'étape d'élongation à 72°C pendant 30 secondes n'optimise pas l'efficacité de la PCR, et a donc été supprimée du programme (Guide qPCR, Eurogentec, www.eurogentec.com). Le programme d'amplification établi sur l'appareil Stratagene MX3005P se fait donc en 2 étapes:

-Dénaturation de l'ADNc double brin : 10 minutes à 95°C,

-Amplification de l'ADNc sur 40 cycles : 15 secondes à 95°C (dénaturation finale) puis 1 minute à 60°C (hybridation des sondes).

A.3. Analyse de l'expression protéique par western-blotting

A.3.1. Extraction protéique totale

Aux termes des différentes incubations, les cellules sont rincées au PBS 1X (PAA) et détachées de leur support de culture avec de la trypsine 1X (PAA). Les protéines sont extraites dans du tampon RIPA (Tris-HCl 50 mM [pH 7,4], NaCl 150 mM, sodium déoxycholate 0.5% [m/v], octylphenoxyethoxyethanol NP-40 1% [v/v], SDS 0.1% [m/v]) additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete mini, Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne) et d'inhibiteurs de phosphatases (Phosphatase Inhibitor Cocktail set II, Calbiochem, Merck, Darmstadt, Allemagne). Le lysat est incubé 30 minutes dans de la glace en agitant sur vortex régulièrement pour favoriser l'extraction, puis centrifugé 15 minutes à 13 200 rpm à 4°C. Le surnageant est conservé à -20°C ou directement dosé, après séparation des débris (culot).

A.3.2. Fractionnement cellulaire

Le culot cellulaire est repris délicatement dans 10 volumes de tampon hypotonique froid (Tris-HCl 10 mM [pH7.5], KCl 10 mM, MgCl₂ 1.5mM, DTT 0.5mM) et incubé 15 minutes dans la glace. Le mélange est centrifugé à 2000 rpm 5 minutes à 4°C, puis le surnageant est éliminé. Le culot est resuspendu dans 5 volumes de tampon hypotonique froid additionné de NP40 1% et incubé 10 minutes dans la glace. Après une centrifugation à 3000 rpm pendant 15 minutes à 4°C, le surnageant, correspondant à la fraction cytoplasmique, est conservé. Le culot est rincé 2 fois au PBS 1X avant d'être incubé avec du tampon RIPA pendant 30 minutes dans

de la glace. Après une centrifugation de 15 minutes à 13 200 rpm à 4°C, le surnageant est récupéré (fraction nucléaire).

A.3.3. Détermination de la concentration protéique

La concentration des protéines est déterminée à l'aide du kit de dosage protéique Biorad (Biorad DC protein Assay Reagent package, Biorad, Hercules, CA) selon les instructions du fournisseur. Il s'agit d'un test colorimétrique basé sur la réaction des résidus tyrosine, tryptophane, cystéine, cystine et histidine des protéines avec la solution alcaline de tartrate de cuivre et le réactif de Folin. L'intensité de coloration est ensuite déterminée par lecture de la densité optique à 655 nm à l'aide d'un spectrophotomètre à microplaques (Beckman Coulter AD 340).

A.3.4. Western-blotting

Un volume d'échantillon d'une quantité de 40 µg est mélangé à 2.5 µl de tampon NuPAGE® LSD 4X (Invitrogen), à 1 µl de NuPAGE® Reducing Agent 10X (Invitrogen) puis complété à un volume final de 20 µl par de l'eau milliQ. Les protéines sont dénaturées 10 minutes à 70 °C, puis placées dans la glace.

Le marqueur de poids moléculaire (11-250KDa, PageRuler™ prestained Protein Ladder Plus, Fermentas) et les protéines sont déposés sur gels pré-coulés NuPAGE® Bis-Tris en gradient de concentrations 4% -12% (Invitrogen) dans les cuves XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen). La chambre extérieure de la cuve contient du tampon MES 1X (préparé à partir de la dilution dans de l'eau milliQ de la solution stock NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20X), Invitrogen,) et la chambre intérieure contient 200 ml de MES 1X additionné de 500 µl d'antioxydant (NuPAGE® Antioxydant, Invitrogen). La migration s'effectue dans de la glace pour prévenir l'échauffement de la cuve, pendant 35 à 60 minutes à 125 mA/gel en début de migration et 80 mA/gel en fin de migration.

Après avoir pris soin de découper le gel pour séparer les protéines de haut poids moléculaires et de bas poids moléculaires, les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinylidene Hybond-P (Amersham) préalablement hydratée dans de l'éthanol pur. Le

transfert s'effectue dans un tampon Tris 25 mM/Glycine 192 mM/Ethanol 96.5%/SDS 0.03%, à 90 volts et s'échelonne de 40 minutes à 1h30 selon le poids moléculaire des protéines.

Les membranes sont ensuite incubées 1 heure dans une solution de blocage (lait écrémé lyophilisé 5%/TBS 1X/Tween-20 0.1%, sauf recommandations particulières du fournisseur d'anticorps). Les membranes sont rincées 3 fois pendant 5 minutes par du TBS 1X/Tween-20 0.1% avant d'être incubées avec des anticorps spécifiques dilués dans une solution de BSA 5%/Tween-20 0.1% sur la nuit à 4°C sous agitation lente (**Tableau 8**).

| Anticorps (Clone) | Dilution | Fabricants (Distributeurs) |
|--|-----------------|--|
| <i>p14^{ARF} (Ab-1)</i> | 1/1000e | Calbiochem (VWR) |
| <i>Caspase 3 (Asp175)</i> | 1/1000e | Cell signaling Technology (Ozyme) |
| <i>Bcl-2 (C-2)</i> | 1/200e | Santa Cruz Biotechnology (Clinisciences) |
| <i>Bax (N-20)</i> | 1/1000e | Santa Cruz Biotechnology (Clinisciences) |
| <i>Bcl-xl (H-62)</i> | 1/1000e | Santa Cruz Biotechnology (Clinisciences) |
| <i>ERK1/2</i> | 1/1000e | Cell signaling Technology (Ozyme) |
| <i>pEKR-Y202/204 (E-10)</i> | 1/1000e | Cell signaling Technology (Ozyme) |
| <i>AKT</i> | 1/1000e | Cell signaling Technology (Ozyme) |
| <i>pAKT-S473</i> | 1/2000e | Cell signaling Technology (Ozyme) |
| <i>EGFR</i> | 1/1000e | Cell signaling Technology (Ozyme) |
| <i>STAT3 (79D7)</i> | 1/1000e | Cell signaling Technology (Ozyme) |
| <i>pSTAT3-Y705 (D3A7)</i> | 1/2000e | Cell signaling Technology (Ozyme) |
| <i>STAT5 (3H7)</i> | 1/1000e | Cell signaling Technology (Ozyme) |
| <i>pSTAT5-Y694</i> | 1/1000e | Cell signaling Technology (Ozyme) |
| <i>PIAS3 (E-3)</i> | 1/1000e | Santa Cruz Biotechnology (Clinisciences) |
| <i>Tubuline-α (B5-1-2)</i> | 1/1000e | Santa Cruz Biotechnology (Clinisciences) |
| <i>Actine</i> | 1/1000e | Sigma |

Tableau 8: Anticorps utilisés pour les expériences de western-blotting.

Le lendemain, les membranes sont rincées 3 fois pendant 5 minutes avec du TBS 1X/Tween-20 0.1%, puis incubées avec l'anticorps secondaire approprié, anti-lapin ou souris, couplé à la HRP (Horse Raddish Peroxidase) (1/1000^e) (Cell Signaling) pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation lente. La révélation par chimioluminescence est effectuée à l'aide du kit Pierce[®] ECL (Thermo Fischer Scientific) qui fourni le substrat luminol

et le tampon peroxide pour la réaction enzymatique catalysée par la HRP. Le luminol oxydé forme un produit excité qui produit de la lumière (**Figure 22**). L'intensité lumineuse est détectée grâce à l'exposition d'un film (Blue Devil™, Genesee Scientific) sur la membrane, puis à des bains successifs dans des solutions 1X de révélateur et de fixateur (solutions stock à 5X, Kodak GBX).

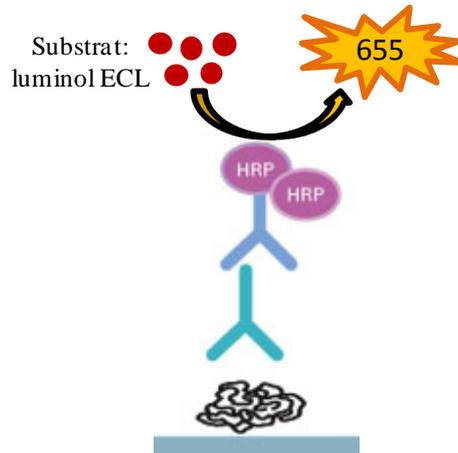


Figure 22 : Principe de détection par chimioluminescence dans la technique de western-blotting.

A.4. Etude de l'apoptose

A.4.1. Marquage simple de la caspase 3 active

L'apoptose induite après la neutralisation de PTP-RT ou de l'EGFR est quantifiée au FACS (cymomètre en flux FACScan, BD Biosciences) par le marquage de la caspase 3 active par un anticorps spécifique couplé à la phycoérythrine (PE) fourni dans le kit « PE-conjugated monoclonal active caspase3 antibody apoptosis » (BD Biosciences).

A.4.2. Co-marquage p14^{ARF}/caspase 3 active

L'étude de l'apoptose des cellules transfectées par p14^{ARF} se fait par co-marquage de p14^{ARF} et de la caspase 3 active pour déterminer l'apoptose des cellules transfectées et s'affranchir du marquage « non spécifique » de la caspase 3 active des autres cellules.

Les cellules sont fixées par du paraformaldéhyde (PFA) 0.5% pendant 5 minutes à 4°C. Le culot est lavé 2 fois par du PBS 1X, et les cellules sont perméabilisées avec une solution de Triton X-100 0.1% /PBS 1X pendant 5 minutes à température ambiante. L'étape de saturation nécessite une incubation des cellules dans une solution de BSA 5%/PBS 1X pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées pendant 1 heure à température ambiante avec un anticorps anti-p14^{ARF} (Ab2, Calbiochem) dans une solution de BSA 1%/PBS 1X. Après 2 lavages au PBS 1X, les cellules sont à nouveau incubées 1 heure à température ambiante avec un anticorps anti-souris couplé à un Alexa 488 (Invitrogen) et avec l'anticorps anti-caspase 3 active couplé à la PE (BD Biosciences). Après 2 lavages au PBS 1X, les cellules sont resuspendues dans 500µl de PBS 1X, et l'apoptose des cellules co-marquées p14^{ARF}/C3 active est quantifiée au FACS (cymomètre en flux FACScan, BD Biosciences).

A.5. Immunofluorescence

A.5.1. Immunofluorescence indirecte détectée par microscopie à épifluorescence

Les cellules H1975 sontensemencées sur des Lab-Tecks 2 puits en plastique et à cuves amovibles (Nalge Nunc International, Dutscher) à raison de 80 000 cellules par puits. Après 48 heures de transfection, le milieu est éliminé et le tapis cellulaire est lavé deux fois au TBS 1X (Tris Buffer Saline 1X, Tris 3M [pH 7.5], NaCl 5M). Les cellules sont fixées *in situ* au PFA 2% pendant 10 minutes à 4°C, puis perméabilisées au TBS 1X/Triton X-100 0.1% pendant 10 minutes à température ambiante. Une saturation au BSA 5%/TBS1X est réalisée pendant 45 minutes à température ambiante, sous agitation douce. Les anticorps primaires anti-p14^{ARF} (1/600^e) (Ab2 anti-souris, Calbiochem) et pSTAT3-Y705 (1/100^e) (D3A7 anti-lapin, Cell Signaling) ou et pEGFR-Y1068 (1/500^e) ([EP774Y] anti-lapin, Abcam) toute la nuit à 4°C. Après rinçage au TBS 1X, les cellules sont incubées pendant 30 minutes en chambre humide, à l'abri de la lumière et à température ambiante en présence des anticorps secondaires Alexa anti-souris 488 (Molecular Probes, Interchim) et anti-lapin 568 (Molecular Probes, Interchim). Le noyau est marqué avec de l'Hoechst (1/50^e) pendant 15 minutes à température ambiante. Le montage entre lame et lamelle est réalisé à l'aide du « ProLong Gold antifade reagent » (Invitrogen), l'observation se fait par microscopie à épifluorescence (x 1000 - Olympus BX41) et l'acquisition par le logiciel AnalySIS.

A.5.2. Immunofluorescence indirecte détectée par microscopie confocale

Les cellules H1975 sont ensemencées sur des Lab-Tecks 2 puits en verre et à cuves amovibles (Nalge Nunc International, Dutscher) à raison de 80 000 cellules par puits. Après 48 heures de transfection, le milieu est éliminé et le tapis cellulaire est lavé deux fois au TBS 1X (Tris Buffer Saline 1X, Tris 3M [pH 7.5], NaCl 5M). Les cellules sont fixées *in situ* au PFA 2% pendant 10 minutes à 4°C, puis perméabilisées au TBS 1X/Triton X-100 0.1% pendant 10 minutes à température ambiante. Une saturation au BSA 5%/TBS1X est réalisée pendant 45 minutes à température ambiante, sous agitation douce. Les anticorps primaires EGFR (C-20, Sant Cruz Biotcehnlogy) et pEGFR-Y1068 (1/500^e) ([EP774Y], Abcam) toute la nuit à 4°C. Après rinçage au TBS 1X, les cellules sont incubées pendant 30 minutes en chambre humide, à l'abri de la lumière et à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire Alexa anti-lapin 568 (1/2000^e)(Molecular Probes, Interchim). Le noyau est marqué avec de l'Hoechst (1/50^e) pendant 15 minutes à température ambiante. Le montage entre lame et lamelle est réalisé à l'aide du ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen). L'observation se fait par microscopie confocale (LSM510 NLO META FLIM, Zeiss Axiovert 200M) et l'acquisition avec le logiciel d'acquisition et d'analyse LSM510 - FCS v. 4.2, et les données ont ensuite été traitées avec le logiciel « ImageJ ».

A.6. Test d'activité luciférase

Pour analyser l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription STAT3 sur le promoteur de p14^{ARF}, nous avons utilisé le vecteur luciférase contrôle pGL3-Luc et le vecteur pGL3-p14^{ARF}-Luc avec le gène de la luciférase cloné en aval du promoteur de p14^{ARF} donnés par le Professeur Manuel Serrano (Tumor Suppression Group, Spanish National Cancer Research Center, Madrid, Espagne) (Matheu A. et al., 2005). Afin de vérifier la spécificité d'activation transcriptionnelle de p14^{ARF} par STAT3, nous avons utilisé le vecteur luciférase contrôle pGL2-Luc et le vecteur pGL2-p16^{INK4a}-Luc avec le gène de la luciférase cloné en aval du promoteur de p16^{INK4a} également donnés par le Professeur Manuel Serrano.

Les cellules H1299 sont ensemencées en plaque 6 puits dans du RPMI-1640. Le lendemain, les cellules sont co-transfectées avec l'agent de transfection X-tremGENE HP (Roche Applied Science) en présence soit par 1µg de vecteur contrôle pGL3-Luc, soit par 1 µg de vecteur pGL3-p14^{ARF}-Luc, en l'absence de vecteur d'expression codant pour STAT3-C (STAT3-C Flag

pRC/CMV) ou par des quantités croissantes (0-0.05-0.1-0.2-0.4 µg) de ce vecteur. Les cellules HCC827 et H1975 sont ensemencées en plaque 6 puits dans du RPMI-1640. Le lendemain, les cellules sont co-transfectées avec l'agent de transfection X-tremGENE HP (Roche Applied Science) sont co-transfectées soit par 1 µg de vecteur contrôle pGL3 soit par 1 µg de vecteur sous pGL3-p14^{ARF}-Luc, en l'absence de vecteur STAT3-C Flag pRC/CMV ou avec 50 ng de ce vecteur. Afin de vérifier la spécificité d'action de STAT3 sur la transcription de p14^{ARF}, les cellules H1299 sont également co-transfectées d'une part avec 1 µg de vecteur contrôle pGL2-Luc ou 1 µg de vecteur sous pGL2-p16^{INK4a}-Luc, et d'autre part, avec 1 µg de vecteur contrôle pGL3-Luc ou 1 µg de vecteur sous pGL3-p14^{ARF}-Luc (contrôle positif), en l'absence de vecteur STAT3-C Flag pRC/CMV ou avec 50 ng de ce vecteur.

Après 24 heures de transfection, les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS 1X avant d'être lysées dans 300 µl de réactif de lyse 1X (préparé à partir d'une solution stock 5X, dans de l'eau milliQ) (Luciferase Assay System, Promega) pendant 15 minutes à température ambiante. Les cellules sont récoltées dans un tube Eppendorf de 1.5 ml et centrifugées à 10 000 rpm pendant 1 minute. Un volume de 20 µl de surnageant est mélangé avec 100 µl de substrat luciférase (dont luciférine, ATP-Mg²⁺ et coenzyme A) (Luciferase Assay System, Promega). La protéine luciférase produite suite à l'activation transcriptionnelle catalyse l'oxydation de la luciférine qui se traduit par l'émission d'une énergie lumineuse quantifiée au luminomètre (Lumat LB 9507, Berthold Technologies) (**Figure 23**).

L'activité luciférase des vecteurs contrôles pGL3-Luc, pGL2-Luc et des vecteurs pGL3-p14^{ARF}-Luc et pGL2-p16^{INK4a}-Luc sans vecteur STAT3-C Flag pRC/CMV est établie à une valeur relative de 1 et les activités luciférases relatives des autres conditions sont déterminées par rapport à ce contrôle.

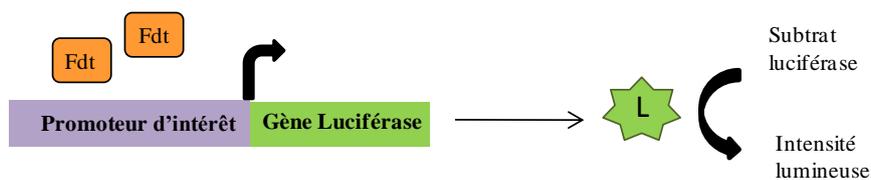


Figure 23: Principe simplifié de détection de l'activité transcriptionnelle par test luciférase.

FdT: Facteur de transcription avec des séquences de fixation au promoteur; Promoteur d'intérêt: promoteur possédant ou non des séquences de fixation pour le facteur de transcription; L: protéine luciférase exprimée après activation par le facteur de transcription.

A.7. Test statistique

Pour tout nombre « n » d'expériences indépendantes, supérieur ou égal à 3, est appliqué le test statistique non paramétrique de Mann-Whitney (logiciel STAT View publique).

B. P14^{ARF} inhibe la croissance des cellules d'adénocarcinome pulmonaire exprimant la mutation L858R de l'EGFR en activant une voie pro-apoptotique dépendante de STAT3

(Ozenne P., Daydé D., Brambilla E., Eymin B. et Gazzeri S., Oncogene, en révision)

B.1. Présentation de l'étude

Nous avons émis l'hypothèse que p14^{ARF} pourrait constituer un frein important dans la croissance des tumeurs exprimant un EGFR-L858R.

Nous avons donc recherché si p14^{ARF} pouvait contrôler le potentiel oncogénique de cellules exprimant la mutation L858R de l'EGFR. Le travail a été réalisé sur deux lignées cellulaires humaines d'adénocarcinome pulmonaire H1975 et H3255 qui expriment de façon constitutive la mutation L858R de l'EGFR. Par ailleurs, ces deux lignées présentent une amplification du nombre de copies du gène muté L858R de l'*egfr* (18.2 copies pour H3255 et 2.8 copies pour H1975, données transmises par le Professeur Adi F. Gazdar). La lignée H1975 exprime également une mutation de résistance aux EGFR-TKI, la substitution T790M. Enfin, H1975 et H3255 expriment de bas niveaux de la protéine p14^{ARF}.

B.2. Résultats

B.2.1. La protéine p14^{ARF} inhibe la croissance des cellules exprimant la mutation L858R de l'EGFR en induisant leur apoptose

Nous avons dans un premier temps étudié les conséquences d'une surexpression de p14^{ARF} dans les cellules H1975 et H3255 en les transfectant par vecteur d'expression codant pour la protéine p14^{ARF}. Le rendement de transfection étant faible dans ces lignées, nous avons traité les cellules par la généticine (G418) pendant 6 jours. Le vecteur codant pour la protéine p14^{ARF}, exprime également une protéine d'antibio-résistance à la G418, ce qui permet de sélectionner les cellules ayant incorporé le vecteur plasmidique et d'observer plus facilement les conséquences de la surexpression de p14^{ARF}.

Nous avons ainsi montré que la surexpression de p14^{ARF} inhibe la croissance de ces cellules et que ce mécanisme ne fait pas intervenir un arrêt du cycle cellulaire, mais une induction de l'apoptose. De plus, bien que les H1975 et H3255 expriment très faiblement p14^{ARF}, la neutralisation de l'expression de p14^{ARF} par ARN interférence stimule leur prolifération.

Ces données démontrent la capacité de p14^{ARF} à inhiber la croissance des cellules mutées L858R en induisant leur apoptose.

B.2.2. L'apoptose en réponse à p14^{ARF} nécessite l'accumulation de pSTAT3-Y705

L'EGFR active trois grandes voies de signalisation : PI3K/AKT, Jak/STAT et MAPK (Jorissen R.N. et al., 2003). Nous avons voulu savoir si p14^{ARF} pouvait moduler certaines voies de signalisation activées par l'EGFR-L858R pour induire l'apoptose.

Nous avons constaté que la surexpression de p14^{ARF} induit l'accumulation nucléaire du facteur de transcription STAT3 sous sa forme active, c'est-à-dire, phosphorylé sur le résidu tyrosine en position 705 (pSTAT3-Y705). Par immunofluorescence, nous avons confirmé l'accumulation de pSTAT3-Y705 en réponse à p14^{ARF}, et nous avons également observé une co-localisation nucléaire des deux protéines. En revanche, nous n'avons pas observé en western-blotting de modulation de l'expression ou de la phosphorylation de STAT5, AKT et de ERK en réponse à p14^{ARF}. Nous avons confirmé ces résultats en montrant une forte diminution de pSTAT3-Y705 après neutralisation de p14^{ARF} par siARN.

Afin d'analyser si l'accumulation de pSTAT3-Y705 était impliquée dans l'induction de l'apoptose par p14^{ARF}, nous avons transfecté les cellules par un vecteur contrôle ou un vecteur exprimant la protéine p14^{ARF}. Nous avons ensuite traité ou non les cellules à la cucurbitacine I, un inhibiteur pharmacologique de la phosphorylation de STAT3 sur son résidu tyrosine 705. Nous avons quantifié l'apoptose induite par p14^{ARF} au FACS après marquage de la caspase 3 active. Le traitement à la cucurbitacine I prévient l'apoptose induite par p14^{ARF}. Nous avons également constaté par western-blotting que l'expression de p14^{ARF} est diminuée dans les cellules traitées, suggérant une boucle de rétrocontrôle positif entre STAT3 et p14^{ARF}. A noter également une légère baisse de l'expression de STAT3 après traitement à la cucurbitacine I, en accord avec la boucle d'autorégulation de STAT3 déjà décrite (Ichiba M. et al., 1998 ; Narimatsu M. et al., 2001).

Ces résultats montrent que l'activation de STAT3 est un élément essentiel dans l'induction de l'apoptose par p14^{ARF} dans les cellules mutées L858R. Cependant, STAT3 a principalement été décrit pour avoir une action oncogénique (Bromberg J.F. et al., 1999), notamment dans les ADC pulmonaires exprimant une mutation de l'EGFR (Alvarez J.V. et al., 2006). Nous avons donc étudié les conséquences de l'accumulation de pSTAT3-Y705 dans nos modèles cellulaires. Pour cela, nous avons neutralisé l'expression de PTP-RT, une phosphatase spécifique de la déphosphorylation de STAT3 sur sa tyrosine Y705 (Zhang X. et al., 2007). La neutralisation de PTP-RT par des siARN spécifiques permet l'accumulation de la forme phosphorylée de STAT3. Nous avons également constaté une induction de l'apoptose consécutivement à l'accumulation de pSTAT3-Y705.

Ces données supportent l'hypothèse selon laquelle une voie STAT3 pro-apoptotique est activée par p14^{ARF} dans des cellules exprimant la mutation L858R de l'EGFR.

B.2.3. La voie pro-apoptotique STAT3/p14^{ARF} diminue l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2

La phosphorylation de STAT3 est un événement clé dans l'activation de la signalisation dépendante de STAT3 (Levy D.E. & Darnell J.E. Jr., 2002). Différents gènes cibles de STAT3 ont été identifiés et incluent des régulateurs de l'apoptose tels que Bcl-2, Bcl-xL et Bax (Haura E.B. et al., 2005).

Dans notre modèle cellulaire, inhiber l'expression de STAT3 par des siARN spécifiques ou sa phosphorylation par traitement à la cucurbitacine I, entraîne une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. A l'inverse, favoriser la phosphorylation de STAT3 par neutralisation de PTP-RT diminue l'expression de Bcl-2. Pour l'ensemble de ces données, nous avons également constaté une dérégulation des transcrits de Bcl-2.

En accord avec ces résultats, la transfection de p14^{ARF} induit une diminution de l'expression de Bcl-2, alors que la neutralisation de p14^{ARF} favorise la stabilisation de Bcl-2. En revanche, nous n'avons pas observé de modulation d'expression de Bcl-xL et Bax. De plus, la surexpression de p14^{ARF} suivi d'un traitement par la cucurbitacine I prévient l'inhibition de l'expression de Bcl-2. Ce résultat montre que l'inhibition de l'expression de Bcl-2 en réponse à p14^{ARF} dépend de l'accumulation de pSTAT3-Y705.

L'ensemble de ces résultats identifie la protéine anti-apoptotique Bcl-2 comme une cible majeure de la voie pro-apoptotique STAT3/p14^{ARF} dans les cellules mutées L858R, et montrent que la diminution de l'expression de Bcl-2 par STAT3 est nécessaire à l'induction de l'apoptose induite par p14^{ARF}.

B.2.4. Le mutant EGFR-L858R diminue l'expression de p14^{ARF} et inhibe la signalisation pro-apoptotique p14^{ARF}/STAT3/Bcl2

Les tumeurs exprimant un EGFR muté L858R (Mounawar M. et al., 2007), aussi bien que les lignées H1975 et H3255, présentent de très bas niveaux d'expression de la protéine p14^{ARF}. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'EGFR-L858R pourrait inhiber l'expression de p14^{ARF} pour s'opposer à sa fonction pro-apoptotique.

Pour tester cette hypothèse, nous avons transfecté le vecteur codant pour l'EGFR-L858R dans la lignée humaine d'adénocarcinome pulmonaire H1299 exprimant un EGFR sauvage. L'expression endogène de p14^{ARF} est analysée à la fois par immunofluorescence après 48 heures de transfection, et par western-blotting après sélection des cellules transfectées à la G418. Dans les deux cas, nous observons une diminution significative de l'expression de p14^{ARF} lorsque le mutant L858R est exprimé. Cette diminution s'accompagne également d'une baisse de pSTAT3-Y705 et d'une augmentation de l'expression de Bcl-2. Ces résultats corroborent l'hypothèse selon laquelle le mutant L858R de l'EGFR réprime la voie STAT3 pro-apoptotique. Inversement, la neutralisation de l'expression de l'EGFR-L858R dans les lignées H1975 et H3255, permet l'accumulation de p14^{ARF} et de pSTAT3-Y705, la diminution de Bcl-2 et l'induction de l'apoptose. Enfin, bloquer l'expression de p14^{ARF} par siARN prévient dans ces conditions l'accumulation de pSTAT3-Y705, la diminution de l'expression de Bcl-2 et l'apoptose.

L'ensemble de ces expériences démontrent que les cellules mutées L858R contrecarrent la voie p14^{ARF}/STAT3/Bcl-2 pro-apoptotique en inhibant l'expression de la protéine p14^{ARF}.

B.3. Article

P14^{ARF} inhibits the growth of lung adenocarcinoma cells harboring an EGFR L858R mutation by activating a STAT3-dependent pro-apoptotic signalling pathway

Peggy Ozenne, Delphine Daydé, Elisabeth Brambilla, Béatrice Eymin and Sylvie Gazzeri

Oncogene, en revision

P14^{ARF} inhibits the growth of lung adenocarcinoma cells harboring an EGFR L858R mutation by activating a STAT3-dependent pro-apoptotic signalling pathway

Peggy Ozenne MSc ^{1,2}, Delphine Dayde MSc ^{1,2}, Elisabeth Brambilla MD PhD ^{1,2}, Beatrice Eymin PhD ^{1,2} and Sylvie Gazzeri PhD ^{1,2}

¹ Equipe Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon, Centre de Recherche INSERM U823, Institut Albert Bonniot, 38042 Grenoble Cedex 09, France, ² Université Joseph Fourier, 38041 Grenoble Cedex 09, France

Corresponding author:

Sylvie Gazzeri

Equipe Bases Moléculaires de la Progression des Cancers du Poumon, Centre de Recherche INSERM U823, Institut Albert Bonniot BP170, 38042 Grenoble Cedex 09 France

Phone: 33 4 76 54 94 76, Fax: 33 4 76 54 94 13, Sylvie.Gazzeri@ujf-grenoble.fr

Running Title: p14^{ARF} controls EGFR L858R signalling

Supports: This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U823, Association pour la Recherche sur le Cancer and la Fondation de France. P.O is supported by AGIR à Dom. D.D is supported by the Fond de dotation pour la recherche en santé respiratoire 2010.

The authors have nothing to disclose.

Abstract

Epidermal growth factor receptor (EGFR) stimulates proliferative and survival signals. Activating mutations of EGFR are involved in the aetiology and maintenance of the malignant phenotype of lung tumours. We previously described the frequent association of these mutations with the decreased expression of the p14^{ARF} tumour suppressor, another common feature of lung cancer. Based on these data, we postulated that p14^{ARF} could protect cells against untimely or excessive mitotic signals induced by mutant EGFR. In this study, we demonstrate that p14^{ARF} promotes apoptosis in lung tumour cells harboring the EGFR L858R mutation through the accumulation of phosphorylated STAT3 on Tyr 705 residue, which leads to Bcl-2 downregulation. Inducing STAT3 phosphorylation by silencing PTP-RT, the phosphatase that specifically targets Tyr 705 residue, promotes EGFR L858R mutant cell death and confirms the existence of a STAT3-dependent pro-apoptotic pathway in these cells. Furthermore, we show that transient expression of the EGFR L858R mutant represses p14^{ARF} expression and inhibits STAT3/Bcl-2 signalling. These results identify a novel link between the p14^{ARF} and EGFR pathways and suggest that EGFR L858R counteracts the pro-apoptotic function of p14^{ARF} by downregulating its expression and promoting carcinogenesis.

Key words: p14ARF, mutant EGFR, STAT3, apoptosis, lung cancer

Introduction

Epidermal growth factor receptor (EGFR) is a membrane-bound receptor tyrosine kinase that belongs to the ErbB subfamily (Blume-Jensen and Hunter, 2001). Upon ligand binding, EGFR initiates activation of a series of cellular signal transduction pathways that regulate proliferation and survival (Jorissen *et al.*, 2003; Olayioye *et al.*, 2000; Yarden, 2001). In agreement with an oncogenic role of EGFR, increased levels of EGFR gene expression are observed in a variety of human cancers, including carcinoma of the lung, in which EGFR overexpression is correlated with a poor prognosis (Hirsch *et al.*, 2003; Krause and Van Etten, 2005; Nicholson *et al.*, 2001; Ohsaki *et al.*, 2000). Somatic-activating mutations in the tyrosine kinase domain of EGFR are also observed in lung adenocarcinomas and are associated with a high likelihood of clinical response to treatment with EGFR tyrosine kinase inhibitors (Lynch *et al.*, 2004; Paez *et al.*, 2004; Pao *et al.*, 2004). Most lung adenocarcinoma-associated somatic mutations are represented by the in-frame deletion of amino acids 47-750 in exon 19 (Del19) and the missense substitution L858R in exon 21 (L858R) (Shigematsu *et al.*, 2005). These kinase domain mutations in EGFR are generally referred to as activating mutations, as they result in the increased activity of the receptor, leading to the hyperactivation of downstream pro-survival pathways (PI3K/AKT, STAT) and oncogenic transformation (RAS/MAPK) (Greulich *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2005; Sordella *et al.*, 2004). Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) is a transcription factor that is important in mediating the pro-survival effects of mutant EGFR (Jorissen *et al.*, 2003). STAT3 becomes activated through the phosphorylation of tyrosine residue 705 by Janus kinases in response to cytokine signalling or by receptors with intrinsic tyrosine kinase activity, such as EGFR (Zhong *et al.*, 1994). Phosphorylation results in dimerisation and translocation of STAT3 to the nucleus, where it activates transcription of a wide variety of genes involved in cell growth and survival (Bowman *et al.*, 2000; Bromberg and Darnell,

2000; Levy and Darnell, 2002). STAT3 is transiently activated in normal cells but is constitutively activated in lung adenocarcinoma cells expressing activating mutant EGFR (Haura *et al.*, 2005b; Mukohara *et al.*, 2003).

The p14^{ARF} protein (p14^{ARF} in humans and p19^{ARF} in mice) is encoded in the INK4a/ARF locus, together with p16^{INK4a} (Sherr, 2001). P14^{ARF} is a nuclear protein with tumour suppressor activity and is a key component of major signalling pathways that are responsible for restraining abnormal cell growth and for maintaining genomic stability in response to DNA damage and oncogenic stress (Ozenne *et al.*). P14^{ARF} is a key activator of the p53 pathway (Sharpless NE Mutat Res 2005). P14^{ARF} also displays inhibitory cell growth control independently of p53 (Ozenne *et al.*; Sherr, 2006). Therefore, p14^{ARF} is a critical component of tumour surveillance and has a strong protective role against lung cancer development (Eymin *et al.*, 2003). It has been shown that p14^{ARF} expression is frequently downregulated in human lung cancer, especially in small cell lung cancer and lung adenocarcinoma (Gazzeri *et al.*, 1998; Hsu *et al.*, 2004; Vonlanthen *et al.*, 1998). More recently, we observed that nearly all lung adenocarcinoma with EGFR L858R or Del 19 activating mutations have low or undetectable levels of p14^{ARF} protein (Mounawar *et al.*, 2007), suggesting that p14^{ARF} could be part of a failsafe mechanism protecting cells against untimely or excessive mitotic signals induced by EGFR signalling. In agreement with such a role, we report here that p14^{ARF} inhibits the proliferation of EGFR L858R mutant cells by inducing cell death. This process involves the activation of a STAT3-dependent pro-apoptotic signalling pathway aimed at restraining the expression of Bcl-2. Furthermore, we show that EGFR L858R inhibits p14^{ARF} expression and in this way counteracts the pro-apoptotic p14^{ARF}/STAT3 pathway. These results provide the first evidence of cross talk between the p14^{ARF} and mutant EGFR pathways.

Results

Expression of p14^{ARF} promotes apoptosis in EGFR L858R mutant cells

To investigate the relationships linking p14^{ARF} and mutant EGFR, we used H1975 cells derived from a lung adenocarcinoma and carrying the EGFR missense mutation L858R. H1975 cells were transfected with an expression vector encoding the human p14^{ARF} protein and stained with trypan blue to evaluate cell number. Because H1975 cells are difficult to transfect, they were selected with geneticin (G418) in the culture medium for 6 days before staining. We observed a 60% decrease in cell number upon p14^{ARF} transfection compared to cells transfected with a control empty vector (Figure 1a). Cell cycle profiling of p14^{ARF} transfected cells failed to detect any significant changes in G1/S/G2 phase distribution (data not shown). In contrast, active caspase3 staining in p14^{ARF} transfected cells clearly revealed apoptosis 72 hours post-transfection (Figure 1b). Although H1975 cells express a very low level of p14^{ARF}, its depletion using specific siRNA promoted the proliferation of EGFR L858R mutant cells compared to control mismatch siRNA (Figure 1c). These results indicate that p14^{ARF} inhibits the proliferation of cells harboring mutant EGFR. Similar results were observed in H3255 lung adenocarcinoma cells that also carry the L858R mutation (Supplementary Figure S1). These data demonstrate the ability of p14^{ARF} to inhibit the proliferation of EGFR L858R mutant cells by inducing apoptosis.

P14^{ARF}-mediated apoptosis involves the accumulation of pSTAT3-Y705

PI3K/Akt, Jak/STAT and MEK/ERK are key signal transduction pathways activated by EGFR (Jorissen *et al.*, 2003). Therefore, we studied the status of AKT, STAT3/5 and ERK proteins in response to p14^{ARF}. H1975 cells were transfected with either control or p14^{ARF} encoding expression vectors, and western blot analyses were performed after 6 days of G418 selection. We observed that expression of p14^{ARF} was associated with the accumulation of

phosphorylated STAT3 at residue Y705 (pSTAT3-Y705) (Figure 2a). In contrast, no apparent modification of STAT5, AKT, or ERK status was found in the same conditions. Additionally, a strong downregulation of pSTAT3-Y705 expression was observed when H1975 cells were depleted of p14^{ARF} by siRNA treatment (Figure 2b). Similar accumulation of pSTAT3-Y705 by p14^{ARF} was found when using the H3255 model (Supplementary Figure S2). When activated by tyrosine kinase signals, pSTAT3 accumulates in the nucleus to regulate gene expression (Levy and Darnell, 2002). Using immunofluorescence staining, we observed that transfection of p14^{ARF} induced the nuclear accumulation of pSTAT3-Y705 (Figure 2c). Interestingly, we noticed that both p14^{ARF} and pSTAT3 proteins co-localised. To analyse whether accumulation of pSTAT3-Y705 was indeed involved in p14^{ARF}-mediated apoptosis, we neutralized the STAT3 pathway by treating H1975 cells transfected with either control or p14^{ARF} expression vector with the specific STAT3 pharmacological inhibitor cucurbitacin. As expected, cucurbitacin strongly inhibited STAT3 phosphorylation (Figure 2d). Importantly, cucurbitacin prevented apoptosis in p14^{ARF} transfected cells compared to non treated cells (Figure 2d). Of note, a slight downregulation of STAT3 expression was found in the presence of cucurbitacin in agreement with autoregulation of the STAT3 gene (Ichiba *et al.*, 1998; Narimatsu *et al.*, 2001). Furthermore, decreased p14^{ARF} expression protein levels were reproducibly observed in response to cucurbitacin, suggesting the existence of a positive feedback loop between p14^{ARF} and STAT3. We concluded that activation of STAT3 is critical for p14^{ARF}-mediated apoptosis in EGFR mutant L858R cells.

Because these data implied that STAT3 might play a role in promoting apoptosis in our L858R mutant models, we induced accumulation of pSTAT3-Y705 in H1975 and H3255 cells by transfecting siRNA against PTP-RT, the phosphatase that specifically dephosphorylates STAT3 on Tyr 705 (Zhang *et al.*, 2007), and analysed its effects on apoptosis. As illustrated, silencing PTP-RT resulted in the accumulation of pSTAT3-Y705

(Figure 3a) and strongly promoted cell death, as measured by caspase3 cleavage (Figure 3a and Figure 3b). These data support the idea that STAT3 activates an intrinsic pro-apoptotic signalling pathway in lung tumour cells harboring the EGFR L858R mutation and indicate that p14^{ARF} activates this pathway.

The pro-apoptotic p14^{ARF}/STAT3 signalling pathway targets Bcl-2

Phosphorylation at tyrosine 705 is critical for activation of STAT3 signal transduction (Levy and Darnell, 2002). Numerous STAT3 target genes have been identified and include regulators of apoptosis such as Bcl-xL, Bcl-2 and Bax (Haura *et al.*, 2005a; Haura *et al.*, 2005b). In our cellular models expressing mutant EGFR L858R, inhibiting STAT3 expression (Figure 4a) or phosphorylation (Figure 4b) using specific siRNA and cucurbitacin, respectively, induced the accumulation of the anti-apoptotic Bcl-2 protein. In contrast, expression of Bax and Bcl-xL did not change. Downregulation of Bcl-2 was observed when pSTAT3-Y705 accumulation was induced through neutralization of PTP-RT (Figure 4c). These results indicate that the STAT3-dependent pro-apoptotic pathway involves downregulation of Bcl-2 expression in EGFR L858R cells. In agreement with these data, transfecting cells with an p14^{ARF} expression vector induced a clear downregulation of Bcl-2 whereas p14^{ARF} knock-down promoted Bcl-2 accumulation (Figure 4d and Supplementary Figure S2). In both cases, a significant deregulation of Bcl-2 transcripts was also observed (data shown). Treating cells with cucurbitacin prevented the downregulation of Bcl-2 induced by p14^{ARF} (Figure 4e). Overall, these data identified Bcl-2 as an important target of the STAT3-dependent pro-apoptotic signalling pathway in EGFR L858R cells and indicated that p14^{ARF} triggers STAT3-dependent downregulation of Bcl-2 expression.

The EGFR L858R mutant downregulates p14^{ARF} expression and counteracts the p14^{ARF}/STAT3 pro-apoptotic pathway

We previously observed that p14^{ARF} levels are very low in human lung tumours with activating mutant EGFR (Mounawar *et al.*, 2007) as well as in the H1975 and H3255 lung tumour models. Therefore, we postulated that the EGFR L858R mutant might inhibit p14^{ARF} expression to counteract its pro-apoptotic function. We first transfected H1299 lung adenocarcinoma cells with a plasmid encoding the EGFR L858R mutant and analysed the expression of endogenous p14^{ARF}, either by immunofluorescence staining 2 days post-transfection (Figure 5a) or by western blotting after 6 days of G418 selection (Figure 5b). In both situations, a significant downregulation of p14^{ARF} protein was observed in cells expressing the EGFR L858R mutant. Silencing EGFR L858R in both H1975 and H3255 cells induced the accumulation of p14^{ARF} (Figure 5c). These results indicate that the EGFR L858R mutant negatively controls p14^{ARF} expression. Moreover, the downregulation of p14^{ARF} expression following transfection of H1299 cells with EGFR L858R expression vector was accompanied by reduced levels of pSTAT3-Y705 as well as an upregulation of Bcl-2 expression (Figure 6a); these data are consistent with the hypothesis that EGFR L858R represses the pro-apoptotic p14^{ARF}/STAT3/Bcl-2 signalling pathway. Conversely, accumulation of pSTAT3-Y705 and downregulation of Bcl-2 were observed in EGFR L858R depleted cells (Figure 6b) and correlated with an induction of apoptosis (Figure 6c) and inhibition of cell proliferation (Figure 6d). Importantly, silencing p14^{ARF} rescued EGFR L858R knock-down cells from pSTAT3-Y705 accumulation and Bcl-2 downregulation (Figure 6b), from induction of apoptosis (Figure 6c) and from inhibition of cell proliferation (Figure 6d). These results demonstrate that the EGFR L858R mutant counteracts the p14^{ARF}/STAT3/Bcl-2-dependent pro-apoptotic signalling pathway by a mechanism involving the downregulation of p14^{ARF}.

Discussion

Somatic activating mutations in the tyrosine kinase domain of EGFR are involved in the aetiology and maintenance of lung tumours through constitutive activation of AKT and STAT survival pathways. Recently, reduced levels of p14^{ARF} were observed in almost all lung tumours harboring activating mutant EGFR, suggesting a role for the p14^{ARF} tumour suppressor in the control of mutant EGFR signalling. Here, we demonstrate that p14^{ARF} is a potent growth inhibitor of lung tumour cells expressing the EGFR L858R activating mutation and promotes cell death by activating a pro-apoptotic STAT3 pathway. In addition, we show that the EGFR L858R mutant counteracts the anti-proliferative function of p14^{ARF} by repressing its expression and STAT3-dependent pro-apoptotic signalling. These results identify a novel cross talk between the p14^{ARF} and EGFR pathways and suggest that inactivation of p14^{ARF} cooperates with activated EGFR to promote lung tumourigenesis.

We show that transient expression of p14^{ARF} induces apoptosis in EGFR L858R mutant cells and that STAT3 is an important factor in signalling p14^{ARF}-mediated cell death. STAT3 activation has been associated with proliferation, survival and cellular transformation. However, there are a number of examples where activated STAT3 appears to play a role in differentiation and in promoting apoptosis (Chapman *et al.*, 1999; Minami *et al.*, 1996; Nakajima *et al.*, 1996; O'Farrell *et al.*, 1998). In one such example, STAT3 activation has an established pro-apoptotic role during involution of the mammary gland (Chapman *et al.*, 1999). In this study, we show that blocking STAT3 activation prevents ARF-mediated apoptosis. This suggests that a pro-apoptotic STAT3 signalling pathway contributes to growth inhibition of EGFR L858R mutant cells by p14^{ARF}. In addition, we demonstrate that activated pSTAT3-Y705 accumulates in p14^{ARF}-transfected cells and promotes the downregulation of Bcl-2 expression. These results suggest that p14^{ARF} represses the transcriptional activity of STAT3 towards Bcl-2. It has been reported that Tip60 controls the transcriptional activity of

STAT3 (Xiao *et al.*, 2003). Moreover, we previously reported that p14^{ARF} interacts with Tip60 and controls its ability to regulate gene expression (Leduc *et al.*, 2006). It is tempting to speculate that Tip60 plays a role in STAT3-mediated repression of Bcl-2 expression by p14^{ARF}. Interestingly, depleting Tip60 using siRNA in H1975 cells resulted in the deregulation of pSTAT3-Y705 and Bcl-2 expression (data not shown). Further experiments are required to decipher the mechanisms involved in the control of STAT3 activity by Tip60 and to address the role of p14^{ARF} in this context.

Constitutive activation of AKT and STAT survival pathways correlates with oncogenic activity of mutant EGFRs (Greulich *et al.*, 2005; Sordella *et al.*, 2004). In this respect, mutant EGFRs have been reported to mediate indirect activation of a proliferative IL-6/gp130/JAK/STAT3 pathway, and high levels of activated STAT3 are observed in lung adenocarcinoma harboring activating mutations of EGFR (Gao *et al.*, 2007). Conversely, expression of mutant EGFRs appears essential for suppression of pro-apoptotic signals in lung cancers harboring these mutations, as their neutralization results in rapid apoptosis (Greulich *et al.*, 2005; Sordella *et al.*, 2004). However, the mechanisms and targets involved in this process are largely unknown. In this study, we show that a STAT3-dependent signalling pathway plays a role in promoting apoptosis in EGFR L858R mutant cells and that the p14^{ARF} tumour suppressor activates this pathway. We also provide evidence that the EGFR L858R mutant downregulates p14^{ARF} expression and therefore inhibits this STAT3-dependent pro-apoptotic signalling. These data indicate that p14^{ARF} is part of a failsafe mechanism protecting cells against untimely or excessive mitotic signals induced by EGFR L858R signalling and that inactivation of the ARF/STAT3 pro-apoptotic pathway contributes to mutant EGFR L858R dependence. This could explain the high frequency of decreased p14^{ARF} expression in tumours harboring an L858R mutation in the EGFR kinase domain (Mounawar *et al.*, 2007). Interestingly, our results strongly suggest that STAT3 positively regulates p14^{ARF} expression

identifying a positive feed-back loop between both proteins. Further experiments are required to elucidate whether STAT3 plays a role in the control of p14^{ARF} expression by the EGFR L858R mutant.

Identifying the regulatory pathways that affect the oncogenic potential of mutant EGFRs could contribute to the development of targeted therapies in the treatment of lung cancer. We demonstrate that p14^{ARF} promotes apoptosis of cells harboring the EGFR L858R mutation by inducing a STAT3/Bcl-2 pro-apoptotic pathway. Enhanced p14^{ARF}-mediated signalling in cells with EGFR L858R might therefore provide an additional therapeutic target in conjunction with EGFR-TKI.

Materials and methods

Cell lines, treatments, plasmids and transfection

H1975, H3255 and H1299 cell lines were derived from human lung adenocarcinoma and were from ATCC. H1299 cells carry a wild type EGFR, whereas H1975 and H3255 cells harbor a missense substitution L858R in exon 21. All cell lines were cultured in 5% CO₂ at 37°C in RPMI-1640 medium (GIBCO, Cergy Pontoise, France). Transient transfections were carried out using JetPEI (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France) according to the manufacturer's instructions. Plasmids used in transient transfections were pcDNA3.1 (used as a control), pcDNA3.1-p14^{ARF} and pcDNA3.1-EGFR-L858R. Treatment with 2 µM cucurbitacin (Santa Cruz, TEBU, Le Perray en Yvelines, France) was carried out for 24 hours.

Transfection of siRNA oligonucleotides

The sequences designed to specifically target human p14^{ARF}, PTP-RT and EGFR RNAs were as follows: p14^{ARF}, 5'-GAACAUGGUGCGCAGGUUCTT-3'; PTP-RT, 5'-GGAGGAGCCACUUCAGAAGUCACGG-3'; EGFR, 5'-CUCUGGAGGAAAAGAAAA

GAAAGU-3'. STAT3 siRNAs were purchased from InVitrogen (Cergy Pontoise, France). For all interference experiments, the mismatch siRNA oligonucleotide used as a control was 5'-UCGGCUCUUACGCAUCAA-3'. Cells were transfected with siRNA oligonucleotide duplexes using Oligofectamine reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The cells were analysed 72 hours post-transfection.

Western blot experiments and antibodies

Immunoblotting was performed using whole cell extracts prepared in RIPA buffer, as described previously (Eymin *et al.*, 2003). The anti-EGFR, anti-STAT3 (79D7), anti-pSTAT3-Y705 (D3A7), anti-STAT5 (3H7), anti-pSTAT5-Y694, anti-AKT (C67E7), anti-pAKT-S473, anti-ERK1/2, anti-pERK1/2-Y202/204 (E10) and anti-cleaved caspase3 (Asp175) antibodies were purchased from Cell Signalling (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France). The anti-Bcl-2 (C-2), anti-Bcl-xL (H62), anti-Bax (N20) and anti-tubulin (B5-1-2) antibodies were purchased from Santa Cruz (TEBU, Le Perray en Yvelines, France). The anti-p14^{ARF} (Ab1) antibody was from Calbiochem (VWR, Fontenay-sous-Bois, France), and the anti-Actin antibody was purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France)).

Indirect immunofluorescence

Cells were fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature, washed once with PBS, and permeabilised with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 min. Blocking was performed for 45 min in 5% BSA and incubation with anti-p14^{ARF} (Ab2) antibody from Calbiochem (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) or anti-STAT3-Y705 (D3A7) antibody from Cell Signalling (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France) was carried out overnight at 4°C in a humid chamber. Cells were then incubated for 45 min with Alexa 488 or Alexa 568,

mounted in a solution containing 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) (Vectashield, Clinisciences, Montrouge, France) and visualised using an Olympus BX41 microscope.

Quantitative RT-PCR analysis

Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and subjected to quantitative RT-PCR, as described previously (Van Den Broeck *et al.*, 2008). The primers used for mRNA amplification were as follows: *PTP-RT* forward: 5'-GGTTGCTAATCTGGGCAAGT-3'; *PTP-RT* reverse: 5'-CTGAGCTCTGTCCACCACAA-3'; *GAPDH* forward: 5'-CGAGATCCCTCCAAAATCAA-3'; *GAPDH* reverse: 5'-ATCCACAGTCTTCTGGGTGG-3'. Amplification of *GAPDH* was performed in all experiments and used as a reference gene. Relative gene expression was calculated for each sample as the ratio of target gene mRNA copy number to *GAPDH* mRNA copy number.

Apoptosis analysis

Induced apoptosis following neutralization of EGFR was studied on a total cell population using the PE-conjugated monoclonal active caspase3 antibody apoptosis kit (BD Biosciences, Pharmingen, Le Pont de Claix, France) according to the manufacturer's protocol. For the study of apoptosis following ARF transfection, a modified protocol was applied, allowing analysis of cells co-stained with ARF and active caspase3 antibodies. In brief, cells were fixed with 0.5% paraformaldehyde for 5 min at 4°C and subsequently permeabilised with 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min. Cells were blocked with 5% BSA for 30 min at room temperature. Cells were then incubated for 1 hour with anti-p14^{ARF} antibody (Ab2, Calbiochem) in 1% BSA in PBS, washed 2 times with PBS and incubated for an additional 1 hour with Alexa 488 and PE-conjugated active caspase3 antibody (BD Biosciences, Pharmingen, Le Pont de Claix, France). After being washed with PBS, cells were resuspended

in PBS and subjected to flow cytometric analysis using a FACScan flow cytometer (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Active caspase3 staining was assessed on ARF stained cells.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest

Acknowledgements

We thank Pr. A. Gazdar for providing us with the H1975 and H3255 cellular models and Dr. P. Hainaut for the pcDNA3.1-EGFR-L858R expression vector. We also thank Céline Barrial-Lampreia and Pascal Perron for technical assistance. This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U823, Association pour la Recherche sur le Cancer and la Fondation de France. P.O is supported by AGIR à Dom. D.D is supported by the Fond de dotation pour la recherche en santé respiratoire 2010.

References

- Blume-Jensen P, Hunter T (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**: 355-65.
- Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene* **19**: 2474-88.
- Bromberg J, Darnell JE, Jr. (2000). The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* **19**: 2468-73.
- Chapman RS, Lourenco PC, Tonner E, Flint DJ, Selbert S, Takeda K *et al* (1999). Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev* **13**: 2604-16.
- Eymin B, Leduc C, Coll JL, Brambilla E, Gazzeri S (2003). p14ARF induces G2 arrest and apoptosis independently of p53 leading to regression of tumours established in nude mice. *Oncogene* **22**: 1822-35.

Gao SP, Mark KG, Leslie K, Pao W, Motoi N, Gerald WL *et al* (2007). Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas. *J Clin Invest* **117**: 3846-56.

Gazzeri S, Della Valle V, Chaussade L, Brambilla C, Larsen CJ, Brambilla E (1998). The human p19ARF protein encoded by the beta transcript of the p16INK4a gene is frequently lost in small cell lung cancer. *Cancer Res* **58**: 3926-31.

Greulich H, Chen TH, Feng W, Janne PA, Alvarez JV, Zappaterra M *et al* (2005). Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutants. *PLoS Med* **2**: e313.

Haura EB, Turkson J, Jove R (2005a). Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* **2**: 315-24.

Haura EB, Zheng Z, Song L, Cantor A, Bepler G (2005b). Activated epidermal growth factor receptor-Stat-3 signalling promotes tumour survival in vivo in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **11**: 8288-94.

Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr., Di Maria MV, Veve R, Bremmes RM *et al* (2003). Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol* **21**: 3798-807.

Hsu HS, Wang YC, Tseng RC, Chang JW, Chen JT, Shih CM *et al* (2004). 5' cytosine-phospho-guanine island methylation is responsible for p14ARF inactivation and inversely correlates with p53 overexpression in resected non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **10**: 4734-41.

Ichiba M, Nakajima K, Yamanaka Y, Kiuchi N, Hirano T (1998). Autoregulation of the Stat3 gene through cooperation with a cAMP-responsive element-binding protein. *J Biol Chem* **273**: 6132-8.

Jiang J, Greulich H, Janne PA, Sellers WR, Meyerson M, Griffin JD (2005). Epidermal growth factor-independent transformation of Ba/F3 cells with cancer-derived epidermal growth factor receptor mutants induces gefitinib-sensitive cell cycle progression. *Cancer Res* **65**: 8968-74.

Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* **284**: 31-53.

Krause DS, Van Etten RA (2005). Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med* **353**: 172-87.

Leduc C, Claverie P, Eymin B, Col E, Khochbin S, Brambilla E *et al* (2006). p14ARF promotes RB accumulation through inhibition of its Tip60-dependent acetylation. *Oncogene* **25**: 4147-54.

Levy DE, Darnell JE, Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 651-62.

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**: 2129-39.

Minami M, Inoue M, Wei S, Takeda K, Matsumoto M, Kishimoto T *et al* (1996). STAT3 activation is a critical step in gp130-mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 3963-6.

Mounawar M, Mukeria A, Le Calvez F, Hung RJ, Renard H, Cortot A *et al* (2007). Patterns of EGFR, HER2, TP53, and KRAS mutations of p14arf expression in non-small cell lung cancers in relation to smoking history. *Cancer Res* **67**: 5667-72.

Mukohara T, Kudoh S, Yamauchi S, Kimura T, Yoshimura N, Kanazawa H *et al* (2003). Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and downstream-activated peptides in surgically excised non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* **41**: 123-30.

Nakajima K, Yamanaka Y, Nakae K, Kojima H, Ichiba M, Kiuchi N *et al* (1996). A central role for Stat3 in IL-6-induced regulation of growth and differentiation in M1 leukemia cells. *EMBO J* **15**: 3651-8.

Narimatsu M, Maeda H, Itoh S, Atsumi T, Ohtani T, Nishida K *et al* (2001). Tissue-specific autoregulation of the stat3 gene and its role in interleukin-6-induced survival signals in T cells. *Mol Cell Biol* **21**: 6615-25.

Nicholson RI, Gee JM, Harper ME (2001). EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* **37 Suppl 4**: S9-15.

O'Farrell AM, Liu Y, Moore KW, Mui AL (1998). IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signalling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. *EMBO J* **17**: 1006-18.

Ohsaki Y, Tanno S, Fujita Y, Toyoshima E, Fujiuchi S, Nishigaki Y *et al* (2000). Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer patients with p53 overexpression. *Oncol Rep* **7**: 603-7.

Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE (2000). The ErbB signalling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* **19**: 3159-67.

Ozenne P, Eymin B, Brambilla E, Gazzeri S The ARF tumour suppressor: structure, functions and status in cancer. *Int J Cancer* **127**: 2239-47.

Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S *et al* (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* **304**: 1497-500.

Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I *et al* (2004). EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumours to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 13306-11.

- Sherr CJ (2001). The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 731-7.
- Sherr CJ (2006). Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nat Rev Cancer* **6**: 663-73.
- Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba, II *et al* (2005). Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* **97**: 339-46.
- Sordella R, Bell DW, Haber DA, Settleman J (2004). Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* **305**: 1163-7.
- Van Den Broeck A, Brambilla E, Moro-Sibilot D, Lantuejoul S, Brambilla C, Eymin B *et al* (2008). Loss of histone H4K20 trimethylation occurs in preneoplasia and influences prognosis of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **14**: 7237-45.
- Vonlanthen S, Heighway J, Tschan MP, Borner MM, Altermatt HJ, Kappeler A *et al* (1998). Expression of p16INK4a/p16alpha and p19ARF/p16beta is frequently altered in non-small cell lung cancer and correlates with p53 overexpression. *Oncogene* **17**: 2779-85.
- Xiao H, Chung J, Kao HY, Yang YC (2003). Tip60 is a co-repressor for STAT3. *J Biol Chem* **278**: 11197-204.
- Yarden Y (2001). The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* **37 Suppl 4**: S3-8.
- Zhang X, Guo A, Yu J, Possemato A, Chen Y, Zheng W *et al* (2007). Identification of STAT3 as a substrate of receptor protein tyrosine phosphatase T. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 4060-4.
- Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr. (1994). Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* **264**: 95-8.

Titles and legends to figures

Figure 1: p14^{ARF} inhibits the growth of EGFR L858R mutant cells by inducing apoptosis.

(a), H1975 cells were transfected with either control (Ctl) or p14^{ARF} encoding vector and subjected to G418 selection for 6 days. Cell number was evaluated after trypan blue staining. Expression of transfected p14^{ARF} was studied by western blot analysis. Actin was used as a loading control. (b), H1975 cells were transfected with control (Ctl) or p14^{ARF} expressing vector for 72 h. Apoptosis was evaluated by active caspase3 staining in p14^{ARF}-transfected cells followed by FACS analysis. (c), H1975 cells were transfected with either control (Ctl) or p14^{ARF} siRNA for 72 hours. Cell number was evaluated after trypan blue staining. Efficiency of p14^{ARF} depletion was assessed by western blot analysis.

Figure 2: p14^{ARF}-mediated apoptosis involves the accumulation of pSTAT3-Y705.

H1975 cells were transfected with (a), control (Ctl) empty or p14^{ARF} encoding vector, (b), control or p14^{ARF} siRNA, and subjected to western blot analysis with indicated antibodies. Actin was used as a loading control. (c), H1975 cells were transfected with either control (Ctl) empty or p14^{ARF} expressing vector for 48 hours. Co-localisation of p14^{ARF} (green) and pSTAT3-Y705 (red) was visualised by immunofluorescence. DAPI (blue) was used to counterstain nuclei. (d), H1975 cells were transfected with either control (Ctl) empty or p14^{ARF} expressing vector for 48 hours and treated for 24 additional hours with cucurbitacin (2 μ M). Apoptosis was evaluated by active caspase3 staining in p14^{ARF}-transfected cells followed by FACS analysis. Apoptosis was expressed as the ratio between control and p14^{ARF} transfected cells in each condition (with or without cucurbitacin). The number of apoptotic cells in control-transfected cells (Ctl) was normalized to 1. Data represent the mean \pm S.D. of three independent experiments. Inhibition of STAT3 phosphorylation by cucurbitacin and

expression of p14^{ARF} were assessed by western blotting. Tubulin was used as a loading control.

Figure 3: Existence of intrinsic STAT3-dependent pro-apoptotic signalling in EGFR L858R cells.

H1975 and H3255 cells were transfected for 72 hours with either control (Ctl) or PTP-RT siRNA. **(a)** Total cellular extracts were subjected to western blot analysis with indicated antibodies. Tubulin was used as a loading control. Neutralization of PTP-RT was assessed by RT-QPCR. *GAPDH* was used as an internal control. **(b)** Apoptosis was evaluated by active caspase3 staining, followed by FACS analysis. Relative levels of apoptotic cells were calculated as described below.

Figure 4: Bcl-2 is a critical target of p14^{ARF}/STAT3-dependent pro-apoptotic signalling pathway.

(a) H1975 and H3255 cells were transfected for 72 hours with either control (Ctl) or STAT3 siRNA. Total cellular extracts were subjected to western blot analysis with the indicated antibodies. Tubulin was used as a loading control. **(b)** H1975 and H3255 cells were incubated for 24 hours with cucurbitacin (2 μ M). Bcl-2, STAT3 and pSTAT3-Y705 were detected by western blot analysis. Tubulin was used as a loading control. **(c)** H1975 and H3255 cells were transfected for 72 hours with control (Ctl) or siRNA against PTP-RT. Total cellular extracts were subjected to western blot analysis with indicated antibodies. Depletion of PTP-RT was assessed by RT-QPCR. *GAPDH* was used as an internal control. **(d)** H1975 cells were transfected with either p14^{ARF} encoding vectors or p14^{ARF} siRNA and subjected to western blot analysis with indicated antibodies. Actin was used as a loading control. **(e)** H1975 cells were transfected for 48 h with control (-) or p14^{ARF} (+) expressing vector and treated for an

additional 24 hours with cucurbitacin (2 μ M). Western blotting was performed on total cellular extracts. Tubulin was used as a loading control.

Figure 5: The EGFR L858R mutant downregulates p14^{ARF} expression.

(a) H1299 cells were transfected for 24 hours with either control (Ctl) empty or EGFR L858R expression vector. Expression of p14^{ARF} (green) and EGFR L858R (red) was analysed by immunofluorescence using anti-p14^{ARF} and anti-phospho EGFR antibodies, respectively. DAPI (blue) was used to counterstain nuclei. (b) H1299 cells were transfected with either control (Ctl) empty vector or EGFR L858R expression vector and selected for 6 days with G418. Total cellular extracts were subjected to western blot analysis with indicated antibodies. Actin was used as a loading control. The relative densitometric areas for p14^{ARF} were determined according to actin signal and arbitrarily assigned to 1 in control cells. (c) H1975 and H3255 cells were transfected with either control (Ctl) or EGFR siRNA for 72 hours. Total cellular extracts were subjected to western blot analysis with indicated antibodies. Tubulin was used as a loading control. A relative p14^{ARF}/tubulin ratio was calculated as described below.

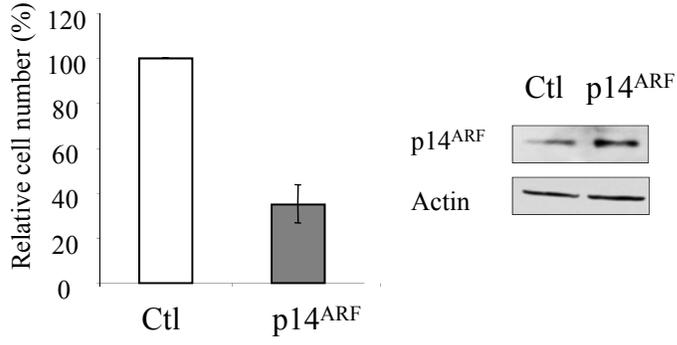
Figure 6: Mutant EGFR L858R counteracts the pro-apoptotic p14^{ARF}/STAT3/Bcl-2 pathway.

(a) H1299 cells were transfected with either empty (Ctl) or EGFR L858R expression vector and selected for 6 days with G418. Expression of EGFR, STAT3, pSTAT3-Y705 and Bcl-2 proteins was studied by western blot analysis. Tubulin was used as a loading control. (b-d) H1975 and H3255 cells were transfected for 72 hours with either control (Ctl) or siRNAs against EGFR and/or p14^{ARF}. (b) Total cellular extracts were subjected to western blot analysis using indicated antibodies. Tubulin was used as a loading control. (c) Apoptosis was studied by active caspase3 staining, followed by FACS analysis. Apoptosis was expressed as

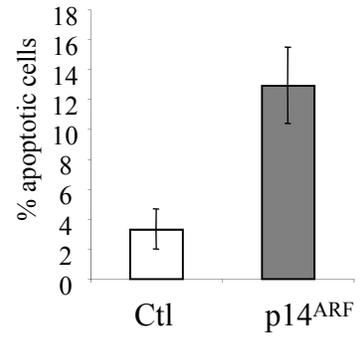
the ratio between control and sip14^{ARF}/siEGFR transfected cells. The number of apoptotic cells in control-transfected cells (Ctl) was normalised to 1. Data represent the mean \pm S.D. of three independent experiments. **(d)** Cell number was evaluated after trypan blue staining.

Figure 1

a



b



c

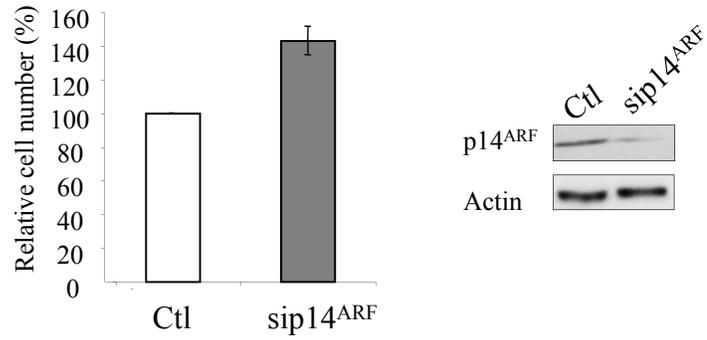
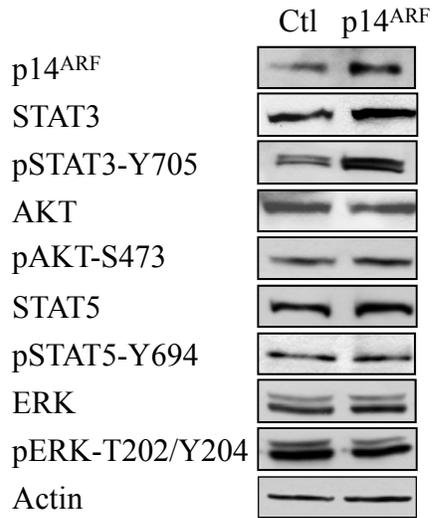
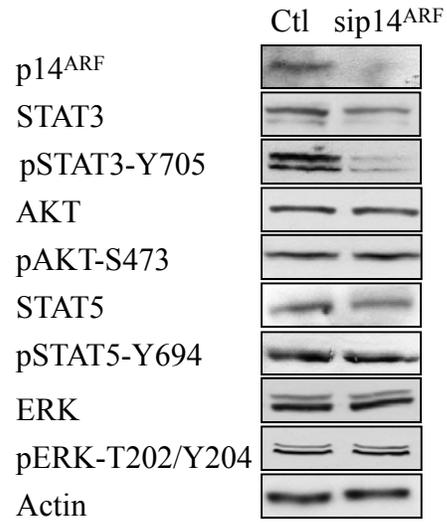


Figure 2

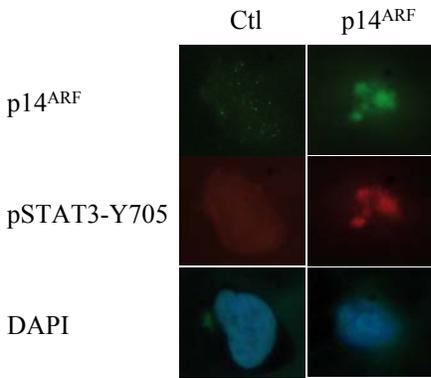
a



b



c



d

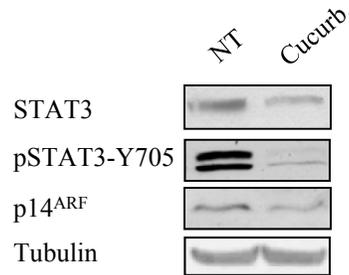
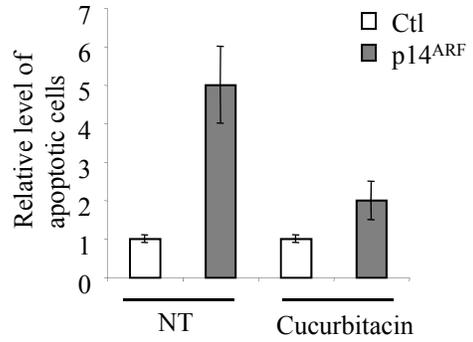
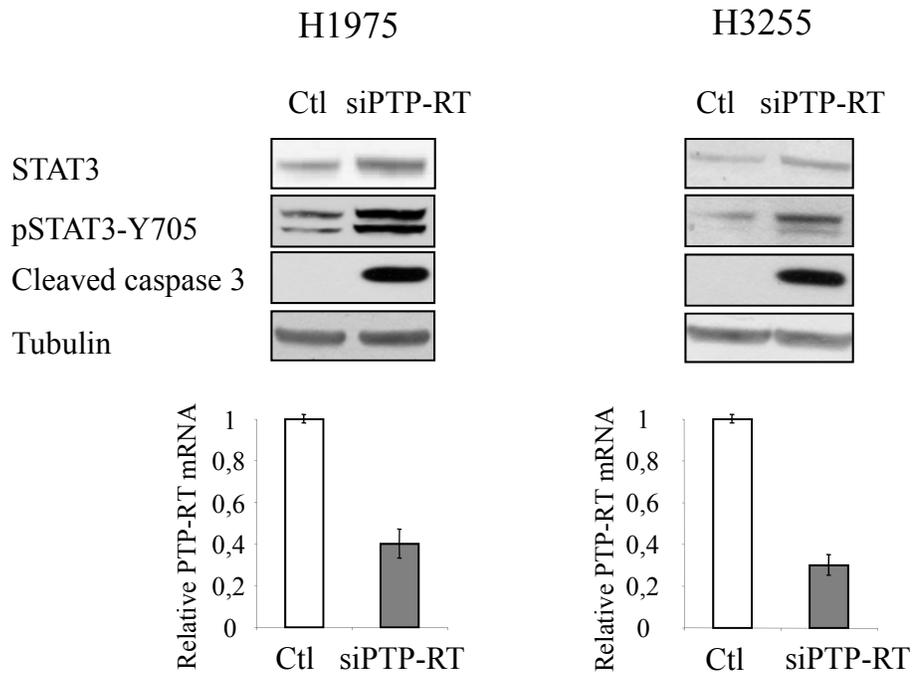


Figure 3

a



b

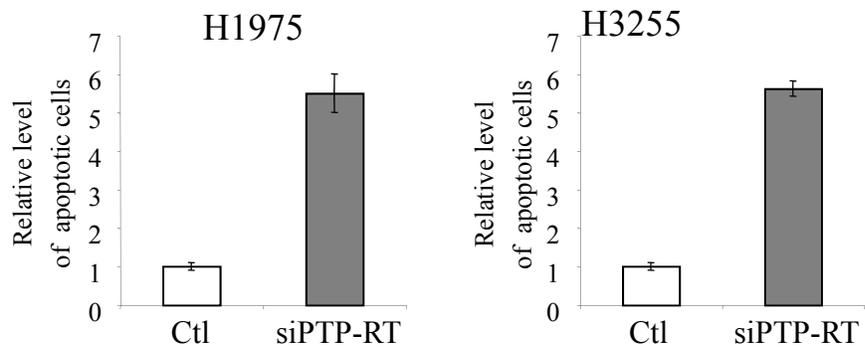


Figure 4

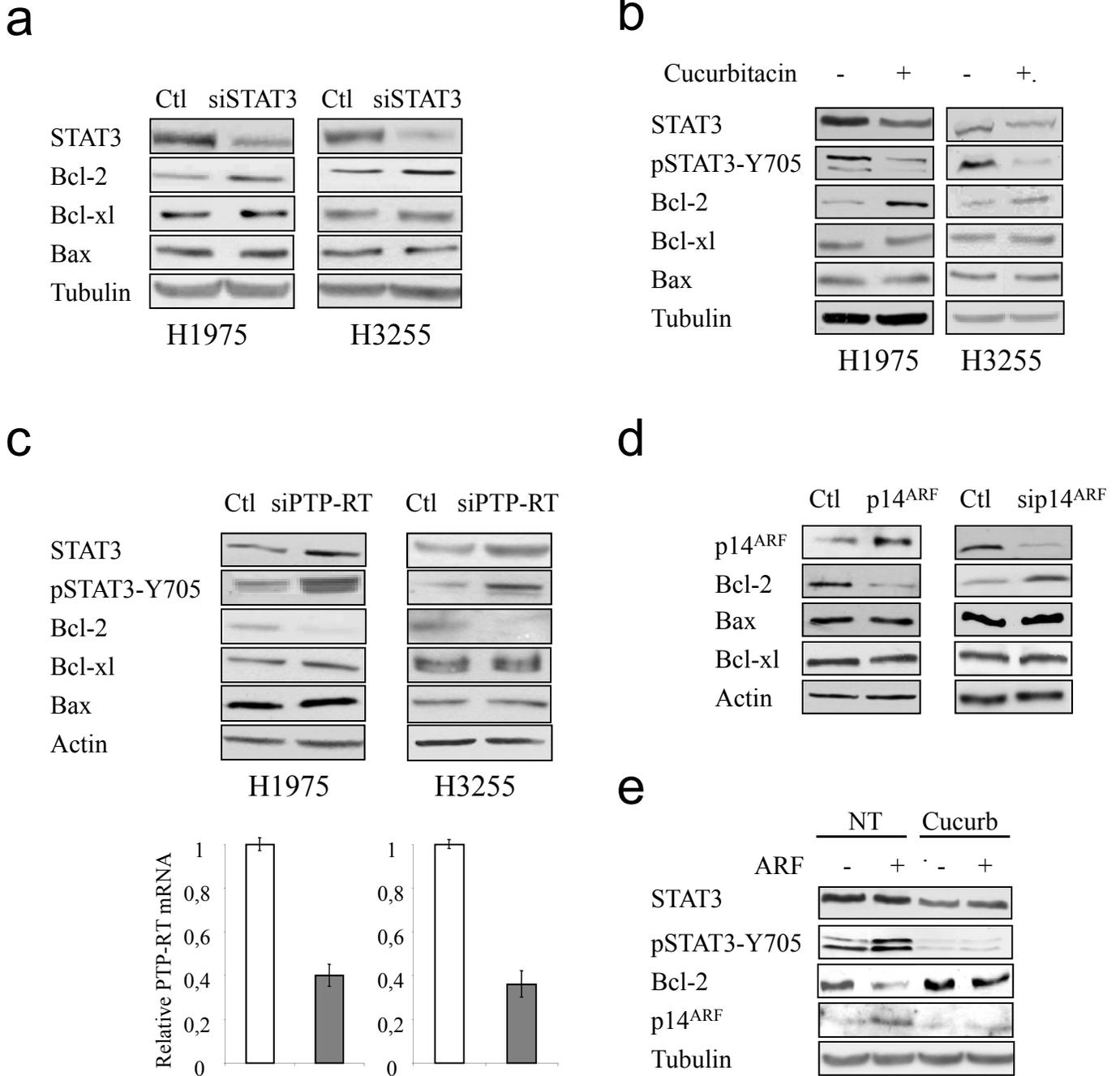
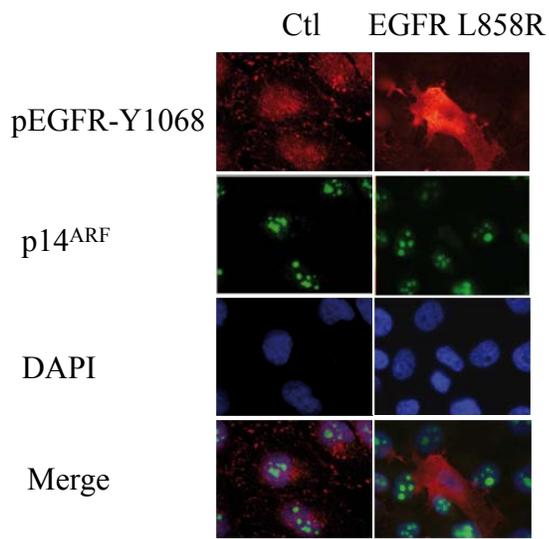
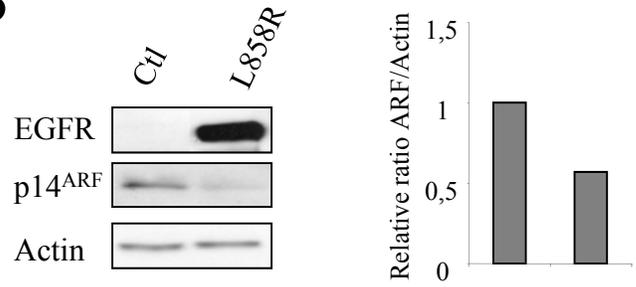


Figure 5

A



B



C

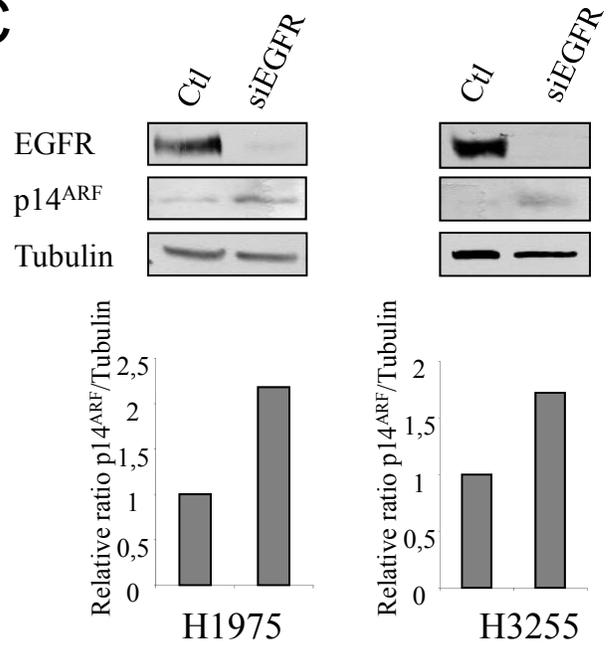
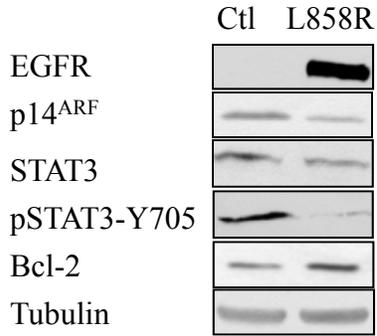
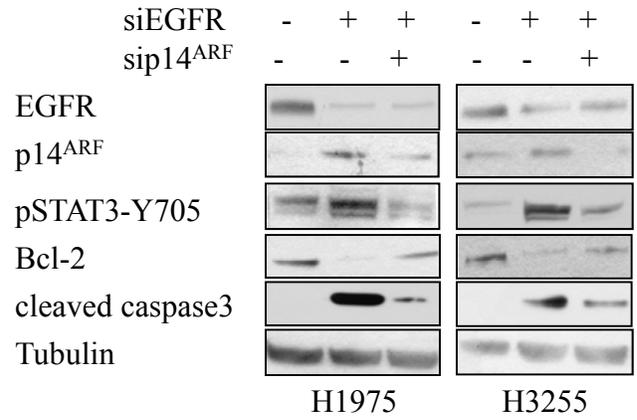


Figure 6

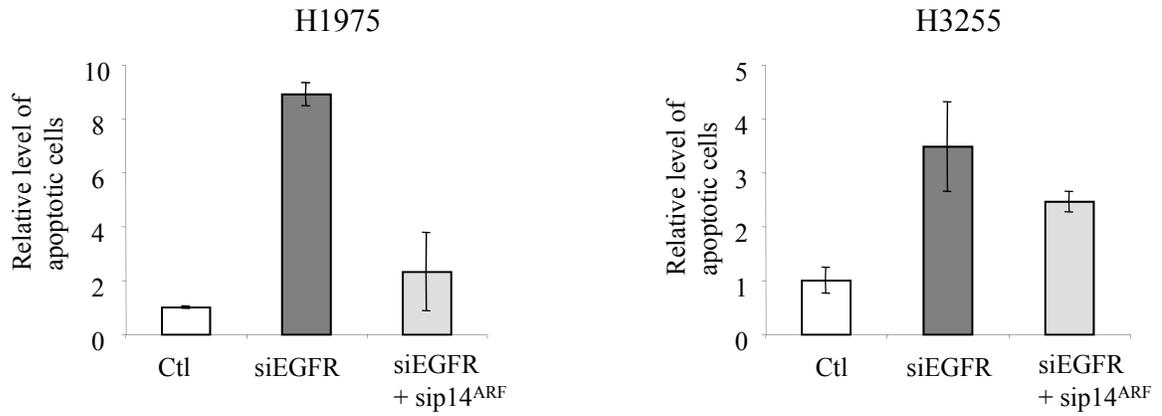
a



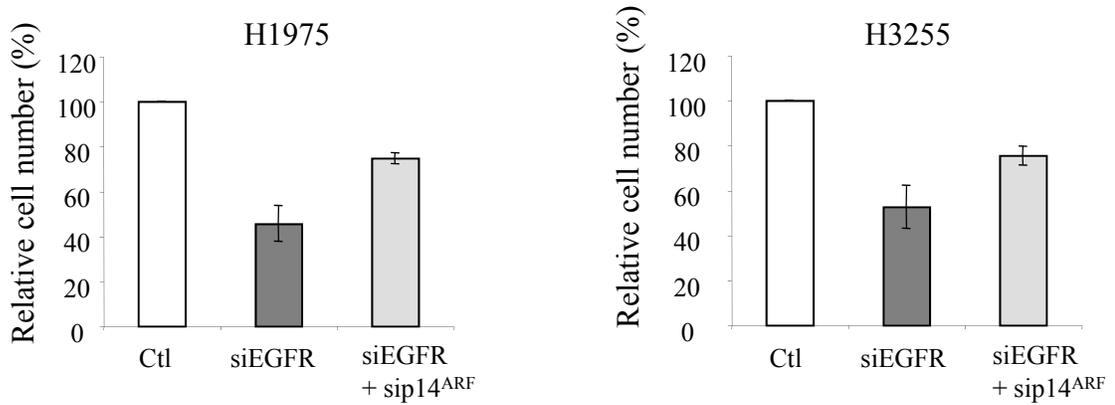
b



c



d



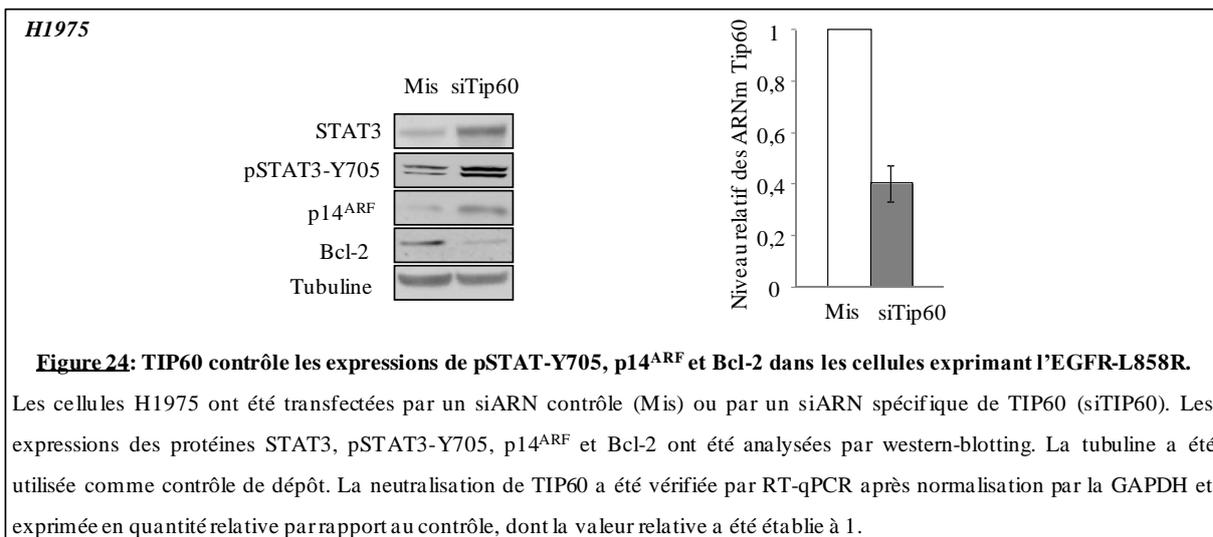
B.4. Conclusion et résultats complémentaires

Ce travail a permis d'établir pour la première fois un lien fonctionnel entre le mutant oncogénique EGFR-L858R et la protéine suppresseur de tumeur p14^{ARF} dans les cellules humaines d'adénocarcinome pulmonaire. p14^{ARF} s'oppose à l'action oncogénique du mutant L858R de l'EGFR en induisant une fonction peu connue de STAT3 impliquée dans le déclenchement de l'apoptose *via* une diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. De plus, nous avons montré que les cellules exprimant la mutation L858R s'opposent à l'activation de la voie STAT3 pro-apoptotique en inhibant l'expression de p14^{ARF}.

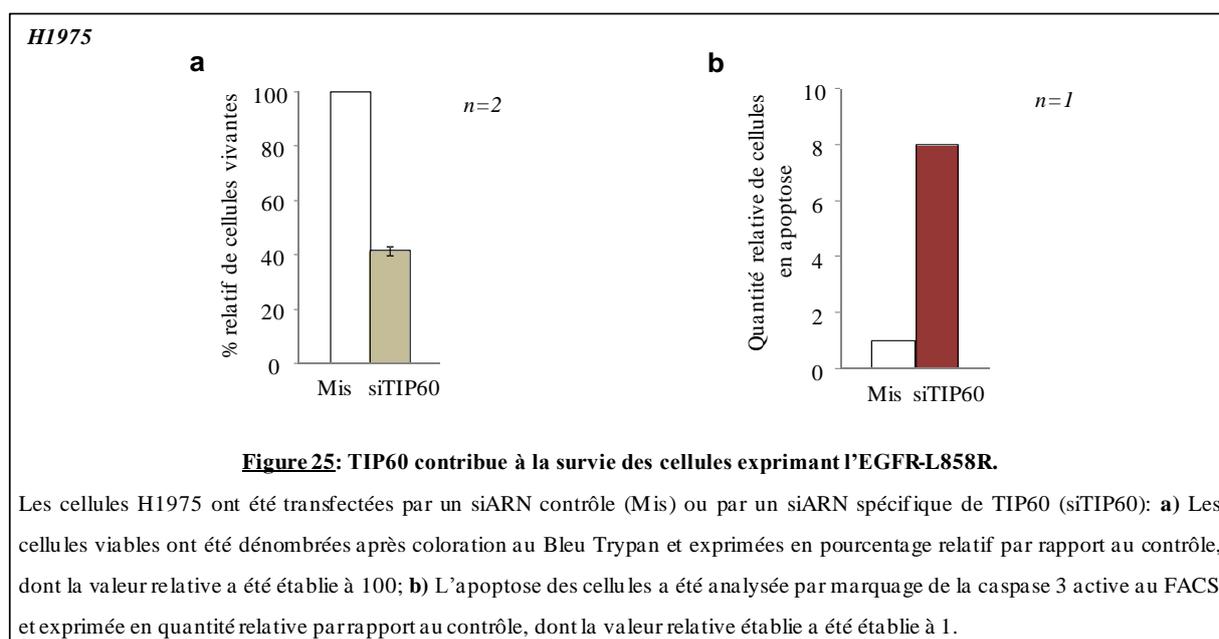
B.4.1. TIP60 : un acteur de l'inhibition de la voie pro-apoptotique p14^{ARF}/STAT3/Bcl-2 ?

TIP60 est une histone acétyltransférase appartenant à la famille MYST, initialement identifiée comme une enzyme catalysant la liaison d'un groupement acétyl sur les protéines histones (Carrozza M.J. et al., 2003). Cependant, l'activité de TIP60 peut s'étendre à l'acétylation de protéines non histones (Sapountzi V. et al., 2006). De façon intéressante, une étude montre dans un modèle *in vitro* que TIP60 est un co-répresseur de STAT3 (Xiao H. et al., 2003). Par ailleurs, notre équipe a décrit une interaction entre les protéines p14^{ARF} et TIP60, et montré que ces deux protéines coopèrent dans la réponse aux dommages de l'ADN (Eymin B. et al., 2006a). Enfin, nos résultats suggèrent que STAT3 réprime l'activation transcriptionnelle de Bcl-2 en réponse à p14^{ARF} (Ozenne P. et al., en révision). Nous avons donc voulu savoir si dans notre contexte, TIP60 pouvait moduler la voie pro-apoptotique dépendante de STAT3.

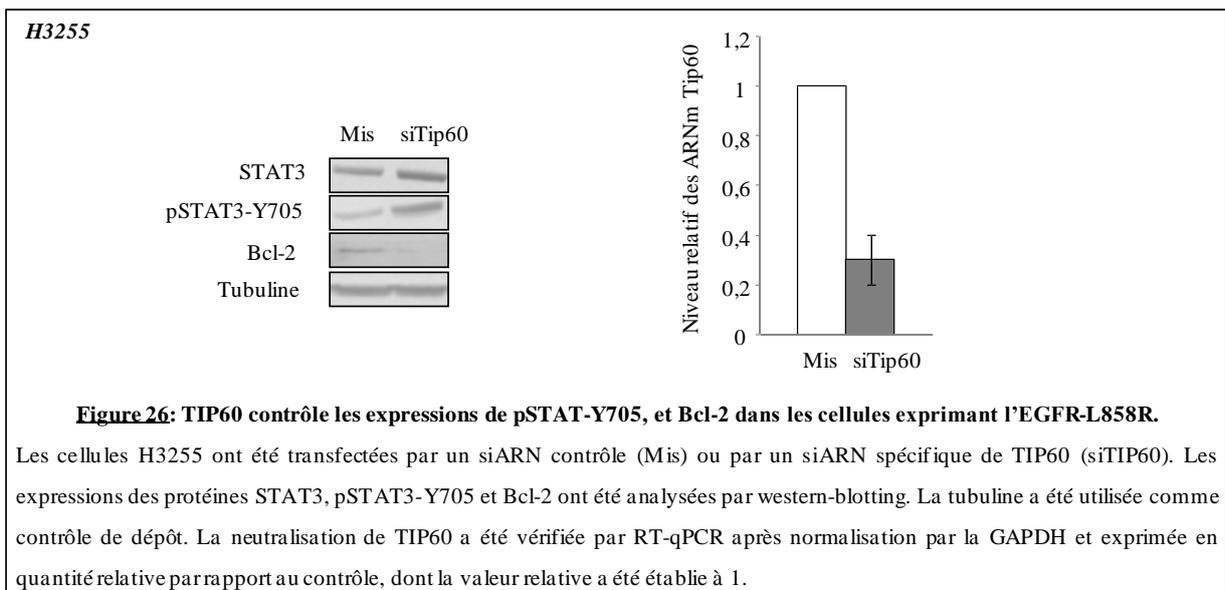
Nous avons neutralisé l'expression de TIP60 par siARN dans les cellules H1975. Après 72h de transfection, nous avons vérifié l'efficacité de neutralisation de TIP60 par RT-qPCR, puis analysé les niveaux d'expression de pSTAT3-Y705 et de Bcl-2 par western-blotting dans les cellules H1975. Nous avons observé une accumulation de pSTAT3-Y705, ainsi qu'une inhibition de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 suite à la neutralisation de TIP60 (**Figure 24**). De façon intéressante, nous avons également observé une augmentation de l'expression protéique de p14^{ARF} suite à cette neutralisation. TIP60 semble donc s'opposer à la phosphorylation de STAT3-Y705 et à l'expression de la protéine p14^{ARF}, tout en favorisant l'expression protéique de Bcl-2.



En accord avec ces résultats, nous avons constaté que la neutralisation de TIP60 diminue le nombre de cellules viables (**Figure 25a**) et semble induire l'apoptose (**Figure 25b**). Ces données tendent à indiquer que TIP60 s'oppose à l'induction de l'apoptose induite par p14^{ARF} en contrôlant les expressions de p14^{ARF}, pSTAT3-Y705 et Bcl-2.



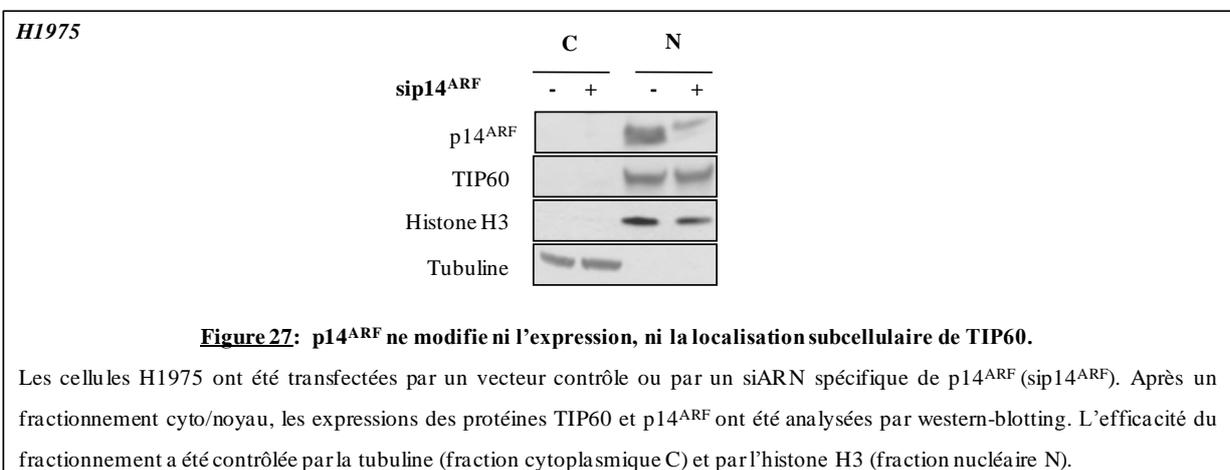
Nous avons en partie confirmé les résultats obtenus dans la lignée H1975, dans le second modèle cellulaire H3255. La neutralisation de TIP60 conduit également à une augmentation de pSTAT3-Y705 et une diminution de l'expression de Bcl-2 (**Figure 26**).



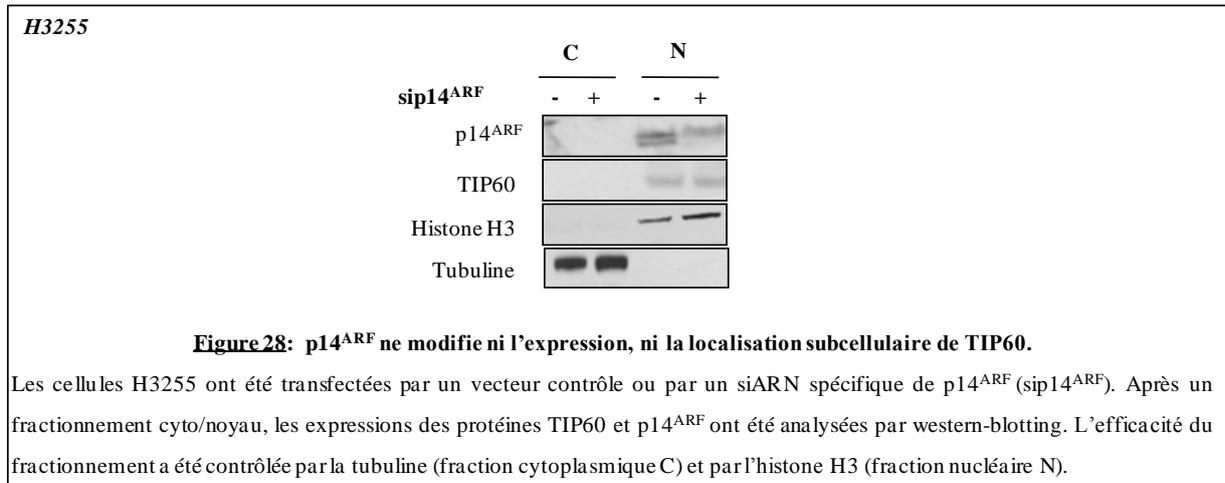
Ces résultats préliminaires suggèrent fortement que l'histone acétyltransférase TIP60 contribue à l'inhibition de la voie p14^{ARF}/STAT3/Bcl-2 pro-apoptotique.

B.4.1.1. P14^{ARF} ne module pas la localisation subcellulaire et l'expression de TIP60

Puisque TIP60 semble s'opposer aux effets anti-prolifératifs de p14^{ARF}, nous avons recherché si p14^{ARF} pouvait contrôler l'expression et /ou la distribution subcellulaire de TIP60. Nous avons neutralisé p14^{ARF} dans les cellules H1975, puis étudié l'expression de TIP60 dans des fractions cytosoliques et nucléaires. Les résultats préliminaires obtenus par western-blotting ne montrent ni d'augmentation de l'expression, ni de délocalisation subcellulaire de TIP60 en réponse à la neutralisation de p14^{ARF} (**Figure 27**).



Comme dans la lignée H1975, nous avons également constaté que p14^{ARF} ne modifie ni l'expression, ni la localisation subcellulaire de TIP60 dans la lignée H3255 (**Figure 28**).



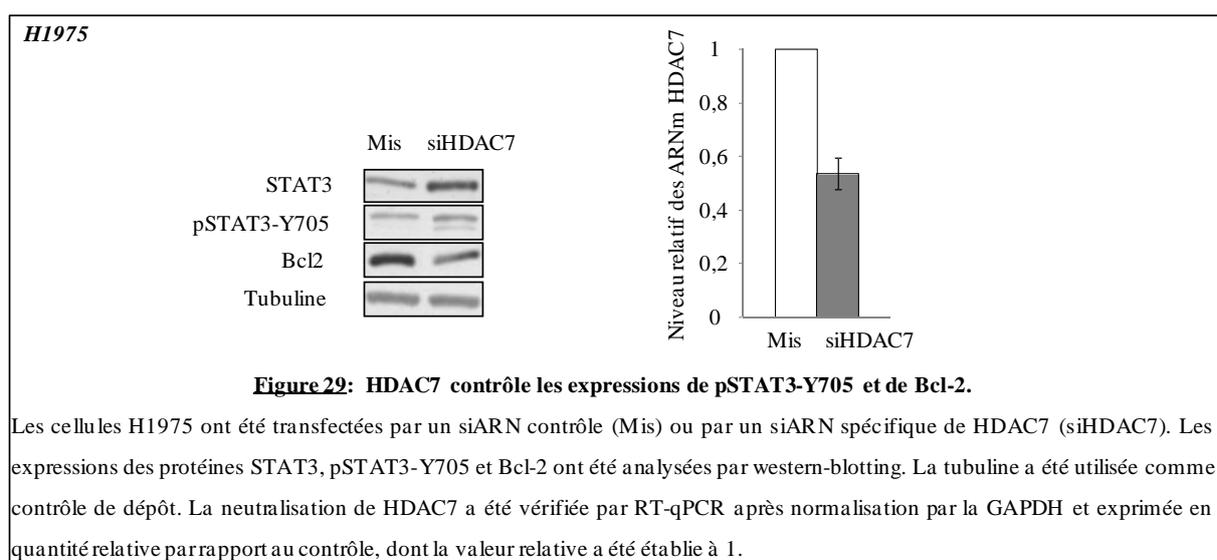
La protéine p14^{ARF} ne semble moduler ni la localisation subcellulaire de TIP60, ni son expression pour prévenir son action inhibitrice sur la phosphorylation de STAT3-Y705.

Ces résultats préliminaires obtenus dans les deux lignées exprimant la mutation EGFR-L858R suggèrent que l'histone acétyltransférase TIP60 s'oppose à l'activation de la voie pro-apoptotique p14^{ARF}/STAT3/Bcl-2 en contrôlant les expressions de ses trois principaux acteurs. En revanche, ces données ne semblent pas mettre en évidence un contrôle de l'expression ou de la localisation de TIP60 par p14^{ARF}.

B.4.2. HDAC7 : un autre complice de TIP60 ?

HDAC7 est une histone déacétylase de classe IIA caractérisée dans la majorité des études comme un co-répresseur transcriptionnel (Chang S. et al., 2006 ; Gao C. et al., 2010 ; Pham L. et al., 2010). De façon intéressante, il a été décrit *in vitro* que les protéines TIP60 et HDAC7 coopèrent pour bloquer l'activité transcriptionnelle de STAT3 (Xiao H. et al., 2003). En revanche, l'étude ne décrit pas le mécanisme exact mis en jeu lors de cette co-répression transcriptionnelle par le complexe TIP60/HDAC7.

Nous avons recherché si HDAC7 pouvait contrôler la signalisation pro-apoptotique médiée par STAT3. Pour cela, nous avons neutralisé l'expression de HDAC7 dans la lignée H1975. Après 72h de transfection, la neutralisation de HDAC7 a été vérifiée par RT-qPCR, puis le niveau d'expression de pSTAT3-Y705 a été analysé par western-blotting. Nos résultats préliminaires montrent une augmentation de pSTAT3-Y705 après neutralisation de HDAC7 (**Figure 29**). De façon intéressante, nous avons également constaté une diminution de l'expression protéique de Bcl-2 suite à cette neutralisation.

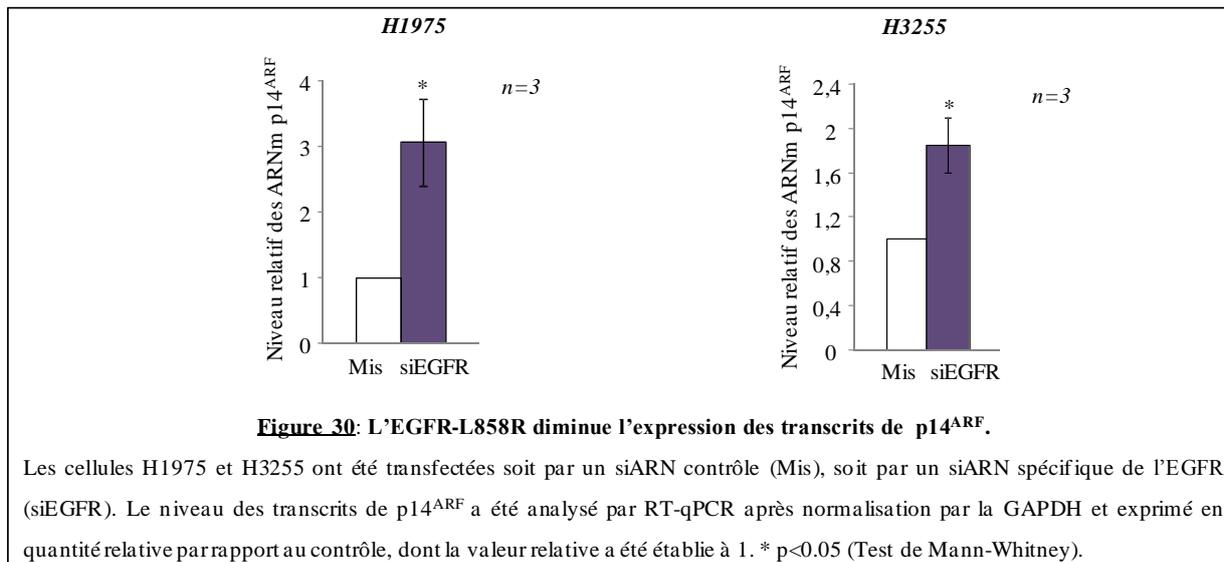


L'expression de HDAC7 pourrait avoir le même effet que l'expression de TIP60, en induisant une inhibition de la phosphorylation de STAT3-Y705 et une augmentation de l'expression de Bcl-2. Très peu de données existent sur HDAC7 dans les cancers humains, en particulier dans les cancers du poumon, mais ces résultats nous engagent à vérifier les effets indépendants et/ou conjoints de TIP60 et HDAC7 sur l'expression de pSTAT3, Bcl-2 et p14^{ARF}, ainsi que sur la croissance et l'apoptose des cellules exprimant l'EGFR-L858R.

B.4.3. L'EGFR inhibe l'expression transcriptionnelle et protéique de p14^{ARF}

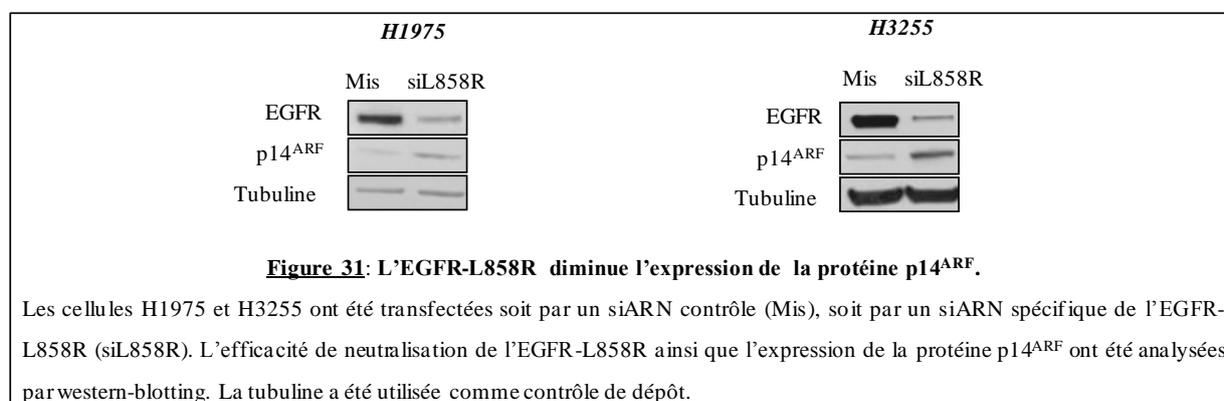
Au cours de cette étude, nous avons observé que l'EGFR-L858R réprimait l'expression de la protéine p14^{ARF} (Ozenne P. et al., en révision, **Figure 6a - 6b**). Nous avons recherché si cette diminution de l'expression protéique de p14^{ARF} concordait avec une inhibition de l'expression de ses transcrits. Dans un premier temps, nous avons utilisé des siARN capables de neutraliser à

la fois l'EGFR sauvage et l'EGFR-L858R (Sordella R. et al., 2004) afin de réaliser des RT-qPCR sur des ARNm issus des lignées H1975 et H3255.

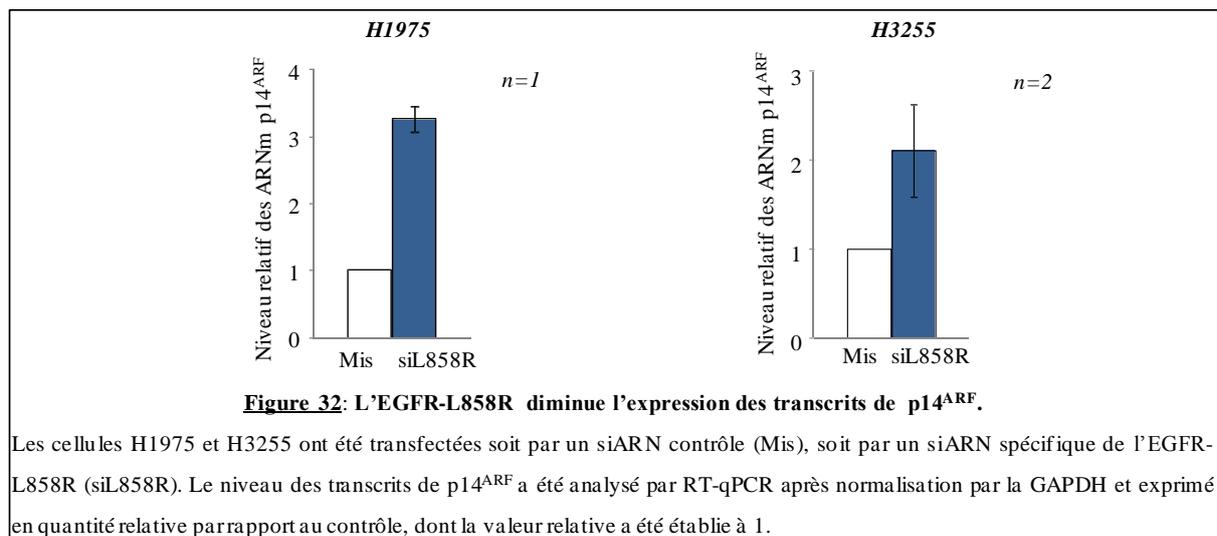


En accord avec les résultats obtenus par western-blotting au cours de cette étude, nous avons observé une augmentation significative et importante de l'expression des transcrits de p14^{ARF}, en particulier dans la lignée H1975, en réponse à la neutralisation de l'EGFR (**Figure 30**).

Nous avons souhaité confirmer ces résultats en utilisant cette fois-ci un autre siARN qui cible spécifiquement l'EGFR-L858R (Sordella R. et al., 2004, supporting online material). Nous avons d'abord vérifié la neutralisation de l'EGFR-L858R dans les lignées H1975 et H3255, puis analysé l'expression protéique de p14^{ARF} par western-blotting. Nous avons confirmé l'augmentation de l'expression de p14^{ARF} (**Figure 31**) après la neutralisation du récepteur muté EGFR-L858R par les siARN spécifiques de cette mutation.



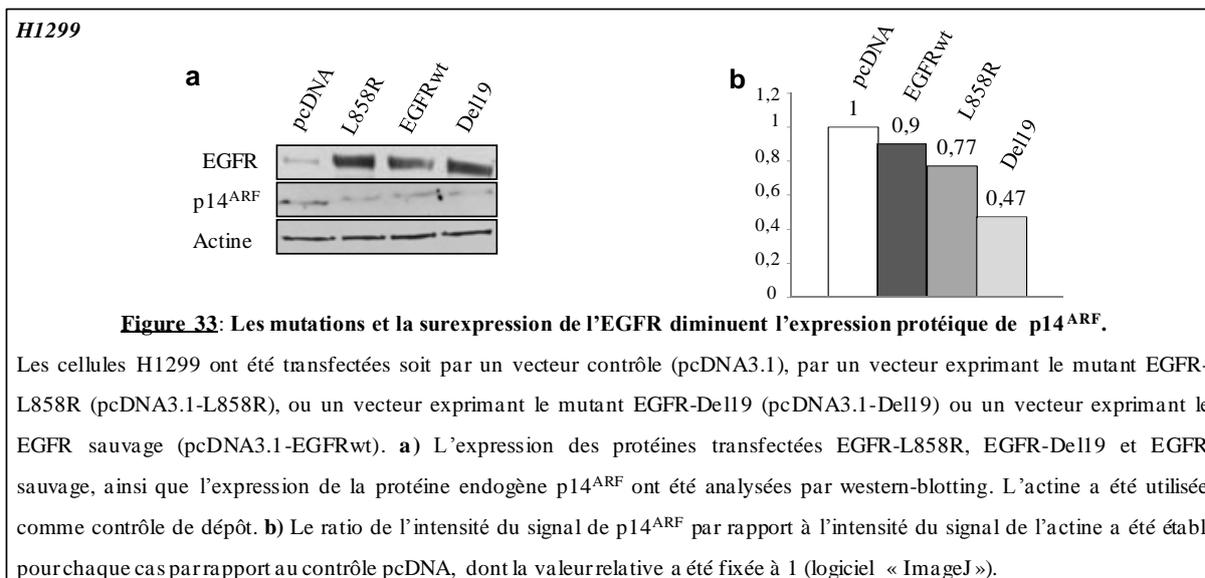
Là encore, les données préliminaires de RT-qPCR semblent montrer une nette augmentation du niveau d'expression des ARNm de p14^{ARF} (**Figure 32**).



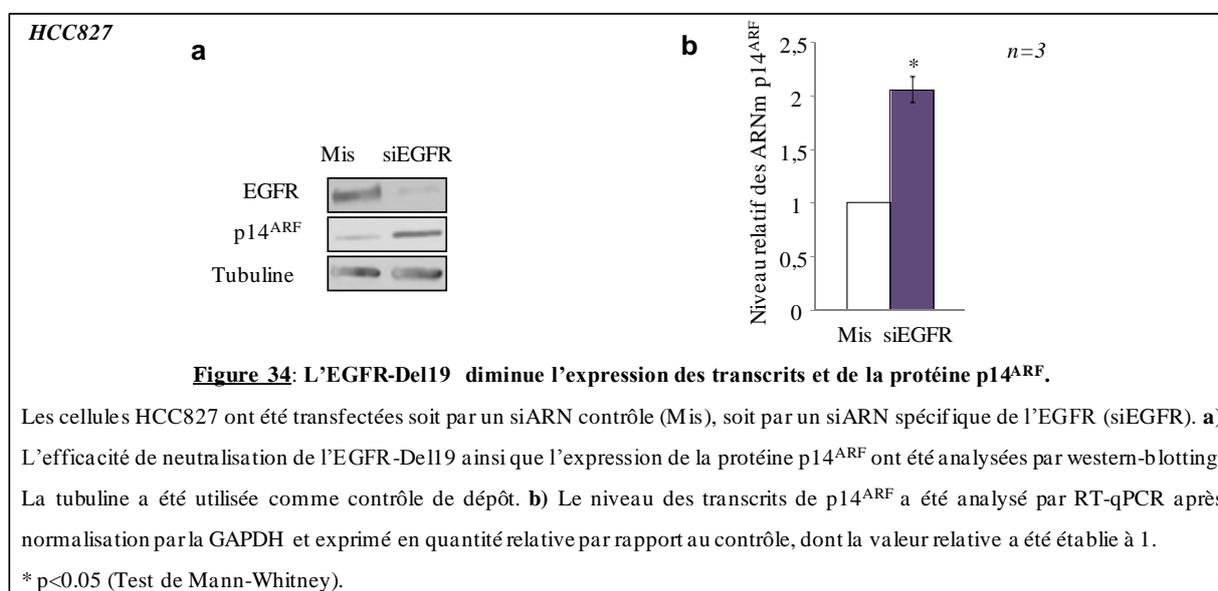
Les résultats suggèrent très fortement que l'EGFR-L858R est capable d'inhiber l'expression de p14^{ARF} au niveau transcriptionnel.

De façon très intéressante, une expérience préliminaire avait été réalisée en transfectant des vecteurs d'expression codant pour l'EGFR-L858R, l'EGFR-Del19 ou l'EGFR sauvage dans la lignée humaine d'adénocarcinome pulmonaire H1299 qui exprime un EGFR sauvage. Nous avons étudié l'expression protéique de p14^{ARF} par western-blotting après une sélection des cellules transfectées à la G418 pendant 6 jours. Nous avons quantifié à l'aide du logiciel « ImageJ » l'intensité du signal de p14^{ARF} par rapport à l'intensité du signal de l'actine. Le ratio des deux intensités avait été établi entre chacun des cas par rapport au contrôle pcDNA.

Nous avons constaté une inhibition modeste de l'expression de la protéine p14^{ARF} par surexpression de l'EGFR sauvage, mais plus marquée suite à l'expression des mutations L858R ou Del19 de l'EGFR (**Figure 33**).



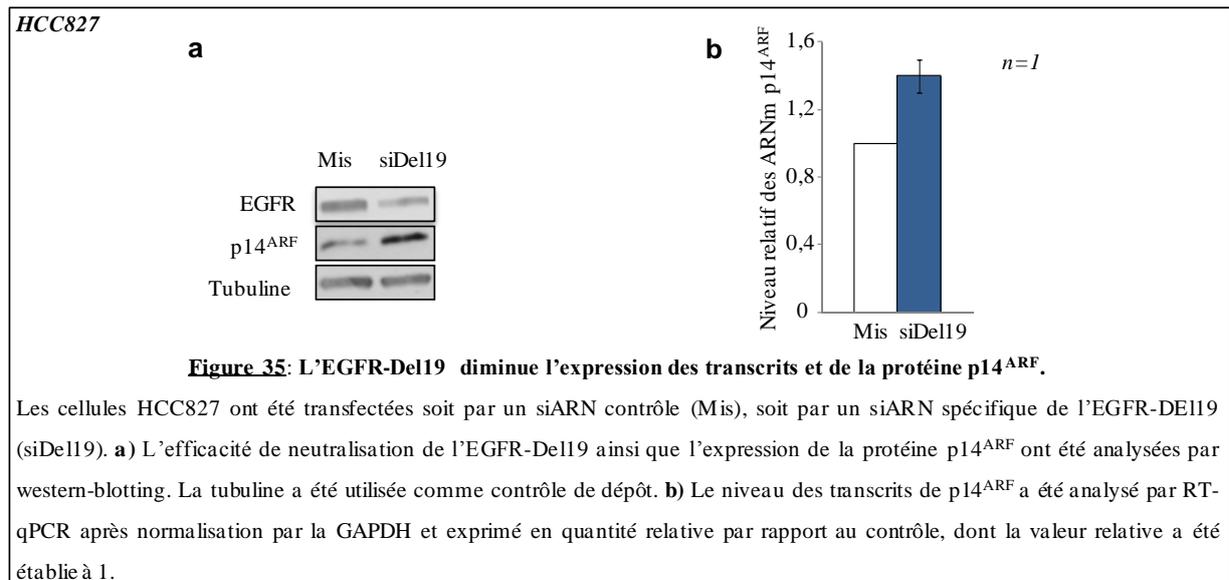
Nous avons donc recherché les effets de la mutation Del19 de l'EGFR sur l'expression de p14^{ARF} dans des cellules humaines d'adénocarcinome pulmonaire qui expriment constitutivement cette mutation. Pour cela, nous avons utilisé la lignée cellulaire HCC827 qui exprime la mutation Del19 de l'EGFR de façon amplifiée (nombre de copies : 34, données transmises par le Professeur Adi F. Gazdar) dans laquelle nous avons transfecté des siARN ciblant à la fois les formes sauvage et mutée de l'EGFR.



Nous avons constaté là-aussi une augmentation importante du niveau d'expression de la protéine de p14^{ARF} lorsque l'EGFR est neutralisé (**Figure 34a**). De plus, les analyses de RT-

qPCR montrent une augmentation significative du niveau des transcrits de p14^{ARF} dans ces conditions (**Figure 34b**).

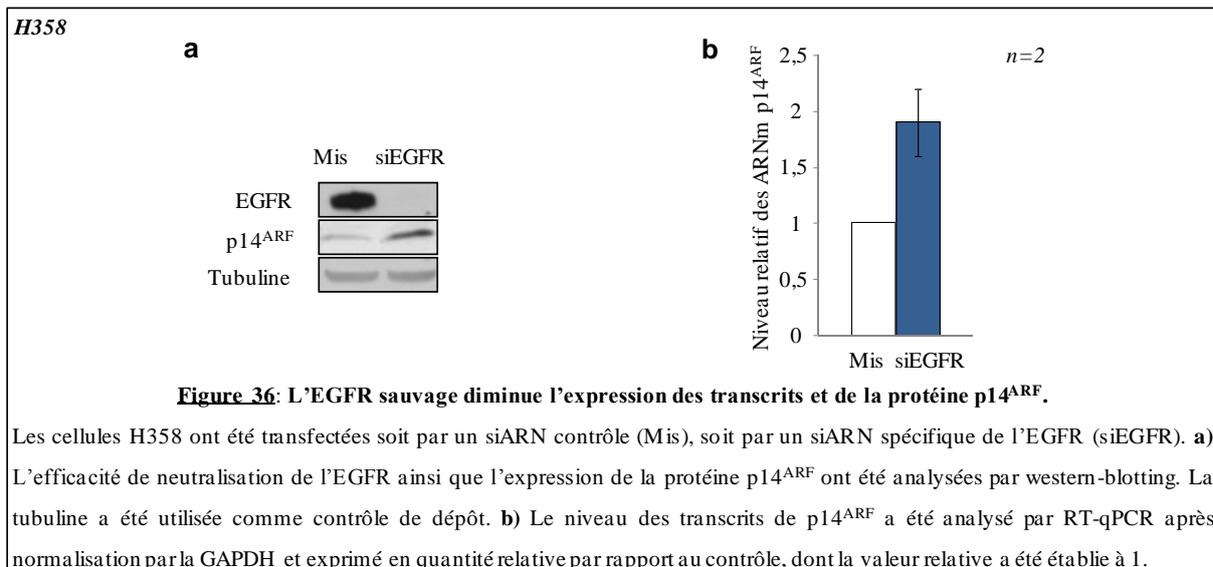
Afin de confirmer ces données, nous avons cette fois neutralisé le récepteur muté par des séquences de siARN spécifiques de la mutation Del19 (Sordella R. et al., 2004, supporting online material). Les résultats en western-blotting confirment l'augmentation de l'expression de la protéine p14^{ARF} (**Figure 35a**). De plus, il semble là aussi que les transcrits de p14^{ARF} soit affectés (**Figure 35b**).



Le mutant Del19 de l'EGFR serait lui aussi capable d'inhiber l'expression de p14^{ARF} au niveau transcriptionnel.

Enfin, nous avons souhaité confirmer une potentielle régulation de l'expression de p14^{ARF} par neutralisation de l'EGFR sauvage. Nous avons suivi la même démarche expérimentale, en utilisant la lignée humaine d'adénocarcinome pulmonaire H358 exprimant un EGFR sauvage, mais également une mutation de K-Ras.

Nos résultats préliminaires montrent que la neutralisation de l'EGFR sauvage par des siARN spécifiques est particulièrement efficace dans cette lignée cellulaire et induit une nette augmentation de l'expression de la protéine p14^{ARF} (**Figure 36a**) et de ses transcrits (**Figure 36b**).



L'ensemble des données indique donc que le récepteur à l'EGF, qu'il soit sauvage ou muté, réprime l'expression de p14^{ARF}. Ces données suggèrent en outre que le contrôle exercé par l'EGFR sur p14^{ARF} implique un mécanisme de régulation transcriptionnelle. Les résultats restent néanmoins à confirmer, notamment dans une lignée exprimant un EGFR sauvage sans mutation de Ras.

B.4.4. La signalisation pro-apoptotique médiée par STAT3 n'est pas restreinte au mutant EGFR-L858R...

L'existence d'une voie pro-apoptotique dépendante de STAT3 constitue une donnée surprenante et contradictoire à la fonction oncogénique très largement attribuée à STAT3 dans les tumeurs humaines (Alvarez J.V. et al., 2005), notamment dans les CBNPC (Alvarez J.V. et al., 2006). Nous avons recherché si l'existence de cette voie pouvait être commune aux lignées humaines d'adénocarcinome pulmonaire, quelque soit le statut de l'EGFR.

Nous avons tout d'abord neutralisé la phosphatase PTP-RT dans les cellules HCC827, exprimant l'EGFR-Del19. Dans ces cellules, la neutralisation de la PTP-RT induit bien l'accumulation de pSTAT3-Y705 (**Figure 37b**). Ceci s'accompagne d'une diminution significative du pourcentage relatif de cellules vivantes (**Figure 37b**), ainsi que d'une induction de l'apoptose (**Figure 37c**).

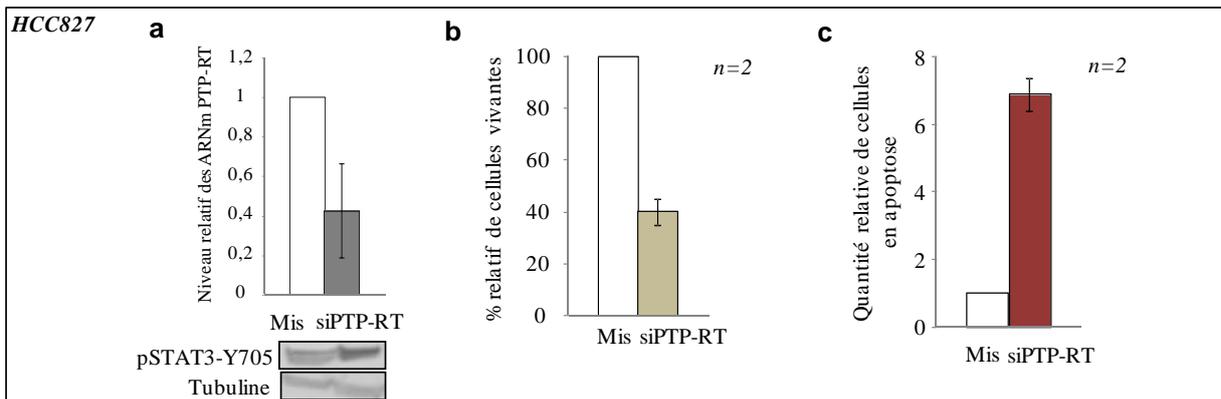


Figure 37: L'accumulation de pSTAT3-Y705 corrèle avec une inhibition de la croissance et à l'induction de l'apoptose des cellules exprimant un EGFR-Del19.

Les cellules HCC827 ont été transfectées soit par un siARN contrôle (Mis), soit par un siARN spécifique de PTP-RT (siPTP-RT). **a)** La neutralisation de PTP-RT a été vérifiée par RT-qPCR après normalisation par la GAPDH et l'accumulation de pSTAT3-Y705 a été vérifiée par western-blotting. La tubuline a été utilisée comme contrôle de dépôt; **b)** Les cellules viables ont été dénombrées après coloration au Bleu Trypan et exprimées en pourcentage relatif par rapport au contrôle, dont la valeur relative a été établie à 100; **c)** L'apoptose a été quantifiée au FACS par marquage de la caspase 3 active et exprimée en quantité relative par rapport au contrôle, dont la valeur relative a été établie à 1.

Nous avons également neutralisé l'expression de PTP-RT dans les cellules H358, exprimant un EGFR sauvage mais présentant une mutation de K-Ras. La neutralisation de PTP-RT corrèle bien avec une accumulation de pSTAT3-Y705 (**Figure 38a**), une diminution significative du pourcentage relatif de cellules viables (**Figure 38b**), ainsi qu'une induction de l'apoptose (**Figure 38c**).

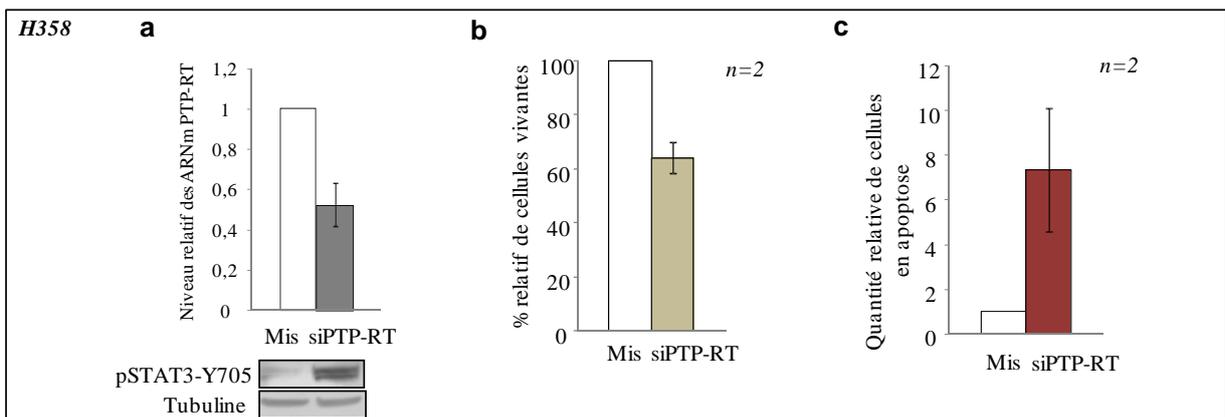


Figure 38: L'accumulation de pSTAT3-Y705 corrèle avec une inhibition de la croissance et à l'induction de l'apoptose des cellules exprimant un EGFR sauvage.

Les cellules H358 ont été transfectées soit par un siARN contrôle (Mis), soit par un siARN spécifique de PTP-RT (siPTP-RT). **a)** La neutralisation de PTP-RT a été vérifiée par RT-qPCR après normalisation par la GAPDH et l'accumulation de pSTAT3-Y705 a été vérifiée par western-blotting. La tubuline a été utilisée comme contrôle de dépôt; **b)** Les cellules viables ont été dénombrées après coloration au Bleu Trypan et exprimées en pourcentage relatif par rapport au contrôle, dont la valeur relative a été établie à 100; **c)** L'apoptose a été quantifiée au FACS par marquage de la caspase 3 active et exprimée en quantité relative par rapport au contrôle, dont la valeur relative a été établie à 1.

L'ensemble de ces résultats suggère donc que l'accumulation de pSTAT3-Y705 peut induire l'apoptose dans différents modèles d'adénocarcinome pulmonaire, et ce quelque soit le statut de l'EGFR (sauvage ou muté).

C. p14^{ARF} : nouvelle cible transcriptionnelle de STAT3

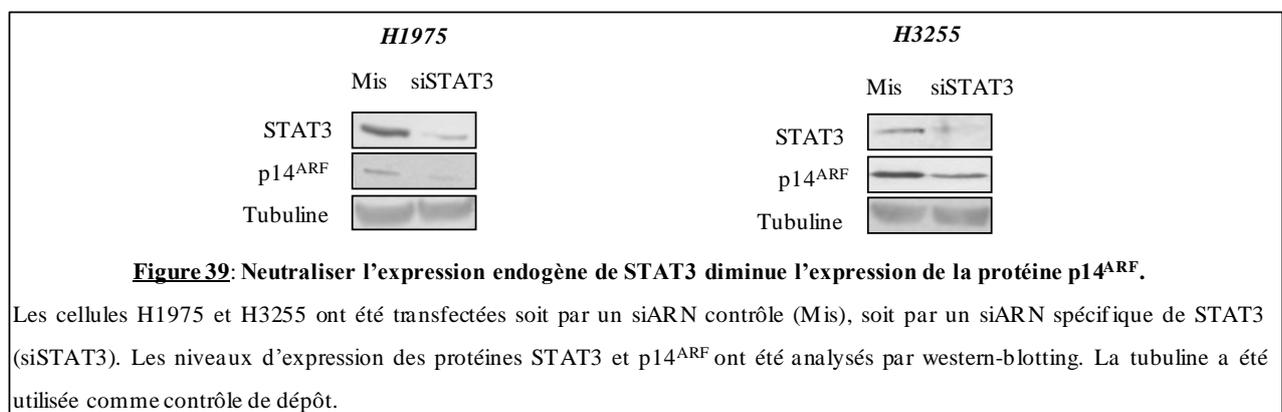
C.1. Présentation de l'étude

Nous avons précédemment montré que p14^{ARF} induisait l'accumulation de pSTAT3-Y705 et activait par ce biais une signalisation pro-apoptotique (Ozenne P. et al., en révision). De façon intéressante, dans cette étude, nous avons également constaté une diminution de l'expression de la protéine p14^{ARF} en réponse à la neutralisation de pSTAT3-Y705 par la cucurbitacine I (**Figures 2d, 4e**). A l'inverse, l'accumulation de pSTAT3-Y705 suite à la neutralisation de l'EGFR-L858R, induit une augmentation de p14^{ARF} (**Figures 6a, 6b**).

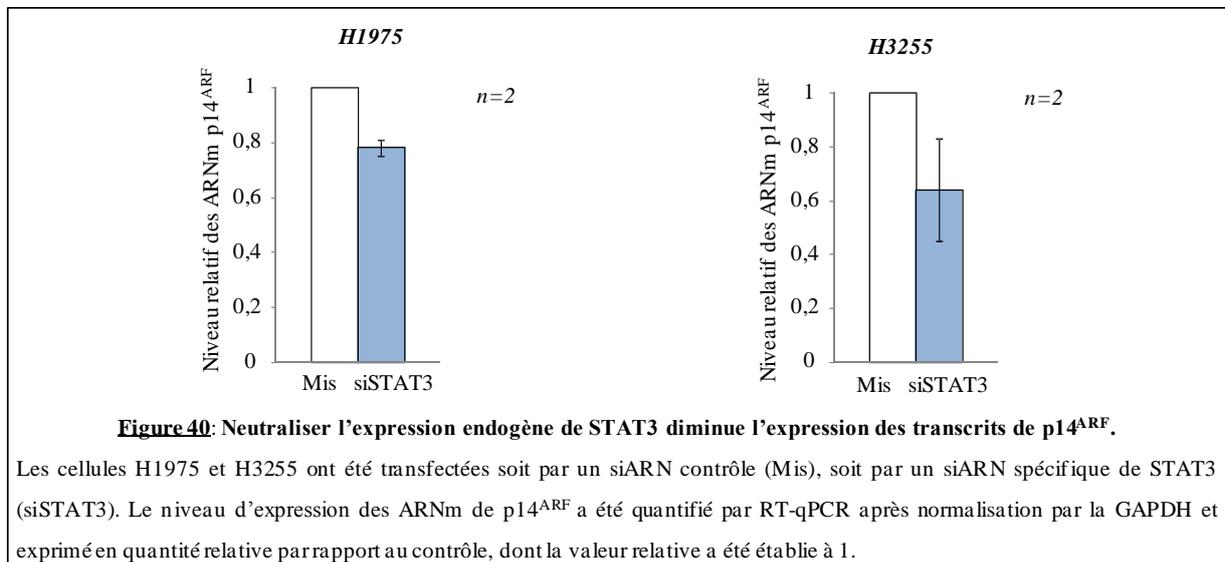
Ces données laissent suggérer l'existence d'une boucle de rétrocontrôle positif entre p14^{ARF} et STAT3, et nous ont amenées à postuler que p14^{ARF} pourrait être une nouvelle cible transcriptionnelle de STAT3.

C.1.1. STAT3 stimule l'expression transcriptionnelle de p14^{ARF}

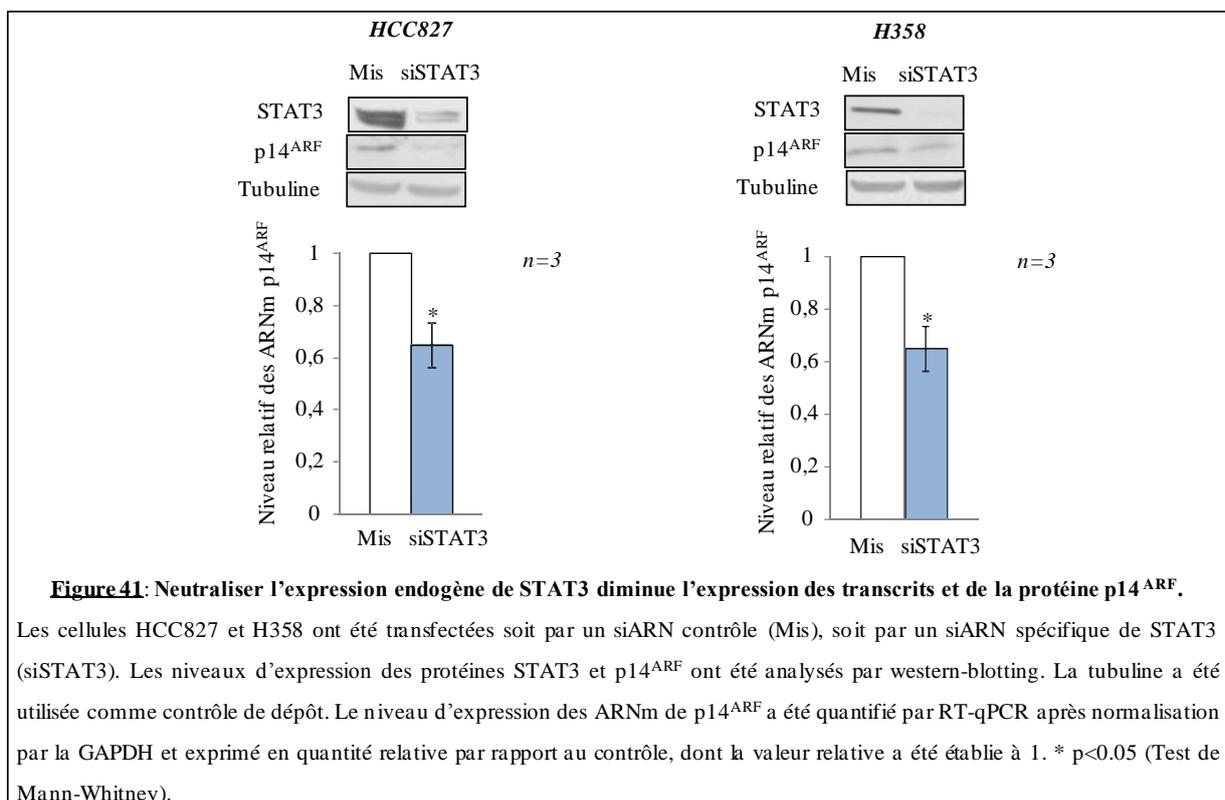
Pour tester notre hypothèse, nous avons dans un premier temps étudié les conséquences de la neutralisation de STAT3 sur l'expression des transcrits et de la protéine p14^{ARF}. Nous avons tout d'abord neutralisé l'expression endogène de STAT3 par des siARN spécifiques dans les lignées H1975 et H3255 exprimant l'EGFR-L858R, et analysé l'expression de la protéine p14^{ARF} par western-blotting. Nous observons une diminution de son expression lorsque STAT3 est neutralisé (**Figure 39**).



Nous avons ensuite analysé l'expression des transcrits de p14^{ARF} par PCR quantitative. Les résultats montrent une diminution modérée du niveau d'expression des ARNm de p14^{ARF}, notamment dans la lignée H1975 (**Figure 40**).



Nous avons également étendu l'étude à d'autres modèles cellulaires d'adénocarcinome pulmonaire, les lignées HCC827 et H358. La neutralisation de l'expression de STAT3 dans ces lignées confirme une diminution de l'expression de la protéine p14^{ARF} qui s'accompagne d'une baisse de l'expression des transcrits de p14^{ARF} (**Figure 41**).

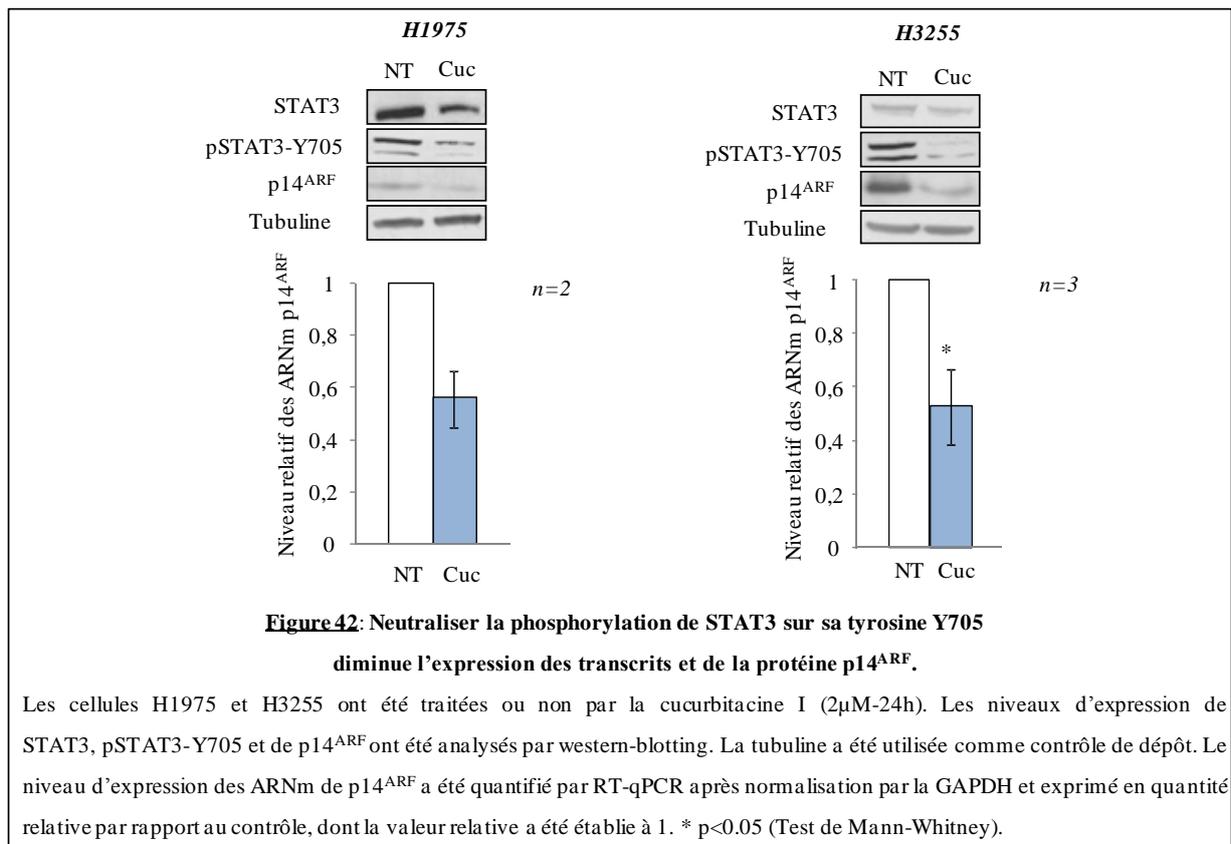


L'ensemble de ces résultats suggère donc fortement que STAT3 contrôle l'expression transcriptionnelle de p14^{ARF}.

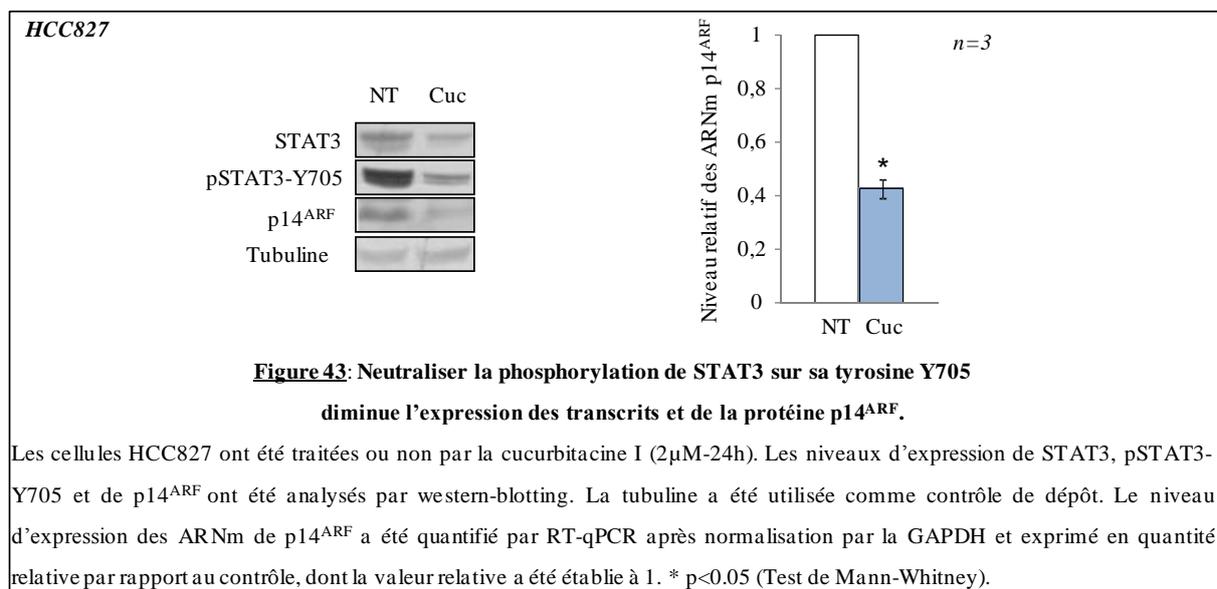
C.1.2. La phosphorylation de STAT3-Y705 est impliquée dans le contrôle de l'expression des transcrits et de la protéine p14^{ARF}

L'activité transcriptionnelle de STAT3 implique sa phosphorylation sur le résidu tyrosine Y705. Nous avons inhibé pSTAT3-Y705 par traitement à la cucurbitacine I et analysé le niveau d'expression des transcrits et de la protéine p14^{ARF}.

Comme nous l'avons déjà observé par western-blotting au cours de la première étude dans les lignées H1975 et H3255 (**Figures 2d, 4e**), la neutralisation de pSTAT3-Y705 inhibe l'expression de la protéine p14^{ARF}. De façon intéressante, nous montrons également une nette diminution de l'expression des ARNm de p14^{ARF} par RT-qPCR (**Figure 42**).



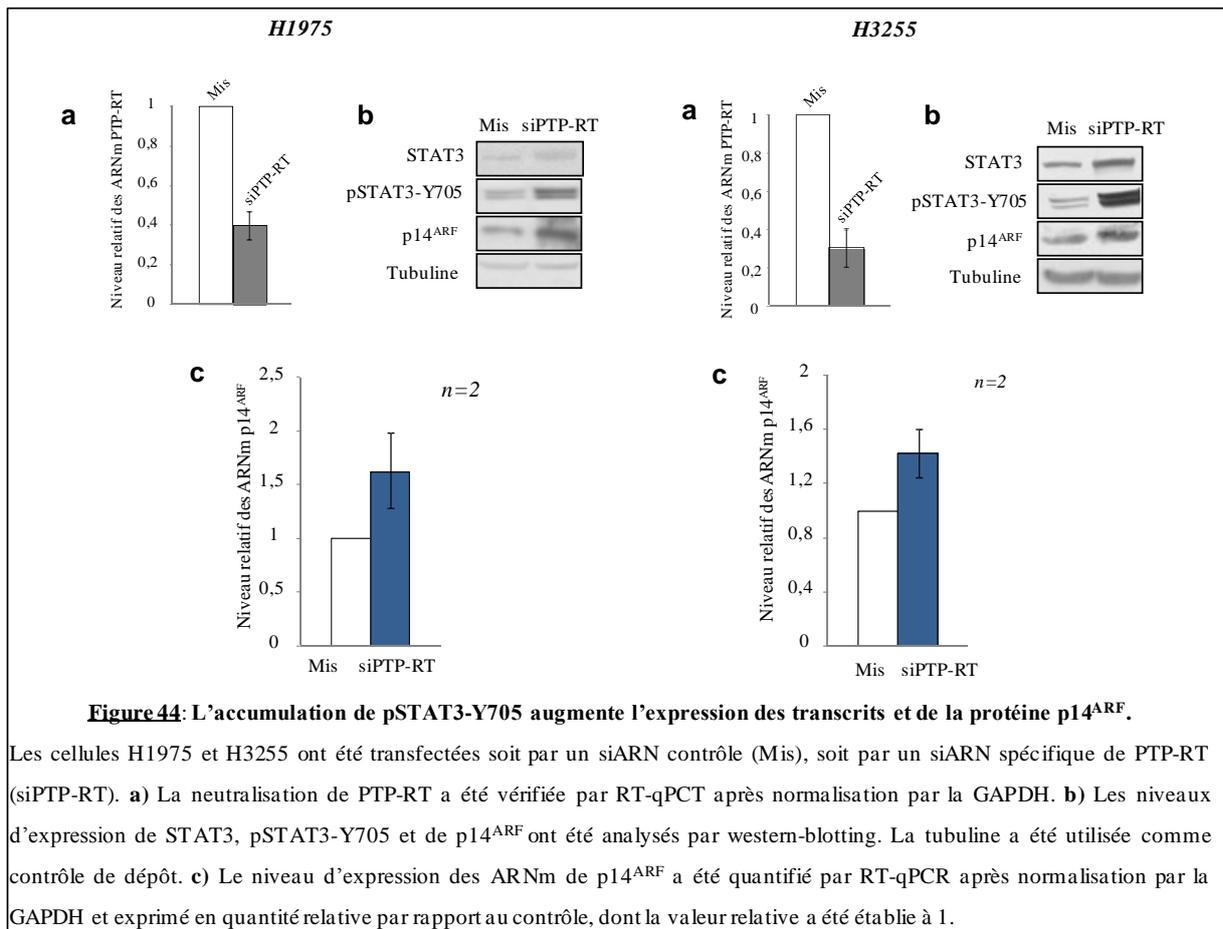
Nous avons également obtenu des résultats dans la lignée HCC827 montrant que le blocage de la phosphorylation de STAT3-Y705 par la cucurbitacine I induit une baisse significative de l'expression des ARNm et de la protéine p14^{ARF} (**Figure 43**). Dans les cellules H358, un résultat préliminaire montre également une diminution de la protéine p14^{ARF} par western-blotting, et les analyses de RT-qPCR sont en cours.



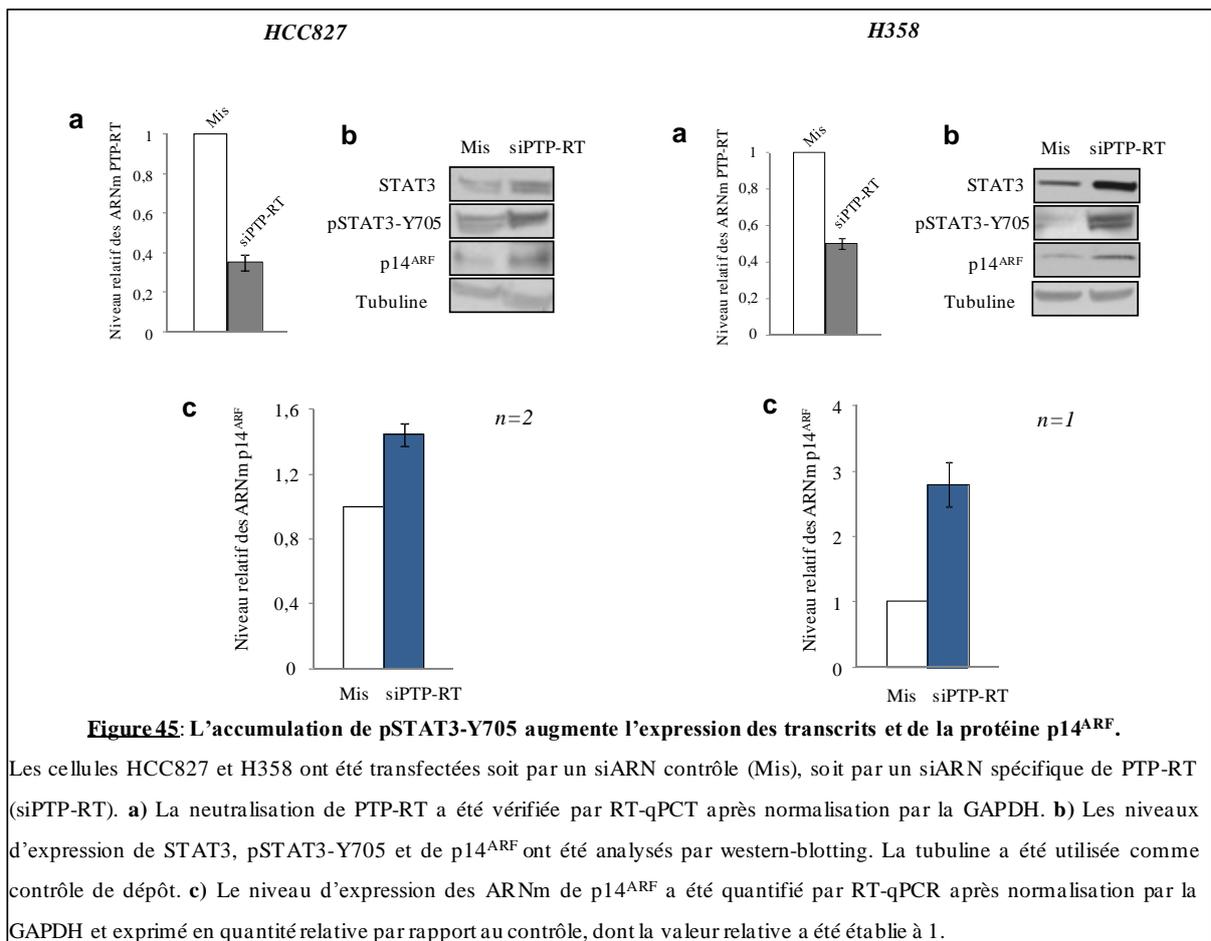
Les résultats semblent démontrer que l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de STAT3 par blocage de sa phosphorylation sur le résidu tyrosine 705 prévient la transcription de p14^{ARF}.

Afin de confirmer les données obtenues par traitement à la cucurbitacine I, nous avons à l'inverse favorisé l'accumulation de pSTAT3-Y705 en neutralisant par siARN l'expression de sa phosphatase nucléaire spécifique, la protéine PTP-RT.

Contrairement à la neutralisation de pSTAT3-Y705 par traitement à la cucurbitacine I, renforcer la phosphorylation de STAT3 sur sa tyrosine Y705 induirait l'expression des transcrits et de la protéine p14^{ARF} dans les cellules H1975 et H3255 (**Figure 44**).



Les mêmes expériences ont été réalisées dans les lignées HCC827 et H358. Là encore, nous avons observé par western-blotting que l'accumulation de pSTAT3-Y705 induit l'expression de la protéine p14^{ARF} dans les deux lignées cellulaires. Les résultats de RT-qPCR montrent également une tendance à l'augmentation des transcrits de p14^{ARF}, en particulier dans la lignée H358 (**Figure 45**).



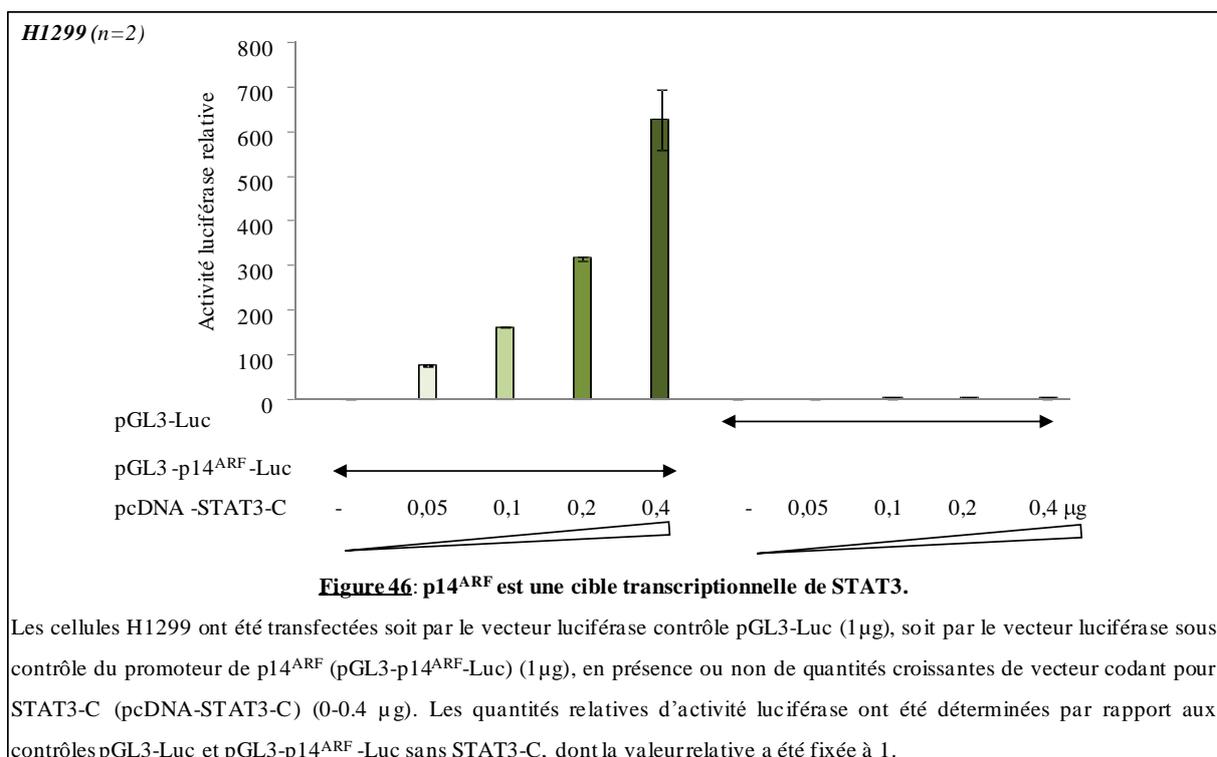
L'ensemble de ces données montre que la phosphorylation de STAT3-Y705 induit l'expression des transcrits et de la protéine de p14^{ARF}.

C.1.3. STAT3 induit la transcription de p14^{ARF}

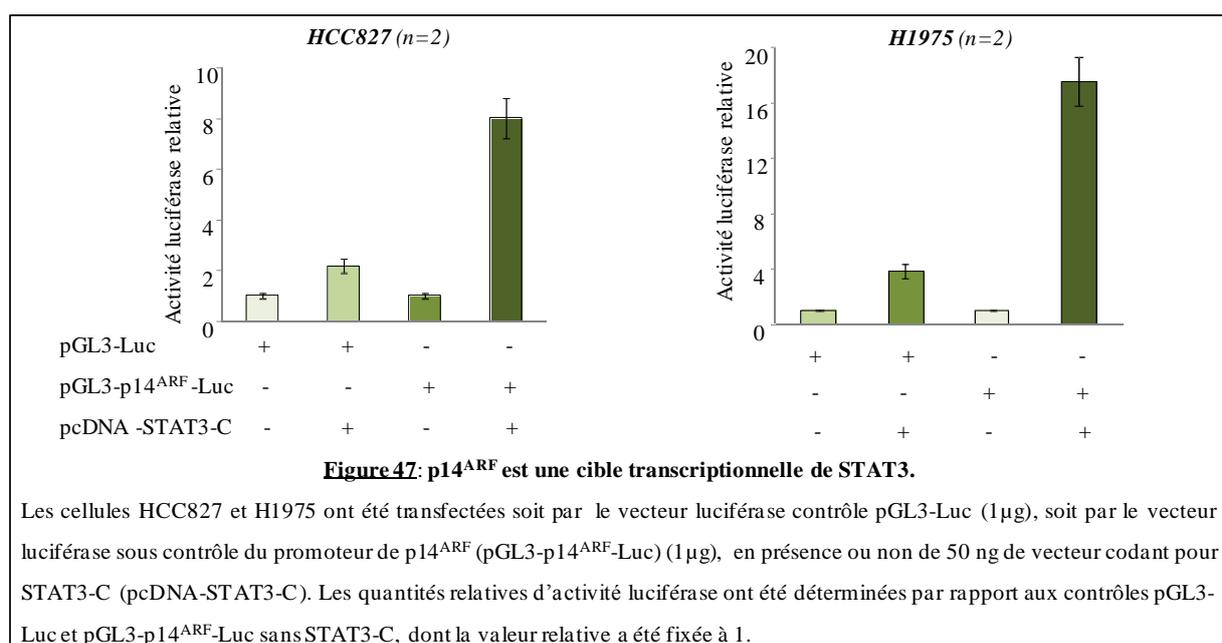
Nos données actuelles en qPCR dans nos quatre lignées cellulaires suggèrent fortement que STAT3 active la transcription de p14^{ARF}.

Pour confirmer ces résultats, nous avons réalisé des tests d'activité luciférase *in vitro*. Pour cela, nous avons co-transfecté des cellules H1299 avec un vecteur luciférase contrôle ou un vecteur contenant le promoteur de p14^{ARF} situé en amont du gène de la luciférase, en présence ou non de quantités croissantes d'un vecteur codant pour STAT3-C, une protéine STAT3 synthétique sur laquelle a été greffé un résidu cystéine en C-terminal. Cette forme est constitutivement dimérisée et peut activer la transcription de gènes cibles de STAT3 (Bromberg J.F. et al., 1999).

Nous avons observé que STAT3-C stimule de façon dose-dépendante l'activité luciférase du vecteur contenant le promoteur de p14^{ARF}, alors que l'activité luciférase du promoteur contrôle n'est pas modulée par les doses croissantes de STAT3-C (**Figure 46**).

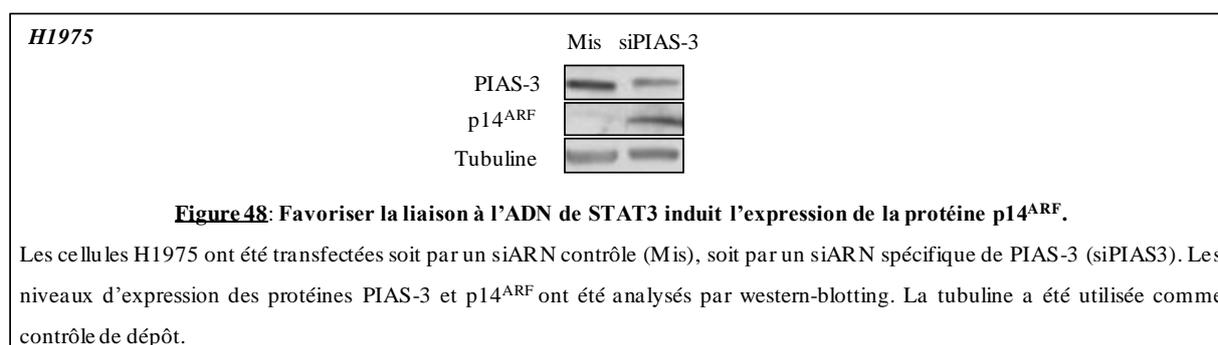


Pour confirmer ces résultats, nous avons réalisé des tests luciférase dans les lignées H1975 et HCC827 avec une quantité fixe de STAT3-C. là encore, nous avons montré dans ces lignées une activation de la transcription du gène luciférase sous le contrôle du promoteur de p14^{ARF} par STAT3-C (**Figure 47**).



La protéine PIAS-3 interagit avec STAT3 (Dabir S. et al., 2009) pour bloquer sa fixation sur l'ADN cible et inhiber son activité transcriptionnelle (Chung C.D. et al., 1997). Nous avons recherché les conséquences de la neutralisation de l'expression de PIAS3 sur l'expression de p14^{ARF} en transfectant des siARN dans les cellules H1975.

Bien que l'expression de PIAS-3 ne soit que partiellement neutralisée, nous avons observé une nette augmentation de l'expression de p14^{ARF} (**Figure 48**). Ce résultat très préliminaire étayerait les données obtenues précédemment en test d'activité luciférase suggérant très fortement une régulation transcriptionnelle de l'expression de p14^{ARF} par STAT3.

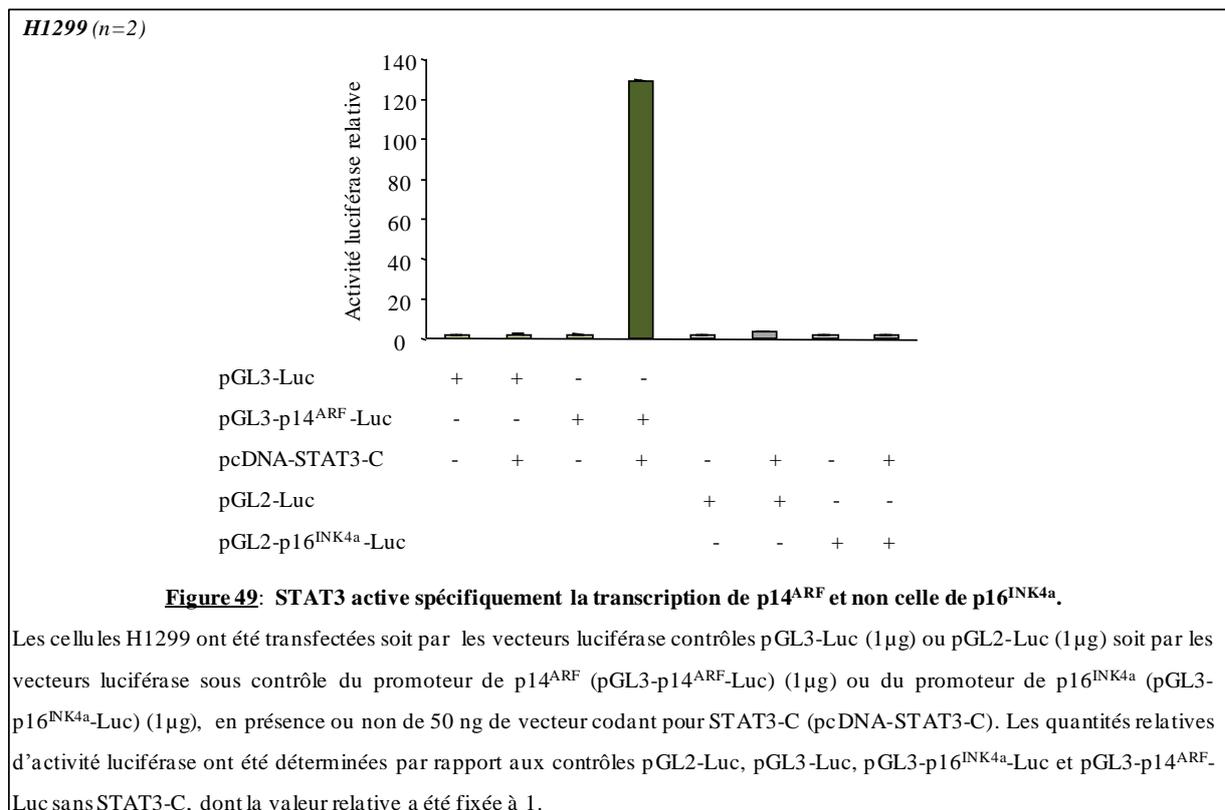


Nous avons donc recherché l'existence de sites de fixation consensus spécifiques de STAT3 TT(N)₄₋₆AA (avec T pour thymine, N pour un nucléotide aléatoire et A pour l'adénine) (Aaronson D.S., 2002) sur le promoteur de p14^{ARF} avec les logiciels « TF search » (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>), « PROMO v.3 » (http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3), « TESS » (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>) et « Match 1.0 » (version publique). Les logiciels « TESS » et « Match 1.0 » n'ont pas permis d'identifier de sites consensus pour STAT3 sur le promoteur de p14^{ARF}. De même, le logiciel « PROMO v.3 » a identifié des sites consensus de fixation sur le promoteur de p14^{ARF} pour STAT1, 4 et 5 mais pas pour STAT3. En revanche, le logiciel « TF search » qui utilise la base de données « TRANSFAC Matrix Table » nous a permis d'identifier un site consensus pour STAT3 qui serait situé entre les bases -655 et -703. Nous envisageons très prochainement de réaliser des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP, chromatin immunoprecipitation) afin de vérifier l'interaction de STAT3 sur le promoteur de p14^{ARF} *in vivo*.

C.1.4. STAT3 ne contrôle pas l'expression de p16^{INK4a}

La régulation transcriptionnelle du locus INK4a/ARF reste assez mal caractérisée. Cependant, les gènes de p16^{INK4a} et de p14^{ARF} possèdent chacun leur propre promoteur suggérant une régulation distincte des deux gènes (Jacobs J.J. et al., 2000; Vonlanthen S. et al., 2001; Carlson H. et al., 2002; Komori H. et al., 2005 ; Kwok W.K. et al., 2007). Nous avons donc voulu savoir si STAT3 régulait spécifiquement la transcription de p14^{ARF}. Pour se faire, nous avons réalisé des tests d'activité luciférase en transfectant les cellules H1299 avec un vecteur contenant le promoteur spécifique de p16^{INK4a} en amont du gène de la luciférase en présence ou non d'une quantité fixe de vecteur codant pour STAT3-C. La construction contenant le promoteur de p14^{ARF} en amont du gène de la luciférase nous a servi de contrôle positif.

Les résultats obtenus ne montrent pas d'activation du construit pGL2-p16^{INK4a}-luciférase par STAT3-C dans les conditions où ce dernier stimule fortement l'expression du vecteur pGL3-p14^{ARF}-luciférase (**Figure 49**).



Ces premières données suggèrent donc que STAT3-C active spécifiquement la transcription de p14^{ARF}.

C.2. Conclusion

Au cours de la première étude (Ozenne P. et al., en révision), nous avons observé l'induction d'une voie pro-apoptotique dépendante de STAT3 suite à l'accumulation de pSTAT3-Y705 par p14^{ARF}. La modulation de l'expression ou de la phosphorylation de STAT3 semblait également modifier l'expression de p14^{ARF}, suggérant l'existence d'une boucle de rétrocontrôle positif entre les deux protéines.

Grâce à cette seconde étude, nous avons décrit p14^{ARF} comme une nouvelle cible transcriptionnelle spécifiquement activée par STAT3. Cette boucle d'activation décrite entre les protéines p14^{ARF} et STAT3 pourrait permettre de maintenir active la voie pro-apoptotique dépendante de STAT3.

Conclusion et Discussion

Nous avons montré que p14^{ARF} contrecarre les effets oncogéniques de l'EGFR muté L858R en activant une voie pro-apoptotique dépendante de STAT3 (Ozenne P. et al., en révision). Par ailleurs, nous avons obtenu des données qui suggèrent fortement que p14^{ARF} soit une nouvelle cible transcriptionnelle activée par STAT3. L'ensemble de ces résultats évoque l'existence d'une boucle de rétrocontrôle positif entre les deux protéines.

D'autre part, nous avons également montré que l'EGFR, qu'il soit muté (L858R ou Del19) ou sauvage, est capable d'inhiber l'expression de p14^{ARF}.

L'ensemble des données obtenues suggère que l'entretien de la voie pro-apoptotique médiée par STAT3 grâce à la boucle de rétrocontrôle positif entre p14^{ARF} et STAT3 constitue un frein important face aux signaux oncogéniques de l'EGFR-L858R. Par conséquent, la mise en place de mécanismes répresseurs de ce rétrocontrôle par les cellules exprimant la mutation L858R apparaît indispensable à leur survie et leur prolifération.

A. TIP60: un interlocuteur de la voie p14^{ARF}/STAT3/Bcl-2

L'histone acétyltransférase TIP60 a été décrite comme co-activateur transcriptionnel de certains facteurs de transcription tels que NF- κ B (Baek S.H. et al., 2002 ; Kim J.H. et al., 2005), E2F-1 (Taubert S. et al., 2004), ou encore c-Myc selon un mécanisme dépendant (Patel J.H. et al., 2004) ou non (Frank S.R. et al., 2003) de l'activité histone acétyltransférase (HAT) de TIP60. Cependant, une particularité de certains membres de la famille MYST, dont TIP60, est leur capacité à réprimer la transcription de certains autres gènes (Gavaravarapu S. & Kamine J., 2000 ; Sharma M. et al., 2000 ; Hlubek F. et al., 2001). L'une des explications justifiant cette fonction est l'interaction avec des co-répresseurs transcriptionnels. Ainsi, il a été montré une coopération singulière entre TIP60 et l'histone déacétylase HDAC7 comme partenaires de la répression de l'activité transcriptionnelle de STAT3 *in vitro*, sans que les fonctions des deux partenaires ne soient clairement identifiées (Xiao H. et al., 2003).

De façon intéressante, nos résultats préliminaires semblent indiquer que TIP60 bloque la phosphorylation de STAT3 sur le résidu tyrosine Y705 (pSTAT3-Y705) et induit l'augmentation de l'expression de Bcl-2. Par ailleurs, nous avons également observé une accumulation de pSTAT3-Y705 suite à la neutralisation de HDAC7. Ces données suggèrent

que, par le biais d'une modulation de pSTAT3-Y705, Tip60 et/ou HDAC7 interviennent dans la régulation de la voie pro-apoptotique p14^{ARF}/STAT3/Bcl-2, mais ils contrôleraient de façon négative la répression transcriptionnelle de Bcl-2 médiée par pSTAT3-Y705 et p14^{ARF}. Si tel est le cas, quel mécanisme exact est mis en jeu ? Dépend-il des activités de TIP60 et HDAC7 ? Quelles seraient les cibles ?

Le mécanisme de répression pourrait mettre en jeu l'activité HAT de TIP60 (**Figure 50**). A ce titre, il est envisageable que TIP60 acétyle directement STAT3. Une étude décrit que STAT3 est acétylé sur son résidu lysine 685 par la HAT CBP/p300 (Yuan Z-L. et al., 2005). Cependant, le lien entre la phosphorylation et l'acétylation de STAT3 demeure relativement mal connu. Il a été décrit qu'un traitement à la trichostatine A (TSA), un inhibiteur des HDAC de classe I et II, augmente l'acétylation de STAT3 mais diminue sa phosphorylation sur le résidu tyrosine 705 (Pang M. et al., 2009). De plus, la structure du cristal de STAT3 révèle que le siège majeur de l'acétylation de STAT3, la lysine 685, est situé à proximité du résidu phosphorylable Y705 (O'Shea J.J. et al., 2005). L'acétylation induirait des changements conformationnels empêchant la phosphorylation de STAT3-Y705 et les deux modifications post-traductionnelles seraient alors mutuellement exclusives (Pang M. et al., 2009). Dans notre contexte, l'acétylation de STAT3 par TIP60 pourrait inhiber sa phosphorylation sur le résidu tyrosine 705. Nous envisageons donc de tester cette hypothèse. Cependant, l'action de TIP60 sur STAT3 pourrait également être indirecte et TIP60 pourrait agir dans ce cas sur des modulateurs de la phosphorylation de STAT3, tels que la protéine phosphatase PTP-RT. Dans ce contexte, l'acétylation de PTP-RT par TIP60 pourrait favoriser son activité phosphatase et induire une baisse de la phosphorylation de STAT3-Y705 (**Figure 50**). Enfin, TIP60 pourrait acétyler p14^{ARF} pour s'opposer à l'accumulation nucléaire de pSTAT3-Y705. Cette hypothèse est cependant peu probable de par l'absence de résidu lysine sur p14^{ARF} (**Figure 50**).

Si TIP60 inhibe l'expression de pSTAT3-Y705, il est vraisemblable que p14^{ARF} réprime les effets délétères de TIP60 sur pSTAT3-Y705. Nous avons constaté que p14^{ARF} ne modifie ni l'expression, ni la localisation sub-cellulaire de TIP60. En revanche, notre équipe a précédemment montré que les deux protéines peuvent interagir (Eymin B. et al., 2006a). Il serait intéressant de rechercher si p14^{ARF} module l'activité HAT de TIP60 (**Figure 50**).

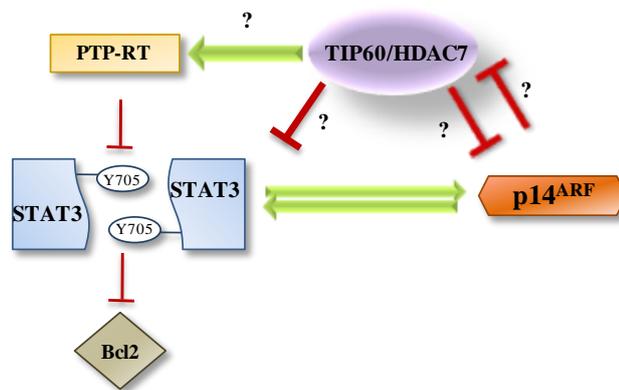


Figure 50: Actions hypothétiques du complexe TIP60/HDAC7 sur la voie pro-apoptotique p14^{ARF}/STAT3/Bcl-2.

La répression de la voie pro-apoptotique p14^{ARF}/STAT3/Bcl-2 pourrait mettre en jeu l'activité HAT de TIP60: sur STAT3 afin d'inhiber sa phosphorylation sur le résidu tyrosine 705; sur PTP-RT afin de stimuler son activité phosphatase envers pSTAT3-Y705; sur p14^{ARF} afin de bloquer l'accumulation de pSTAT3-Y705. En retour, p14^{ARF} pourrait s'opposer à l'effet répressif du complexe TIP60/HDAC7 en inhibant l'activité HAT de TIP60.

B. L'EGFR-L858R contrôle l'expression de p14^{ARF}

Nous avons montré que l'expression transitoire de l'EGFR sauvage, et plus encore, celle des mutants de l'EGFR (L858R ou Del19) inhibe l'expression de la protéine p14^{ARF}. A l'inverse, leur neutralisation permet l'accumulation de p14^{ARF}, probablement par le biais d'une régulation transcriptionnelle. Par ailleurs, nos résultats suggèrent très fortement que STAT3 active la transcription de p14^{ARF}. Compte-tenu de ces données, quels peuvent être les mécanismes impliqués dans le contrôle de l'expression de p14^{ARF} par l'EGFR ? Quel est le rôle de STAT3 dans ce contexte ? Une explication possible pourrait être liée à une localisation et/ou une fonction nucléaire de l'EGFR.

En effet, les récepteurs à activité tyrosine kinase se localisent généralement à la membrane cytoplasmique, mais peuvent dans certains cas, migrer dans le noyau pour exercer leurs fonctions (Carpenter G., 2003). C'est le cas de l'EGFR nucléaire qui a d'abord été identifié dans des hépatocytes en régénération (Kamio T. et al., 1990), puis dans différents tissus et cellules (Lo H-W. & Hung M-C., 2006). L'EGFR nucléaire induirait ainsi l'expression des gènes c-myc (Hanada N. et al., 2006) ou de la cycline D1 (Lin S-Y. et al., 2001) en se fixant notamment sur les promoteurs à des « AT-rich sequences » (ATRS) (Lin S-Y. et al., 2001).

De façon intéressante, il a été montré que l'EGFR pouvait interagir avec STAT3 dans le noyau pour activer la transcription de iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) (Lo H-W. et al., 2005). Par ailleurs, l'expression nucléaire de l'EGFR a été décrite à la fois dans des modèles cellulaires de cancers du poumon et dans des xénogreffes chez la souris comme un important

déterminant de la résistance au cetuximab, un anticorps monoclonal spécifique de l'EGFR (Li C. et al., 2009).

Compte-tenu des données de la littérature et de nos résultats, les questions posées sont donc les suivantes : est-ce que l'EGFR-L858R peut être localisé dans le noyau de nos lignées cellulaires ? Peut-il, par ce biais, contrôler l'activité transcriptionnelle de STAT3 sur p14^{ARF} ?

De façon intéressante, après un fractionnement cellulaire dans la lignée H1975, nous avons détecté la présence du mutant EGFR-L858R sous sa forme totale (EGFR) et activée (pEGFR-Y1068), à la fois dans la fraction cytoplasmique, mais aussi dans la fraction nucléaire (**Figure 51**).

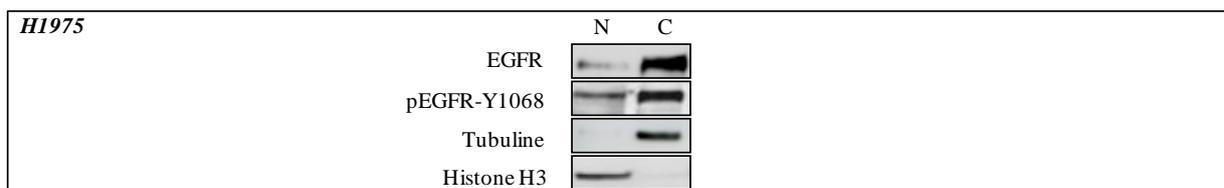


Figure 51: L'EGFR-L858R se localise principalement à la membrane, mais également dans le noyau.

Les cellules H1975 ont été soumises à un fractionnement cyto/noyau dans un tampon hypotonique. Les expressions des protéines EGFR et pEGFR-Y1068 ont été analysées par western-blotting. L'efficacité du fractionnement a été contrôlée par la tubuline (fraction cytoplasmique C) et par l'histone H3 (fraction nucléaire N).

La distribution sub-cellulaire de l'EGFR-L858R a également été observée par microscopie confocale après marquage de l'EGFR ou du pEGFR-Y1068 et du noyau par le DAPI. Les résultats préliminaires montrent que l'EGFR-L858R se localise en membrane, mais également dans le noyau (**Figure 52**). De façon très intéressante, certaines images semblent également montrer une accumulation de l'EGFR-L858R au niveau de l'appareil de Golgi.

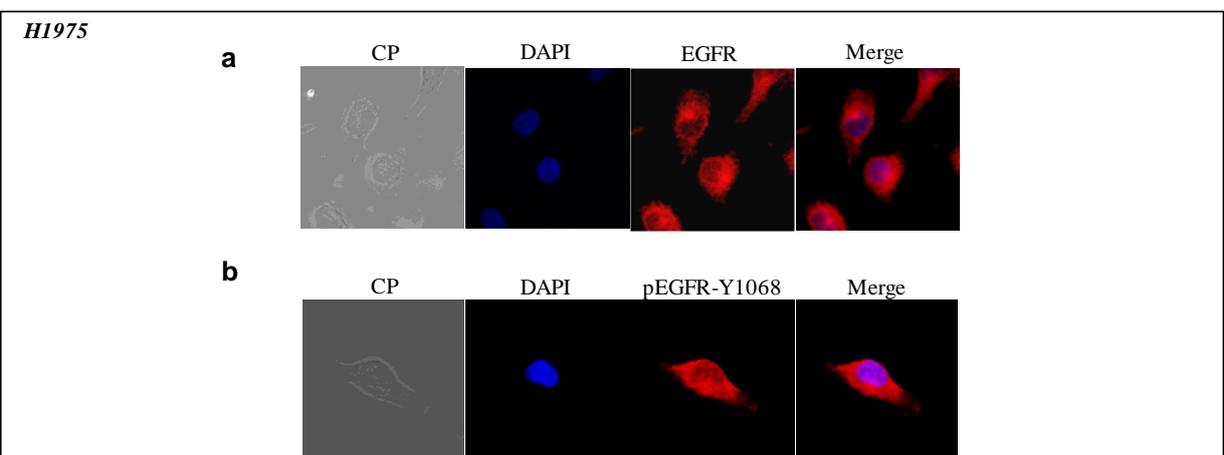


Figure 52: L'EGFR-L858R se localise à la membrane et dans le noyau.

Dans les cellules H1975, l'EGFR-L858R a été marqué soit par un anticorps spécifique de l'EGFR (**a**), soit par un anticorps spécifique de la phosphorylation de l'EGFR sur le résidu tyrosine 1068 (Y1068) (**b**). L'anticorps secondaire est couplé à un fluorochrome Alexa 568. Le noyau a été marqué par le DAPI. (CP, Contraste de phase (LMS510, Zeiss Axiovert 200M)).

Il a récemment été montré que l'EGFR nucléaire fait partie d'un complexe de réparation des dommages de l'ADN et est impliqué dans la régulation de l'activité acétyltransférase de TIP60 (Dittmann K. et al., 2011). Par ailleurs, la phosphorylation de TIP60 sur ses résidus sérine 86 et 90 a été associée à une augmentation de son activité acétyltransférase (Lemercier C. et al., 2002). Compte-tenu de ces données, il est envisageable que l'EGFR-L858R contrôle l'activité du complexe TIP60/HDAC7 (potentiellement par une phosphorylation de TIP60) envers pSTAT3-Y705 et régule par ce biais l'expression de p14^{ARF} (**Figure 53**). Il serait donc intéressant d'étudier la phosphorylation de TIP60 en réponse à l'EGFR-L858R et de rechercher d'éventuelles co-localisations et /ou interactions entre l'EGFR-L858R, TIP60, HDAC7 et STAT3. Nous ne pouvons cependant pas exclure la possibilité que l'EGFR-L858R membranaire contrôle l'expression de p14^{ARF} *via* une signalisation cytoplasmique plus classique qu'il reste à déterminer (**Figure 53**).

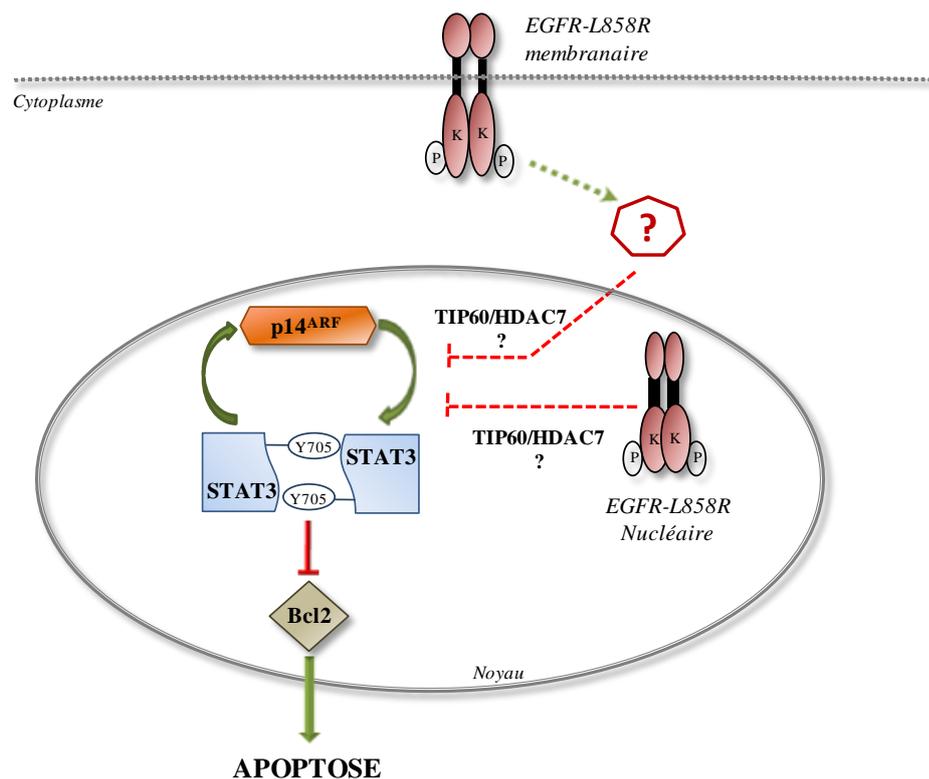


Figure 53: Schéma hypothétique du contrôle de la voie p14^{ARF}/STAT3/Bcl-2 pro-apoptotique par l'EGFR-L858R.

Le contrôle de la voie p14^{ARF}/STAT3/Bcl-2 pro-apoptotique pourrait impliquer un EGFR-L858R nucléaire qui contrôlerait l'activité du complexe TIP60/HDAC7 (*via* une phosphorylation de TIP60 ?) envers pSTAT3-Y705 et régulerait par ce biais l'expression de p14^{ARF}. Cependant, l'EGFR-L858R membranaire pourrait également contrôler cette voie *via* une signalisation cytoplasmique non identifiée et qui pourrait impliquer, ou non, le complexe TIP60/HDAC7.

C. Rôle de p14^{ARF} dans la signalisation oncogénique des EGFR mutés au cours de la carcinogénèse pulmonaire

L'ensemble de nos travaux réalisés sur différentes lignées cellulaires humaines d'adénocarcinome pulmonaire, a permis de confirmer nos hypothèses initiales selon lesquelles la protéine p14^{ARF} constitue un frein majeur au développement des adénocarcinomes pulmonaires exprimant des EGFR mutés (L858R ou Del19) et, par conséquent, que ces tumeurs doivent inhiber fortement l'expression de p14^{ARF} pour survivre et proliférer.

D'autre part, nos résultats ont identifié une fonction originale et très peu connue de STAT3, impliquée dans l'induction de l'apoptose par une répression de l'expression de Bcl-2 (Ozenne P. et al., en révision). Or, dans les cancers et notamment dans les CBNPC, la protéine STAT3 a été très largement décrite comme étant oncogénique (Alvarez J.V. et al., 2005 ; Alvarez J.V. et al., 2006 ; Haura E.B. et al., 2006 ; Akca H. et al., 2006). De plus, il a été fortement suggéré que STAT3 active l'expression de Bcl-2 pour favoriser ses effets anti-apoptotiques (Fukada T. et al., 1996 ; Bhattacharya S. et al., 2005 ; Choi H-J. et al., 2009). Cependant, STAT3 a été aussi décrit pour être nécessaire à l'apoptose dans le mécanisme d'involution des glandes mammaires au cours du développement (Chapman R.S. et al., 1999). Plus récemment, des études réalisées dans des modèles *in vitro* et/ou *in vivo* de glioblastome (de la Iglesia N. et al., 2008), de carcinome hépatocellulaire (Schneller D. et al., 2011) et de cancer intestinal (Musteanu M. et al., 2010) montre un rôle ambivalent de STAT3 pouvant être oncogénique ou à l'inverse « suppresseur de tumeur » selon le stade de développement tumoral (Musteanu M. et al., 2010) ou le profil génétique de la tumeur (de la Iglesia N. et al., 2008).

Au vue de nos résultats, une question majeure se pose : Comment l'EGFR-L858R peut-il contrôler deux voies antagonistes à partir d'un acteur essentiel commun : STAT3 ? Nous émettons l'hypothèse d'une régulation distincte entre la protéine STAT3 dit « oncogénique » du STAT3 « pro-apoptotique » par l'EGFR-L858R, entre le compartiment cytoplasmique et nucléaire.

Différents travaux de la littérature rapportent la présence d'un EGFR dans le noyau de cellules issues de tumeur primaires diverses. De plus, nos résultats préliminaires dans une lignée cellulaire exprimant le mutant L858R de l'EGFR semblent également indiquer la présence du récepteur muté dans le noyau. Les fonctions exactes de l'EGFR nucléaire restent relativement mal connues actuellement, mais certains résultats suggèrent que l'EGFR nucléaire a un impact majeur dans la régulation transcriptionnelle de certains gènes qui pourraient être différents de ceux activés par l'EGFR membranaire possiblement en réponse à différents

stimulus (Lo H-W. & Hung M-C., 2006). De façon très intéressante, il a été montré que STAT3 joue des rôles opposés dans la transformation gliale selon le contexte génétique de la tumeur : contrôlé par PTEN un rôle « suppresseur de tumeur », ou une fonction oncogénique impliquant une interaction de STAT3 avec le variant tronqué de l'EGFR (EGFRvIII) (de la Iglesia N. et al., 2008). Par ailleurs, une étude montre que la production de l'IL-6, favorisée par le récepteur muté L858R, active le récepteur gp130 et induit l'accumulation de pSTAT3-Y705. L'accumulation de pSTAT3-Y705 induit alors la transcription de gènes activateurs de la croissance et la survie cellulaire (Gao S.P. et al., 2007). De plus, les effets anti-apoptotiques de STAT3 peuvent être associés à l'induction de l'expression de Bcl-2 dans un modèle cellulaire activé par l'IL-6 et son récepteur gp130 (Fukada T. et al., 1996). A noter aussi qu'une partie de l'EGFR sauvage nucléaire n'interagirait pas avec STAT3, suggérant que ces deux protéines restent en partie non liées et libre d'établir d'autres interactions pour contrôler l'expression de gènes cibles différents (Lo H-W. et al., 2005). Dans ce cadre, nous suggérons une complémentarité d'actions entre un EGFR-L858R membranaire et un EGFR-L858R nucléaire : l'EGFR-L858R membranaire pourrait induire la prolifération et la survie cellulaire *via* une voie IL-6/gp130/STAT3 et l'EGFR-L858R nucléaire pourrait s'opposer à l'induction de la voie pro-apoptotique p14^{ARF}/STAT3/Bcl-2 en collaboration avec le complexe TIP60/HDAC7 (**Figure 54**). Dans ce modèle hypothétique, cela aboutirait à un déséquilibre de l'homéostasie en faveur de la survie et de la croissance cellulaire.

Afin de tester cette hypothèse et de confirmer *in vivo* les résultats obtenus *in vitro*, nous envisageons d'étudier le statut de p14^{ARF} dans des modèles de souris transgéniques qui expriment la mutation L858R de l'EGFR après induction par la doxycycline administrée par voie orale (Politi K. et al., 2006). Ces souris développent des adénocarcinomes pulmonaires possédant les caractéristiques développementales et moléculaires des adénocarcinomes pulmonaires humains. Ces modèles murins pourraient permettre de déterminer à quel stade survient la perte de l'expression de p14^{ARF} dans les adénocarcinomes pulmonaires exprimant la mutation L858R de l'EGFR, et de vérifier si cela corrèle avec d'autres modifications moléculaires clés telles que l'augmentation de l'expression de Bcl-2 ou une localisation nucléaire de l'EGFR. Par ailleurs, il a récemment été montré que la perte de l'expression de STAT3 dans les stades tardifs du développement des cancers intestinaux corrèle avec la perte d'expression d'une protéine suppresseur de tumeur CEACAM1 et à l'apparition d'un phénotype invasif (Musteanu M. et al., 2010). Les modèles de souris transgéniques d'Harold Varmus permettraient également de déterminer si la diminution de l'expression de p14^{ARF} par

l'EGFR-L858R corrèle avec une baisse de l'expression de pSTAT3-Y705 et à un phénotype plus agressifs des tumeurs.

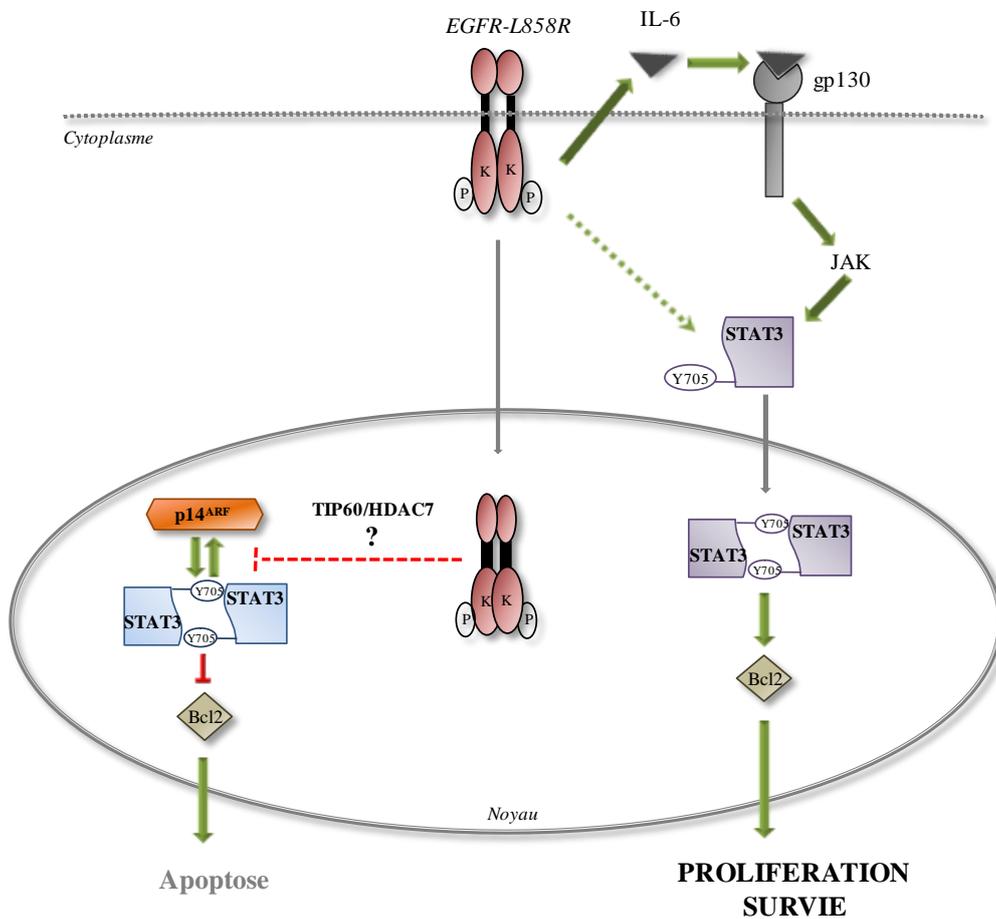


Figure 54: Schéma hypothétique du contrôle différentiel de la voie IL-6/gp130/STAT3 oncogénique et de la voie p14^{ARF}/STAT3/Bcl-2 pro-apoptotique par l'EGFR-L858R.

L'EGFR-L858R membranaire pourrait favoriser les signaux de survie et de prolifération en activant notamment la voie IL-6/gp130/STAT3 tandis que l'EGFR-L858R nucléaire pourrait inhiber la voie pro-apoptotique p14^{ARF}/STAT3/Bcl-2 via un complexe répresseur TIP60/HDAC7.

D. Réactivation de la voie pro-apoptotique dépendante de STAT3 : vers de nouvelles combinaisons thérapeutiques ?

De façon très intéressante, nous avons mis en évidence l'existence de la voie pro-apoptotique p14^{ARF}/STAT3/Bcl-2 à la fois dans des cellules mutées L858R sensibles aux EGFR-TKI (H3255), mais aussi dans des cellules exprimant la mutation T790M de résistance aux EGFR-TKI (H1975). Dans les deux lignées, la boucle de rétrocontrôle positif entre STAT3 et p14^{ARF} nécessaire à l'activité de cette voie pro-apoptotique est cependant fortement inhibée par le mutant L858R-EGFR. Nous émettons l'hypothèse que la réactivation de cette voie pourrait sensibiliser les cellules aux traitements actuellement utilisés en clinique pour le traitement des ADC pulmonaires (gefitinib et erlotinib), notamment celles exprimant la mutation de résistance T790M. L'échappement à l'apoptose est un des mécanismes majeurs utilisé par les cellules tumorales pour survivre. De ce fait, des inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques ont été développés comme l'ABT-737, un mimétique des protéines BH3, qui cible principalement les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL (van Delft M.F. et al., 2006). Il a récemment été montré que l'expression de la protéine pro-apoptotique Bim est un marqueur et un acteur essentiel dans la réponse au gefitinib, même dans les cellules exprimant des mutations de résistance telles que la substitution T790M (Li Z. et al., 2011). De façon intéressante, le gefitinib et l'ABT-737 semblent agir de façon synergique pour induire l'apoptose des cellules, y compris celles exprimant la mutation de résistance T790M (Cragg M.S. et al., 2007 ; Gong Y. et al., 2007). Cependant, cet effet est beaucoup plus modeste dans ces lignées.

Nous avons donc étudié dans la lignée H1975 doublement mutée L858R/T790M, les effets d'une combinaison du gefitinib et de l'ABT-737 avec des siPTP-RT permettant la réactivation de la voie pro-apoptotique dépendante de STAT3. Nous avons obtenu des résultats très préliminaires qui semblent indiquer une nette augmentation du pourcentage de cellules en apoptose suite à la triple combinaison gefitinib/ABT-737/siPTP-RT par rapport aux traitements individuels ou à la combinaison gefitinib/ABT-737 (**Figure 55**). Ces données seront à confirmer, mais sont déjà encourageantes.

H1975

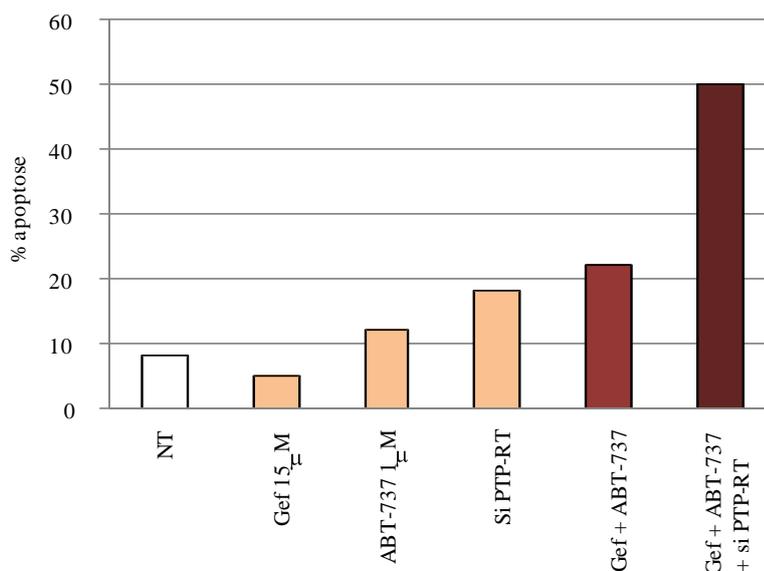


Figure 55: Apoptose après traitements individuels ou combinés de gefitinib, d'ABT-737 et/ou de siPTP-RT.

Les cellules H1975 ont été transfectées traitées ou non (NT) par le gefitinib (Gef, 15 μ M), l'ABT-737 (1 μ M) ou transfectées par des siARN spécifiques de la protéine phosphatase PTP-RT (siPTP-RT). Les combinaisons gefitinib/ABT-737 et gefitinib/ABT-737/siPTP-RT ont également été réalisées. Aux termes de 72h d'incubation, l'apoptose des cellules a été analysée par marquage de la caspase 3 active au FACS et exprimée en pourcentage.

Le modèle murin d'Harold Varmus dans lequel sont induits des adénocarcinomes pulmonaires exprimant la mutation L858R-EGFR, développent des mutations de résistance telle que la mutation T790M, suite à un traitement prolongé à l'erlotinib (Politi K. et al., 2010). Ces modèles seraient une fois encore très intéressants pour tester si la réactivation de la voie pro-apoptotique dépendante de STAT3 pourrait permettre de s'affranchir de certains mécanismes de résistance mise en place par la cellule face aux EGFR-TKI. Actuellement, il est peu envisageable de réactiver cette voie par le biais de siARN dirigés contre la protéine phosphatase PTP-RT ou par thérapie génique en introduisant le gène de p14^{ARF} en clinique. Cependant, nous espérons que nos études moléculaires pourront permettre l'élaboration de combinaisons thérapeutiques alternatives pour le traitement des adénocarcinomes pulmonaires exprimant un EGFR muté.

Nos résultats préliminaires suggèrent que l'accumulation de pSTAT3-Y705 concorde également avec l'induction de l'apoptose dans les lignées humaines d'adénocarcinome pulmonaire exprimant cette fois l'EGFR-Del19 ou l'EGFR sauvage. Nous nous interrogeons donc sur l'existence de la voie pro-apoptotique p14^{ARF}/STAT3/Bcl-2 dans d'autres modèles cellulaires d'adénocarcinome pulmonaire et sur la possibilité que la réactivation de cette voie constitue un nouveau moyen de lever les mécanismes de résistance mis en place par la cellule dans ce type de cancer.

Bibliographie

A

- Aaronson, D. S. and C. M. Horvath (2002). "A road map for those who don't know JAK-STAT." Science **296**(5573): 1653-1655.
- Akca, H., M. Tani, et al. (2006). "Activation of the AKT and STAT3 pathways and prolonged survival by a mutant EGFR in human lung cancer cells." Lung Cancer **54**(1): 25-33.
- Alvarez, J. V., P. G. Febbo, et al. (2005). "Identification of a genetic signature of activated signal transducer and activator of transcription 3 in human tumors." Cancer Res **65**(12): 5054-5062.
- Alvarez, J. V., H. Greulich, et al. (2006). "Signal transducer and activator of transcription 3 is required for the oncogenic effects of non-small-cell lung cancer-associated mutations of the epidermal growth factor receptor." Cancer Res **66**(6): 3162-3168.
- Amann, J., S. Kalyankrishna, et al. (2005). "Aberrant epidermal growth factor receptor signaling and enhanced sensitivity to EGFR inhibitors in lung cancer." Cancer Res **65**(1): 226-235.
- Ameyar-Zazoua, M., M. B. Wisniewska, et al. (2005). "AP-1 dimers regulate transcription of the p14/p19ARF tumor suppressor gene." Oncogene **24**(14): 2298-2306.
- Aouba, A., B. Terrier, et al. (2007). "Treatment of profound anemia with erythropoietin and steroids in a patient with X-linked chronic granulomatous disease associated with MacLeod erythrocyte phenotype." Am J Hematol **82**(8): 773-774.
- Apostolopoulou, K., I. S. Pateras, et al. (2007). "Gene amplification is a relatively frequent event leading to ZBTB7A (Pokemon) overexpression in non-small cell lung cancer." J Pathol **213**(3): 294-302.
- Arora, T., B. Liu, et al. (2003). "PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4." J Biol Chem **278**(24): 21327-21330.
- Aslanian, A., P. J. Iaquina, et al. (2004). "Repression of the Arf tumor suppressor by E2F3 is required for normal cell cycle kinetics." Genes Dev **18**(12): 1413-1422.
- Aviel-Ronen, S., B. P. Coe, et al. (2008). "Genomic markers for malignant progression in pulmonary adenocarcinoma with bronchioloalveolar features." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(29): 10155-10160.
- Ayrault, O., L. Karayan, et al. (2003). "Delineation of the domains required for physical and functional interaction of p14ARF with human topoisomerase I." Oncogene **22**(13): 1945-1954.
- Ayrault, O., L. Andrique, et al. (2004). "Human Arf tumor suppressor specifically interacts with chromatin containing the promoter of rRNA genes." Oncogene **23**(49): 8097-8104.
- Azim, H. A., Jr. and A. K. Ganti (2006). "Targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): where do we stand?" Cancer Treat Rev **32**(8): 630-636.

B

- Badal, V., S. Menendez, et al. (2008). "Regulation of the p14ARF promoter by DNA methylation." Cell Cycle **7**(1): 112-119.
- Bhattacharya, S., R. M. Ray, et al. (2005). "STAT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-1 and c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells." Biochem J **392**(Pt 2): 335-344.
- Baek, S. H., K. A. Ohgi, et al. (2002). "Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein." Cell **110**(1): 55-67.
- Balaburski, G. M., R. D. Hontz, et al. (2010). "p53 and ARF: unexpected players in autophagy." Trends Cell Biol **20**(6): 363-369.
- Balak, M. N., Y. Gong, et al. (2006). "Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors." Clin Cancer Res **12**(21): 6494-6501.
- Bandyopadhyay, K., C. Lee, et al. (2007). "Serine phosphorylation-dependent coregulation of topoisomerase I by the p14ARF tumor suppressor." Biochemistry **46**(49): 14325-14334.
- Bandyopadhyay, K. and R. A. Gjerset (2011). "Protein kinase CK2 is a central regulator of topoisomerase I hyperphosphorylation and camptothecin sensitivity in cancer cell lines." Biochemistry **50**(5): 704-714.
- Bao, J., I. Alroy, et al. (2000). "Threonine phosphorylation diverts internalized epidermal growth factor receptors from a degradative pathway to the recycling endosome." J Biol Chem **275**(34): 26178-26186.
- Barker, A. J., K. H. Gibson, et al. (2001). "Studies leading to the identification of ZD1839 (IRESSA): an orally active, selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor targeted to the treatment of cancer." Bioorg Med Chem Lett **11**(14): 1911-1914.
- Bean, J., C. Brennan, 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): 20932-20937.
- Bean, J., G. J. Riely, et al. (2008). "Acquired resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors associated with a novel T854A mutation in a patient with EGFR-mutant lung adenocarcinoma." Clin Cancer Res **14**(22): 7519-7525.
- Beasley, M. B., E. Brambilla, et al. (2005). "The 2004 World Health Organization classification of lung tumors." Semin Roentgenol **40**(2): 90-97.
- Beau-Faller, M., A.M. Ruppert, et al. (2008). "MET gene copy number in non-small cell lung cancer: molecular analysis in a targeted tyrosine kinase inhibitor naïve cohort." J Thorac Oncol. **3**(4): 331-9.
- Beerli, R. R. and N. E. Hynes (1996). "Epidermal growth factor-related peptides activate distinct subsets of ErbB receptors and differ in their biological activities." J Biol Chem **271**(11): 6071-6076.
- Bell, D. W., T. J. Lynch, et al. (2005). "Epidermal growth factor receptor mutations and gene amplification in non-small-cell lung cancer: molecular analysis of the IDEAL/INTACT gefitinib trials." J Clin Oncol **23**(31): 8081-8092.

- Berkovich, E., Y. Lamed, et al. (2003). "E2F and Ras synergize in transcriptionally activating p14ARF expression." Cell Cycle **2**(2):127-33.
- Bertwistle, D., M. Sugimoto, et al. (2004). "Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23." Mol Cell Biol **24**(3): 985-996.
- Bianco, R., I. Shin, et al. (2003). "Loss of PTEN/MMAC1/TEP in EGF receptor-expressing tumor cells counteracts the antitumor action of EGFR tyrosine kinase inhibitors." Oncogene **22**(18): 2812-2822.
- Boffetta, P. (2004). "Epidemiology of environmental and occupational cancer." Oncogene **23**(38): 6392-6403.
- Bonner, J. A., P. M. Harari, et al. (2006). "Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck." N Engl J Med **354**(6): 567-578.
- Bouchard, C., S. Lee, et al. (2007). "FoxO transcription factors suppress Myc-driven lymphomagenesis via direct activation of Arf." Genes Dev **21**(21): 2775-2787.
- Brambilla, E., W. D. Travis, et al. (2001). "The new World Health Organization classification of lung tumours." Eur Respir J **18**(6): 1059-1068.
- Brambilla, E. and A. Gazdar (2009). "Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies." Eur Respir J **33**(6): 1485-1497.
- Bromberg, J. F., M. H. Wrzeszczynska, et al. (1999). "Stat3 as an oncogene." Cell **98**(3): 295-303.
- Brummelkamp, T. R., R. M. Kortlever, et al. (2002). "TBX-3, the gene mutated in Ulnar-Mammary Syndrome, is a negative regulator of p19ARF and inhibits senescence." J Biol Chem **277**(8): 6567-6572.
- Buttitta, F., F. Barassi, et al. (2006). "Mutational analysis of the HER2 gene in lung tumors from Caucasian patients: mutations are mainly present in adenocarcinomas with bronchioloalveolar features." Int J Cancer **119**(11): 2586-2591.

C

- Cappuzzo, F., V. Gregorc, et al. (2003). "Gefitinib in pretreated non-small-cell lung cancer (NSCLC): analysis of efficacy and correlation with HER2 and epidermal growth factor receptor expression in locally advanced or metastatic NSCLC." J Clin Oncol **21**(14): 2658-2663.
- Cappuzzo, F., F. R. Hirsch, et al. (2005). "Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer." J Natl Cancer Inst **97**(9): 643-655.
- Carey, K. D., A. J. Garton, et al. (2006). "Kinetic analysis of epidermal growth factor receptor somatic mutant proteins shows increased sensitivity to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib." Cancer Res **66**(16): 8163-8171.
- Carpenter, G. (1987). "Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens." Annu Rev Biochem **56**: 881-914.
- Carpenter, C. L., K. R. Auger, et al. (1993). "Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit." J Biol Chem **268**(13): 9478-9483.

- Carpenter, G. (2003). "Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases." Curr Opin Cell Biol **15**(2): 143-148.
- Carr-Wilkinson, J., K. O'Toole, et al. (2010). "High Frequency of p53/MDM2/p14ARF Pathway Abnormalities in Relapsed Neuroblastoma." Clin Cancer Res **16**(4): 1108-1118.
- Carrozza, M. J., R. T. Utley, et al. (2003). "The diverse functions of histone acetyltransferase complexes." Trends Genet **19**(6): 321-329.
- Castagnino, P., Z. Biesova, et al. (1995). "Direct binding of eps8 to the juxtamembrane domain of EGFR is phosphotyrosine- and SH2-independent." Oncogene **10**(4): 723-729.
- Chang, S., B. D. Young, et al. (2006). "Histone deacetylase 7 maintains vascular integrity by repressing matrix metalloproteinase 10." Cell **126**(2): 321-334.
- Chapman, R. S., P. C. Lourenco, et al. (1999). "Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3." Genes Dev **13**(19): 2604-2616.
- Chen, D., N. Kon, et al. (2005). "ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor." Cell **121**(7): 1071-1083.
- Chen, L. and J. Chen (2003). "MDM2-ARF complex regulates p53 sumoylation." Oncogene **22**(34): 5348-5357.
- Chen, X., L. F. Barton, et al. (2007). "Ubiquitin-independent degradation of cell-cycle inhibitors by the REGgamma proteasome." Mol Cell **26**(6): 843-852.
- Chiang, T. A., P. F. Wu, et al. (1999). "Identification of carcinogens in cooking oil fumes." Environ Res **81**(1): 18-22.
- Choi, H. J., J. H. Lee, et al. (2009). "STAT3 is involved in phosphatidic acid-induced Bcl-2 expression in HeLa cells." Exp Mol Med **41**(2): 94-101.
- Chung, B. M., M. Dimri, et al. (2009). "The role of cooperativity with Src in oncogenic transformation mediated by non-small cell lung cancer-associated EGF receptor mutants." Oncogene **28**(16): 1821-1832.
- Chung, C. D., J. Liao, et al. (1997). "Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3." Science **278**(5344): 1803-1805.
- Chung, J. H., J. K. Rho, et al. (2011). "Clinical and molecular evidences of epithelial to mesenchymal transition in acquired resistance to EGFR-TKIs." Lung Cancer **73**(2): 176-182.
- Citri, A. and Y. Yarden (2006). "EGF-ERBB signalling: towards the systems level." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(7): 505-516.
- Col, E., C. Caron, et al. (2005). "HIV-1 Tat targets Tip60 to impair the apoptotic cell response to genotoxic stresses." EMBO J **24**(14): 2634-2645.
- Colombo, E., P. Martinelli, et al. (2006). "Delocalization and destabilization of the Arf tumor suppressor by the leukemia-associated NPM mutant." Cancer Res **66**(6): 3044-3050.

Costa, D. B., S. T. Schumer, et al. (2008). "Differential responses to erlotinib in epidermal growth factor receptor (EGFR)-mutated lung cancers with acquired resistance to gefitinib carrying the L747S or T790M secondary mutations." J Clin Oncol **26**(7): 1182-1184; author reply 1184-1186.

Cragg, M. S., J. Kuroda, et al. (2007). "Gefitinib-induced killing of NSCLC cell lines expressing mutant EGFR requires BIM and can be enhanced by BH3 mimetics." PLoS Med **4**(10): 1681-1689; discussion 1690.

Croce, C. M., G. Sozzi, et al. (1999). "Role of FHIT in human cancer." J Clin Oncol **17**(5): 1618-1624.

D

D'Angelo, S. P., M. C. Pietanza, et al. (2011). "Incidence of EGFR exon 19 deletions and L858R in tumor specimens from men and cigarette smokers with lung adenocarcinomas." J Clin Oncol **29**(15): 2066-2070.

Dabir, S., A. Kluge, et al. (2009). "The association and nuclear translocation of the PIAS3-STAT3 complex is ligand and time dependent." Mol Cancer Res **7**(11): 1854-1860.

Damalas, A., G. Velimezi, et al. (2011). "Loss of p14(ARF) confers resistance to heat shock- and oxidative stress-mediated cell death by upregulating beta-catenin." Int J Cancer **128**(8): 1989-1995.

Darnell, J. E., Jr. (1997). "STATs and gene regulation." Science **277**(5332): 1630-1635.

Datta, A., A. Nag, et al. (2004). "Myc-ARF (alternate reading frame) interaction inhibits the functions of Myc." J Biol Chem **279**(35): 36698-36707.

Datta, A., J. Sen, et al. (2005). "ARF directly binds DP1: interaction with DP1 coincides with the G1 arrest function of ARF." Mol Cell Biol **25**(18): 8024-8036.

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

David, M., L. Wong, et al. (1996). "STAT activation by epidermal growth factor (EGF) and amphiregulin. Requirement for the EGF receptor kinase but not for tyrosine phosphorylation sites or JAK1." J Biol Chem **271**(16): 9185-9188.

Davies, H., G. R. Bignell, et al. (2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer." Nature **417**(6892): 949-954.

del Arroyo, A. G., S. El Messaoudi, et al. (2007). "E2F-dependent induction of p14ARF during cell cycle re-entry in human T cells." Cell Cycle **6**(21): 2697-2705.

de la Iglesia, N., G. Konopka, et al. (2008). "Identification of a PTEN-regulated STAT3 brain tumor suppressor pathway." Genes Dev **22**(4): 449-462.

den Besten, W., M. L. Kuo, et al. (2005). "Myeloid leukemia-associated nucleophosmin mutants perturb p53-dependent and independent activities of the Arf tumor suppressor protein." Cell Cycle **4**(11): 1593-1598.

di Tommaso, A., J. Hagen, et al. (2009). "Residues in the alternative reading frame tumor suppressor that influence its stability and p53-independent activities." Exp Cell Res **315**(7): 1326-1335.

- Dietrich, N., A. P. Bracken, et al. (2007). "Bypass of senescence by the polycomb group protein CBX8 through direct binding to the INK4A-ARF locus." EMBO J **26**(6): 1637-1648.
- Dimri, G. P., K. Itahana, et al. (2000). "Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor." Mol Cell Biol **20**(1): 273-285.
- Ding, L., G. Getz, et al. (2008). "Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma." Nature **455**(7216): 1069-1075.
- Dittmann, K., C. Mayer, et al. (2005). "Inhibition of radiation-induced EGFR nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity." Radiother Oncol **76**(2): 157-161.
- Dittmann, K., C. Mayer, et al. (2008). "Radiation-induced caveolin-1 associated EGFR internalization is linked with nuclear EGFR transport and activation of DNA-PK." Mol Cancer **7**: 69.
- Dittmann, K., C. Mayer, et al. (2011). "Nuclear epidermal growth factor receptor modulates cellular radio-sensitivity by regulation of chromatin access." Radiother Oncol **99**(3): 317-322.
- Do, H., R. Salemi, et al. (2010). "Rarity of AKT1 and AKT3 E17K mutations in squamous cell carcinoma of lung." Cell Cycle **9**(21): 4411-4412.
- Dominguez, G., J. Silva, et al. (2003). "Prevalence of aberrant methylation of p14ARF over p16INK4a in some human primary tumors." Mutat Res **530**(1-2): 9-17.
- Dou, Q. P. and R. H. Goldfarb (2002). "Bortezomib (millennium pharmaceuticals)." IDrugs **5**(8): 828-834.
- Downward, J., Y. Yarden, et al. (1984). "Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences." Nature **307**(5951): 521-527.
- Dressel, U., P. J. Bailey, et al. (2001). "A dynamic role for HDAC7 in MEF2-mediated muscle differentiation." J Biol Chem **276**(20): 17007-17013.
- Du, H., W. Yao, et al. (2011). "ARF triggers cell G1 arrest by a P53 independent ERK pathway." Mol Cell Biochem.

E

- Eberhard, D. A., B. E. Johnson, 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): 5900-5909.
- Engelman, J. A., T. Mukohara, et al. (2006). "Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR-amplified lung cancer." J Clin Invest **116**(10): 2695-2706.
- Engelman, J. A., K. Zejnullahu, et al. (2007). "MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling." Science **316**(5827): 1039-1043.
- Espert, L., I. Dusanter-Fourt, et al. (2005). "[Negative regulation of the JAK/STAT: pathway implication in tumorigenesis]." Bull Cancer **92**(10): 845-857.

- Esteller, M., S. Tortola, et al. (2000). "Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status." Cancer Res **60**(1): 129-133.
- Eymin, B., L. Karayan, et al. (2001). "Human ARF binds E2F1 and inhibits its transcriptional activity." Oncogene **20**(9): 1033-1041.
- Eymin, B., C. Leduc, et al. (2003). "p14ARF induces G2 arrest and apoptosis independently of p53 leading to regression of tumours established in nude mice." Oncogene **22**(12): 1822-1835.
- Eymin, B., P. Claverie, et al. (2006a). "p14ARF activates a Tip60-dependent and p53-independent ATM/ATR/CHK pathway in response to genotoxic stress." Mol Cell Biol **26**(11): 4339-4350.
- Eymin, B., P. Claverie, et al. (2006b). "p14ARF triggers G2 arrest through ERK-mediated Cdc25C phosphorylation, ubiquitination and proteasomal degradation." Cell Cycle **5**(7): 759-765.

F

- Ferguson, K. M. (2008). "Structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation." Annu Rev Biophys **37**: 353-373.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer **127** (12):2893-2917.
- Fernandes, A. M., A. W. Hamburger, et al. (1999). "Production of epidermal growth factor related ligands in tumorigenic and benign human lung epithelial cells." Cancer Lett **142**(1): 55-63.
- Fontanini, G., M. De Laurentiis, et al. (1998). "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 **4**(1): 241-249.
- Forgacs, E., E. J. Biesterveld, et al. (1998). "Mutation analysis of the PTEN/MMAC1 gene in lung cancer." Oncogene **17**(12): 1557-1565.
- Frank, S. R., T. Parisi, et al. (2003). "MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin." EMBO Rep **4**(6): 575-580.
- Frederick, B. A., B. A. Helfrich, et al. (2007). "Epithelial to mesenchymal transition predicts gefitinib resistance in cell lines of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung carcinoma." Mol Cancer Ther **6**(6): 1683-1691.
- Fukada, T., M. Hibi, et al. (1996). "Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis." Immunity **5**(5): 449-460.
- Fukuoka, M., S. Yano, 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): 2237-2246.

G

- Gao, C., Y. Liu, et al. (2010). "Histone deacetylase 7 (HDAC7) regulates myocyte migration and differentiation." Biochim Biophys Acta **1803**(10): 1186-1197.

- Gao, S. P., K. G. Mark, et al. (2007). "Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas." J Clin Invest **117**(12): 3846-3856.
- Garcia, M. A., M. Collado, et al. (2006). "Antiviral action of the tumor suppressor ARF." EMBO J **25**(18): 4284-4292.
- Gatzemeier, U., A. Pluzanska, 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): 1545-1552.
- Gavaravarapu, S. and J. Kamine (2000). "Tip60 inhibits activation of CREB protein by protein kinase A." Biochem Biophys Res Commun **269**(3): 758-766.
- Gazdar, A. F., H. Shigematsu, et al. (2004). "Mutations and addiction to EGFR: the Achilles 'heel' of lung cancers?" Trends Mol Med **10**(10): 481-486.
- Gazzeri, S., E. Brambilla, et al. (1990). "Analysis of the activation of the myc family oncogene and of its stability over time in xenografted human lung carcinomas." Cancer Res **50**(5): 1566-1570.
- Gazzeri, S., V. Della Valle, et al. (1998). "The human p19ARF protein encoded by the beta transcript of the p16INK4a gene is frequently lost in small cell lung cancer." Cancer Res **58**(17): 3926-3931.
- Giaccone, G., R. S. Herbst, 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): 777-784.
- Gil, J. and G. Peters (2006). "Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(9): 667-677.
- Gong, Y., R. Somwar, et al. (2007). "Induction of BIM is essential for apoptosis triggered by EGFR kinase inhibitors in mutant EGFR-dependent lung adenocarcinomas." PLoS Med **4**(10): e294.
- Gow, C. H., J. Y. Shih, et al. (2005). "Acquired gefitinib-resistant mutation of EGFR in a chemonaive lung adenocarcinoma harboring gefitinib-sensitive mutation L858R." PLoS Med **2**(9): e269.
- Greulich, H., T. H. Chen, et al. (2005). "Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutants." PLoS Med **2**(11): e313.
- Grisendi, S., C. Mecucci, et al. (2006). "Nucleophosmin and cancer." Nat Rev Cancer **6**(7): 493-505.
- Gschwind, A., O. M. Fischer, et al. (2004). "The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy." Nat Rev Cancer **4**(5): 361-370.

H

- Haglund, K., N. Shimokawa, et al. (2002). "Cbl-directed monoubiquitination of CIN85 is involved in regulation of ligand-induced degradation of EGF receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(19): 12191-12196.
- Hallberg, B., S. I. Rayter, et al. (1994). "Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation." J Biol Chem **269**(6): 3913-3916.

- Hamburger, A. W., A. Fernandes, et al. (1998). "The role of transforming growth factor alpha production and ErbB-2 overexpression in induction of tumorigenicity of lung epithelial cells." Br J Cancer **77**(7): 1066-1071.
- Han, S. W., T. Y. Kim, et al. (2005a). "Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib." J Clin Oncol **23**(11): 2493-2501.
- Han, S. W., P. G. Hwang, et al. (2005b). "Epidermal growth factor receptor (EGFR) downstream molecules as response predictive markers for gefitinib (Iressa, ZD1839) in chemotherapy-resistant non-small cell lung cancer." Int J Cancer **113**(1): 109-115.
- Han, S. W., T. Y. Kim, 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): 2538-2544.
- Hanada, N., H. W. Lo, et al. (2006). "Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor." Mol Carcinog **45**(1): 10-17.
- Haneda, H., H. Sasaki, et al. (2006). "Epidermal growth factor receptor gene mutation defines distinct subsets among small adenocarcinomas of the lung." Lung Cancer **52**(1): 47-52.
- Haura, E. B., Z. Zheng, et al. (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): 8288-8294.
- He, B., L. You, et al. (2003). "SOCS-3 is frequently silenced by hypermethylation and suppresses cell growth in human lung cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 14133-14138.
- He, C., M. Hobert, et al. (2002). "The epidermal growth factor receptor juxtamembrane domain has multiple basolateral plasma membrane localization determinants, including a dominant signal with a polyproline core." J Biol Chem **277**(41): 38284-38293.
- Hecht, S. S. (2003). "Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer." Nat Rev Cancer **3**(10): 733-744.
- Heisermann, G. J., H. S. Wiley, et al. (1990). "Mutational removal of the Thr669 and Ser671 phosphorylation sites alters substrate specificity and ligand-induced internalization of the epidermal growth factor receptor." J Biol Chem **265**(22): 12820-12827.
- Hemmati, P. G., G. Normand, et al. (2005). "Loss of p21 disrupts p14 ARF-induced G1 cell cycle arrest but augments p14 ARF-induced apoptosis in human carcinoma cells." Oncogene **24**(25): 4114-4128.
- Hemmati, P. G., D. Guner, et al. (2006). "Bak functionally complements for loss of Bax during p14ARF-induced mitochondrial apoptosis in human cancer cells." Oncogene **25**(50): 6582-6594.
- Hemmati, P. G., G. Normand, et al. (2008). "Cooperative effect of p21Cip1/WAF-1 and 14-3-3sigma on cell cycle arrest and apoptosis induction by p14ARF." Oncogene **27**(53): 6707-6719.

- Hemmati, P. G., A. Muer, et al. (2010). "Systematic genetic dissection of p14ARF-mediated mitochondrial cell death signaling reveals a key role for p21CDKN1 and the BH3-only protein Puma/bbc3." J Mol Med (Berl) **88**(6): 609-622.
- Herbst, R. S., G. Giaccone, 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): 785-794.
- Herbst, R. S., J. V. Heymach, et al. (2008). "Lung cancer." N Engl J Med **359**(13): 1367-1380.
- Herbst, R. S., R. Ansari, et al. (2011). "Efficacy of bevacizumab plus erlotinib versus erlotinib alone in advanced non-small-cell lung cancer after failure of standard first-line chemotherapy (BeTa): a double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial." Lancet **377**(9780): 1846-1854.
- Hirano, T., K. Nakajima, et al. (1997). "Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system." Cytokine Growth Factor Rev **8**(4): 241-252.
- Hirano, T., K. Ishihara, et al. (2000). "Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors." Oncogene **19**(21): 2548-2556.
- Hirsch, F. R., M. Varella-Garcia, et al. (2003). "Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis." J Clin Oncol **21**(20): 3798-3807.
- Hirsch, F. R., M. Varella-Garcia, et al. (2007). "Combination of EGFR gene copy number and protein expression predicts outcome for advanced non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib." Ann Oncol **18**(4): 752-760.
- Hlubek, F., C. Lohberg, et al. (2001). "Tip60 is a cell-type-specific transcriptional regulator." J Biochem **129**(4): 635-641.
- Horn, L. and W. Pao (2009). "EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol **27**(26): 4232-4235.
- Hsu, H. S., Y. C. Wang, et al. (2004). "5' cytosine-phospho-guanine island methylation is responsible for p14ARF inactivation and inversely correlates with p53 overexpression in resected non-small cell lung cancer." Clin Cancer Res **10**(14): 4734-4741.
- Hsu, S. C. and M. C. Hung (2007). "Characterization of a novel tripartite nuclear localization sequence in the EGFR family." J Biol Chem **282**(14): 10432-10440.
- Hubbard, S. R. (2004). "Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(6): 464-471.
- Hurbin, A., L. Dubrez, et al. (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): 49127-49133.
- Hurbin, A., M. Wislez, et al. (2011). "Insulin-like growth factor-1 receptor inhibition overcomes gefitinib resistance in mucinous lung adenocarcinoma." J Pathol **225**(1): 83-95.

I

- Ichiba, M., K. Nakajima, et al. (1998). "Autoregulation of the Stat3 gene through cooperation with a cAMP-responsive element-binding protein." J Biol Chem **273**(11): 6132-6138.
- Ihle, J. N., T. Nosaka, et al. (1997). "Jaks and Stats in cytokine signaling." Stem Cells **15 Suppl 1**: 105-111; discussion 112.
- Inamura, K., K. Takeuchi, et al. (2008). "EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers." J Thorac Oncol **3**(1): 13-17.
- Inoue, A., T. Suzuki, et al. (2006). "Prospective phase II study of gefitinib for chemotherapy-naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations." J Clin Oncol **24**(21): 3340-3346.
- Inoue, A., K. Kobayashi, et al. (2009). "First-line gefitinib for patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring epidermal growth factor receptor mutations without indication for chemotherapy." J Clin Oncol **27**(9): 1394-1400.
- Inoue, K., M. F. Roussel, et al. (1999). "Induction of ARF tumor suppressor gene expression and cell cycle arrest by transcription factor DMP1." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3993-3998.
- Inukai, M., S. Toyooka, et al. (2006). "Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer." Cancer Res **66**(16): 7854-7858.
- Irmer, D., J. O. Funk, et al. (2007). "EGFR kinase domain mutations - functional impact and relevance for lung cancer therapy." Oncogene **26**(39): 5693-5701.
- Irvine, M., S. Philipsz, et al. (2010). "Amino terminal hydrophobic import signals target the p14(ARF) tumor suppressor to the mitochondria." Cell Cycle **9**(4): 829-839.
- Ishikawa, N., Y. Daigo, 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): 9176-9184.
- Itahana, K., K. P. Bhat, et al. (2003). "Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation." Mol Cell **12**(5): 1151-1164.
- Itahana, K., Y. Zhang. (2008). "Mitochondrial p32 is a critical mediator of ARF-induced apoptosis". Cancer Cell 2008 **13**(6):542-53.

J

- Jacobs, J. J., K. Kieboom, et al. (1999). "The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus." Nature **397**(6715): 164-168.
- Jacobs, J. J., P. Keblusek, et al. (2000). "Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19(ARF)) and is amplified in a subset of human breast cancers." Nat Genet **26**(3): 291-299.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2010). "Cancer statistics, 2010." CA Cancer J Clin **60**(5): 277-300.

- Jeon, Y. K., S. W. Sung, et al. (2006). "Clinicopathologic features and prognostic implications of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene copy number and protein expression in non-small cell lung cancer." Lung Cancer **54**(3): 387-398.
- Ji, H., D. Li, et al. (2006). "The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and in vivo sensitivity to EGFR-targeted therapies." Cancer Cell **9**(6): 485-495.
- Ji, H., M. R. Ramsey, et al. (2007a). "LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis." Nature **448**(7155): 807-810.
- Ji, H., Z. Wang, et al. (2007b). "Mutations in BRAF and KRAS converge on activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in lung cancer mouse models." Cancer Res **67**(10): 4933-4939.
- Jin, G., M. J. Kim, et al. (2010). "PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers." Lung Cancer **69**(3): 279-283.
- Johnson, D. H. (2000). "Evolution of cisplatin-based chemotherapy in non-small cell lung cancer: a historical perspective and the eastern cooperative oncology group experience." Chest **117**(4 Suppl 1): 133S-137S.
- Jones, P. F., T. Jakubowicz, et al. (1991). "Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(10): 4171-4175.
- Jonker, D. J., C. J. O'Callaghan, et al. (2007). "Cetuximab for the treatment of colorectal cancer." N Engl J Med **357**(20): 2040-2048.
- Jorissen, R. N., F. Walker, et al. (2003). "Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling." Exp Cell Res **284**(1): 31-53.
- Jura, N., N. F. Endres, et al. (2009). "Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment." Cell **137**(7): 1293-1307.

K

- Kabbarah, O. and L. Chin (2006). "Advances in malignant melanoma: genetic insights from mouse and man." Front Biosci **11**: 928-942.
- Kang, S., A. G. Bader, et al. (2005). "Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(3): 802-807.
- Kawagishi, H., H. Nakamura, et al. (2010). "ARF suppresses tumor angiogenesis through translational control of VEGFA mRNA." Cancer Res **70**(11): 4749-4758.
- Kawano, O., H. Sasaki, et al. (2006). "PIK3CA mutation status in Japanese lung cancer patients." Lung Cancer **54**(2): 209-215.
- Kawano, O., H. Sasaki, et al. (2007). "PIK3CA gene amplification in Japanese non-small cell lung cancer." Lung Cancer **58**(1): 159-160.
- Kim, D. H., H. H. Nelson, et al. (2001). "p16(INK4a) and histology-specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer." Cancer Res **61**(8): 3419-3424.

- Kim, E. S., V. Hirsh, et al. (2008). "Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer (INTEREST): a randomised phase III trial." Lancet **372**(9652): 1809-1818.
- Kim, J. H., S. Y. Yoon, et al. (2004). "The Bmi-1 oncoprotein is overexpressed in human colorectal cancer and correlates with the reduced p16INK4a/p14ARF proteins." Cancer Lett **203**(2): 217-224.
- Kim, J. H., B. Kim, et al. (2005). "Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by Tip60 and beta-catenin complexes." Nature **434**(7035): 921-926.
- Kim, J., W. J. Jahng, et al. (2007). "The phosphoinositide kinase PIKfyve mediates epidermal growth factor receptor trafficking to the nucleus." Cancer Res **67**(19): 9229-9237.
- Kim, K. W., L. Moretti, et al. (2009). "Combined Bcl-2/mammalian target of rapamycin inhibition leads to enhanced radiosensitization via induction of apoptosis and autophagy in non-small cell lung tumor xenograft model." Clin Cancer Res **15**(19): 6096-6105.
- Kim, M. S., E. G. Jeong, et al. (2008). "Mutational analysis of oncogenic AKT E17K mutation in common solid cancers and acute leukaemias." Br J Cancer **98**(9): 1533-1535.
- Kim, S. M., J. S. Kim, et al. (2010). "Acquired resistance to cetuximab is mediated by increased PTEN instability and leads cross-resistance to gefitinib in HCC827 NSCLC cells." Cancer Lett **296**(2): 150-159.
- Kim, Y. T., T. Y. Kim, et al. (2008). "Molecular changes of epidermal growth factor receptor (EGFR) and KRAS and their impact on the clinical outcomes in surgically resected adenocarcinoma of the lung." Lung Cancer **59**(1): 111-118.
- Kluge, A., S. Dabir, et al. (2011). "Protein inhibitor of activated STAT3 expression in lung cancer." Mol Oncol **5**(3): 256-264.
- Kobayashi, S., T. J. Boggon, et al. (2005). "EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib." N Engl J Med **352**(8): 786-792.
- Kohno, T., M. Takahashi, et al. (1998). "Inactivation of the PTEN/MMAC1/TEP1 gene in human lung cancers." Genes Chromosomes Cancer **22**(2): 152-156.
- Kohno, T., A. Otsuka, et al. (2010). "A catalog of genes homozygously deleted in human lung cancer and the candidacy of PTPRD as a tumor suppressor gene." Genes Chromosomes Cancer **49**(4): 342-352.
- Komori, H., M. Enomoto, et al. (2005). "Distinct E2F-mediated transcriptional program regulates p14ARF gene expression." EMBO J **24**(21): 3724-3736.
- Konishi, N., M. Nakamura, et al. (2002). "Heterogeneous methylation and deletion patterns of the INK4a/ARF locus within prostate carcinomas." Am J Pathol **160**(4): 1207-1214.
- Kordi-Tamandani, D. M., A. Moazeni-Roodi, et al. (2010). "Analysis of methylation patterns and expression profiles of p14ARF gene in patients with oral squamous cell carcinoma." Int J Biol Markers **25**(2): 99-103.
- Korgaonkar C., L. Zhao, et al. (2002). "ARF function does not require p53 stabilization or Mdm2 relocalization." Mol Cell Biol **22**(1):196-206.

- Kosaka, T., Y. Yatabe, et al. (2004). "Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications." Cancer Res **64**(24): 8919-8923.
- Krewski, D., J. H. Lubin, et al. (2006). "A combined analysis of North American case-control studies of residential radon and lung cancer." J Toxicol Environ Health A **69**(7): 533-597.
- Kris, M. G., R. B. Natale, 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): 2149-2158.
- Kuo, M. L., W. den Besten, et al. (2004). "N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor." Genes Dev **18**(15): 1862-1874.
- Kwak, E. L., R. Sordella, et al. (2005). "Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(21): 7665-7670.
- Kwok, W. K., M. T. Ling, et al. (2007). "Role of p14ARF in TWIST-mediated senescence in prostate epithelial cells." Carcinogenesis **28**(12): 2467-2475.
- Kwong, R. A., L. H. Kalish, et al. (2005). "p14ARF protein expression is a predictor of both relapse and survival in squamous cell carcinoma of the anterior tongue." Clin Cancer Res **11**(11): 4107-4116.

L

- Le Faou, A. L. and O. Scemama (2005). "[Epidemiology of tobacco smoking]." Rev Mal Respir **22**(6 Pt 2): 8S27-32.
- Leaman, D. W., S. Leung, et al. (1996). "Regulation of STAT-dependent pathways by growth factors and cytokines." FASEB J **10**(14): 1578-1588.
- Lee, C., B. A. Smith, et al. (2005). "DNA damage disrupts the p14ARF-B23(nucleophosmin) interaction and triggers a transient subnuclear redistribution of p14ARF." Cancer Res **65**(21): 9834-9842.
- Lee, M., W. Sup Han, et al. (2006). "Prognostic value of p16INK4a and p14ARF gene hypermethylation in human colon cancer." Pathol Res Pract **202**(6): 415-424.
- Lemercier, C., G. Legube, et al. (2003). "Tip60 acetyltransferase activity is controlled by phosphorylation." J Biol Chem **278**(7): 4713-4718.
- Lemmon, M. A., Z. Bu, et al. (1997). "Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer." EMBO J **16**(2): 281-294.
- Lessard, F., F. Morin, et al. (2010). "The ARF tumor suppressor controls ribosome biogenesis by regulating the RNA polymerase I transcription factor TTF-I." Mol Cell **38**(4): 539-550.
- Levy, D. E. and J. E. Darnell, Jr. (2002). "Stats: transcriptional control and biological impact." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(9): 651-662.
- Li, C., M. Iida, et al. (2009). "Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab." Oncogene **28**(43): 3801-3813.
- Li, H. and A. Villalobo (2002). "Evidence for the direct interaction between calmodulin and the human epidermal growth factor receptor." Biochem J **362**(Pt 2): 499-505.

- Li, S., R. Rosell, et al. (1994). "K-ras gene point mutation: a stable tumor marker in non-small cell lung carcinoma." Lung Cancer **11**(1-2): 19-27.
- Li, Z., S. Zhou, et al. (2011). "BIM induction of apoptosis triggered by EGFR-sensitive and resistance cell lines of non-small-cell lung cancer." Med Oncol **28**(2): 572-577.
- Liang, Z., J. Zhang, et al. (2010). "Relationship between EGFR expression, copy number and mutation in lung adenocarcinomas." BMC Cancer **10**: 376.
- Liao, H. J. and G. Carpenter (2009). "Cetuximab/C225-induced intracellular trafficking of epidermal growth factor receptor." Cancer Res **69**(15): 6179-6183.
- Lin, S. Y., K. Makino, et al. (2001). "Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor." Nat Cell Biol **3**(9): 802-808.
- Linggi, B., C. Muller-Tidow, et al. (2002). "The t(8;21) fusion protein, AML1 ETO, specifically represses the transcription of the p14(ARF) tumor suppressor in acute myeloid leukemia." Nat Med **8**(7): 743-750.
- Lipponen, P. and M. Eskelinen (1994). "Expression of epidermal growth factor receptor in bladder cancer as related to established prognostic factors, oncoprotein (c-erbB-2, p53) expression and long-term prognosis." Br J Cancer **69**(6): 1120-1125.
- Liu, B., M. Gross, et al. (2001). "A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif." Proc Natl Acad Sci USA **98**(6):3203-7.
- Liu, P., H. Cheng, et al. (2009). "Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer." Nat Rev Drug Discov **8**(8): 627-644.
- Liu, Z., W. Li, et al. (2010). "CpG island methylator phenotype involving chromosome 3p confers an increased risk of non-small cell lung cancer." J Thorac Oncol **5**(6): 790-797.
- Llanos, S., P.A. Clark, et al. (2001). "Stabilization of p53 by p14ARF without relocation of MDM2 to the nucleolus." Nat Cell Biol **3**(5):445-52.
- Lo, H. W., S. C. Hsu, et al. (2005). "Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway." Cancer Cell **7**(6): 575-589.
- Lo, H. W. and M. C. Hung (2006). "Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival." Br J Cancer **94**(2): 184-188.
- Lubin, H., et al. (1994). National Institute of Health Publication N° 94-3644.
- Ludovini, V., F. Bianconi, et al. (2011). "Phosphoinositide-3-kinase catalytic alpha and KRAS mutations are important predictors of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with advanced non-small cell lung cancer." J Thorac Oncol **6**(4): 707-715.
- Lynch, T. J., D. W. Bell, 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): 2129-2139.

M

- Maeda, T., R. M. Hobbs, et al. (2005). "Role of the proto-oncogene Pokemon in cellular transformation and ARF repression." Nature **433**(7023): 278-285.
- Maehama, T. and J. E. Dixon (1998). "The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate." J Biol Chem **273**(22): 13375-13378.
- Maestro, R., A. P. Dei Tos, et al. (1999). "Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis." Genes Dev **13**(17): 2207-2217.
- Mahalingam, D., A. Mita, et al. (2009). "Targeted therapy for advanced non-small cell lung cancers: historical perspective, current practices, and future development." Curr Probl Cancer **33**(2): 73-111.
- Maiuri, M. C., E. Zalckvar, et al. (2007). "Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(9): 741-752.
- Malanga, D., M. Scrima, et al. (2008). "Activating E17K mutation in the gene encoding the protein kinase AKT1 in a subset of squamous cell carcinoma of the lung." Cell Cycle **7**(5): 665-669.
- Marks, J. L., Y. Gong, et al. (2008). "Novel MEK1 mutation identified by mutational analysis of epidermal growth factor receptor signaling pathway genes in lung adenocarcinoma." Cancer Res **68**(14): 5524-5528.
- Marmor, M. D. and Y. Yarden (2004). "Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor tyrosine kinases." Oncogene **23**(11): 2057-2070.
- Marti, U., C. Ruchti, et al. (2001). "Nuclear localization of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptors in human thyroid tissues." Thyroid **11**(2): 137-145.
- Martin-Nieto, J. and A. Villalobo (1998). "The human epidermal growth factor receptor contains a juxtamembrane calmodulin-binding site." Biochemistry **37**(1): 227-236.
- Masago, K., S. Fujita, et al. (2008). "Clinical significance of pretreatment serum amphiregulin and transforming growth factor- α , and an epidermal growth factor receptor somatic mutation in patients with advanced non-squamous, non-small cell lung cancer." Cancer Sci **99**(11): 2295-2301.
- Masaki, T., K. Igarashi, et al. (2003). "pp60c-src activation in lung adenocarcinoma." Eur J Cancer **39**(10): 1447-1455.
- Mason, S. L., O. Loughran, et al. (2002). "p14(ARF) regulates E2F activity." Oncogene **21**(27): 4220-4230.
- Mendelsohn, J. (1992). "Epidermal growth factor receptor as a target for therapy with antireceptor monoclonal antibodies." J Natl Cancer Inst Monogr(13): 125-131.
- Mendelsohn, J. (2003). "Antibody-mediated EGF receptor blockade as an anticancer therapy: from the laboratory to the clinic." Cancer Immunol Immunother **52**(5): 342-346.
- Mertens, C. and J. E. Darnell, Jr. (2007). "SnapShot: JAK-STAT signaling." Cell **131**(3): 612.

- Meyer, T. and U. Vinkemeier (2004). "Nucleocytoplasmic shuttling of STAT transcription factors." Eur J Biochem **271**(23-24): 4606-4612.
- Mink, S. R., S. Vashistha, et al. (2010). "Cancer-associated fibroblasts derived from EGFR-TKI-resistant tumors reverse EGFR pathway inhibition by EGFR-TKIs." Mol Cancer Res **8**(6): 809-820.
- Miyanaga, A., A. Gemma, et al. (2008). "Antitumor activity of histone deacetylase inhibitors in non-small cell lung cancer cells: development of a molecular predictive model." Mol Cancer Ther **7**(7): 1923-1930.
- Mok, T. S., Y. L. Wu, et al. (2009). "Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma." N Engl J Med **361**(10): 947-957.
- Moore, M. J., D. Goldstein, et al. (2007). "Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group." J Clin Oncol **25**(15): 1960-1966.
- Mori, S., G. Ito, et al. (2004). "p53 apoptotic pathway molecules are frequently and simultaneously altered in nonsmall cell lung carcinoma." Cancer **100**(8): 1673-1682.
- Morinaga, R., I. Okamoto, et al. (2007). "Sequential occurrence of non-small cell and small cell lung cancer with the same EGFR mutation." Lung Cancer **58**(3): 411-413.
- Mounawar, M., A. Mukeria, et al. (2007). "Patterns of EGFR, HER2, TP53, and KRAS mutations of p14arf expression in non-small cell lung cancers in relation to smoking history." Cancer Res **67**(12): 5667-5672.
- Mulloy, R., A. Ferrand, et al. (2007). "Epidermal growth factor receptor mutants from human lung cancers exhibit enhanced catalytic activity and increased sensitivity to gefitinib." Cancer Res **67**(5): 2325-2330.
- Muniz, V. P., J. M. Barnes, et al. (2011). "The ARF tumor suppressor inhibits tumor cell colonization independent of p53 in a novel mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma metastasis." Mol Cancer Res **9**(7): 867-877.
- Musteanu, M., L. Blaas, et al. (2010). "Stat3 is a negative regulator of intestinal tumor progression in Apc(Min) mice." Gastroenterology **138**(3): 1003-1011 e1001-1005
- ## N
- Naoki, K., T. H. Chen, et al. (2002). "Missense mutations of the BRAF gene in human lung adenocarcinoma." Cancer Res **62**(23): 7001-7003.
- Narimatsu, M., H. Maeda, et al. (2001). "Tissue-specific autoregulation of the stat3 gene and its role in interleukin-6-induced survival signals in T cells." Mol Cell Biol **21**(19): 6615-6625.
- Neal, J. W. and L. V. Sequist (2010). "Exciting new targets in lung cancer therapy: ALK, IGF-1R, HDAC, and Hh." Curr Treat Options Oncol **11**(1-2): 36-44.
- Nicholson, K. M. and N. G. Anderson (2002). "The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy." Cell Signal **14**(5): 381-395.

- Nicholson, S. A., N. T. Okby, et al. (2001). "Alterations of p14ARF, p53, and p73 genes involved in the E2F-1-mediated apoptotic pathways in non-small cell lung carcinoma." Cancer Res **61**(14): 5636-5643.
- Niu, G., W. H. Driessen, et al. (2011). "In vivo anti-tumor effect of expressing p14ARF-TAT using a FGF2-targeted cationic lipid vector." Pharm Res **28**(4): 720-730.
- Normand, G., P. G. Hemmati, et al. (2005). "p14ARF induces G2 cell cycle arrest in p53- and p21-deficient cells by down-regulating p34cdc2 kinase activity." J Biol Chem **280**(8): 7118-7130.
- Nyati, M. K., M. A. Morgan, et al. (2006). "Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy." Nat Rev Cancer **6**(11): 876-885.

O

- O'Byrne, K. J., M. I. Koukourakis, et al. (2000). "Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor and angiogenesis in non-small-cell lung cancer." Br J Cancer **82**(8): 1427-1432.
- O'Shea, J. J., Y. Kanno, et al. (2005). "Cell signaling. Stat acetylation--a key facet of cytokine signaling?" Science **307**(5707): 217-218.
- Oh, J. H., H. S. Kim, et al. (2006). "Aberrant methylation of p14ARF gene correlates with poor survival in osteosarcoma." Clin Orthop Relat Res **442**: 216-222.
- Ohtani, T., K. Ishihara, et al. (2000). "Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for STAT3- and SHP2-mediated signals in immune responses." Immunity **12**(1): 95-105.
- Okudela, K., M. Suzuki, et al. (2007). "PIK3CA mutation and amplification in human lung cancer." Pathol Int **57**(10): 664-671.
- Olayioye, M. A., R. M. Neve, et al. (2000). "The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer." EMBO J **19**(13): 3159-3167.
- Olberding, K. E., X. Wang, et al. (2010). "Actinomycin D synergistically enhances the efficacy of the BH3 mimetic ABT-737 by downregulating Mcl-1 expression." Cancer Biol Ther **10**(9): 918-929.
- Onn, A., A. M. Correa, et al. (2004). "Synchronous overexpression of epidermal growth factor receptor and HER2-neu protein is a predictor of poor outcome in patients with stage I non-small cell lung cancer." Clin Cancer Res **10**(1 Pt 1): 136-143.
- Osada, H. and T. Takahashi (2002). "Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer." Oncogene **21**(48): 7421-7434.
- Oxnard, G. R., M. E. Arcila, et al. (2011). "New strategies in overcoming acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in lung cancer." Clin Cancer Res **17**(17): 5530-5537.

P

- Padron, D., M. Sato, et al. (2007). "Epidermal growth factor receptors with tyrosine kinase domain mutations exhibit reduced Cbl association, poor ubiquitylation, and down-regulation but are efficiently internalized." Cancer Res **67**(16): 7695-7702.
- Paez, J. G., P. A. Janne, et al. (2004). "EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy." Science **304**(5676): 1497-1500.
- Paliwal, S., S. Pande, et al. (2006). "Targeting of C-terminal binding protein (CtBP) by ARF results in p53-independent apoptosis." Mol Cell Biol **26**(6): 2360-2372.
- Pang, M., J. Kothapally, et al. (2009). "Inhibition of histone deacetylase activity attenuates renal fibroblast activation and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy." Am J Physiol Renal Physiol **297**(4): F996-F1005.
- Pao, W., V. Miller, et al. (2004). "EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(36): 13306-13311.
- Pao, W., V. A. Miller, et al. (2005). "Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain." PLoS Med **2**(3): e73.
- Pao, W. and J. Chmielecki (2010). "Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer." Nat Rev Cancer **10**(11): 760-774.
- Pao, W. and N. Girard (2011). "New driver mutations in non-small-cell lung cancer." Lancet Oncol **12**(2): 175-180.
- Parisi, T., A. Pollice, et al. (2002). "Transcriptional regulation of the human tumor suppressor p14(ARF) by E2F1, E2F2, E2F3, and Sp1-like factors." Biochem Biophys Res Commun **291**(5): 1138-1145.
- Park, M. J., K. Shimizu, et al. (2003). "Pathogenetic and biologic significance of TP14ARF alterations in nonsmall cell lung carcinoma." Cancer Genet Cytogenet **141**(1): 5-13.
- Park, O. K., T. S. Schaefer, et al. (1996). "In vitro activation of Stat3 by epidermal growth factor receptor kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 13704-13708.
- Parkin, D. M., F. Bray, et al. (2005). "Global cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin **55**(2): 74-108.
- Parra, H. S., R. Cavina, et al. (2004). "Analysis of epidermal growth factor receptor expression as a predictive factor for response to gefitinib ('Iressa', ZD1839) in non-small-cell lung cancer." Br J Cancer **91**(2): 208-212.
- Patel, J. H., Y. Du, et al. (2004). "The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60." Mol Cell Biol **24**(24): 10826-10834.
- Pennock, S. and Z. Wang (2008). "A tale of two Cbls: interplay of c-Cbl and Cbl-b in epidermal growth factor receptor downregulation." Mol Cell Biol **28**(9): 3020-3037.

- Perez-Soler, R. (2004). "The role of erlotinib (Tarceva, OSI 774) in the treatment of non-small cell lung cancer." Clin Cancer Res **10**(12 Pt 2): 4238s-4240s.
- Perez-Soler, R. (2007). "Erlotinib: recent clinical results and ongoing studies in non small cell lung cancer." Clin Cancer Res **13**(15 Pt 2): s4589-4592.
- Peto, R., S. Darby, et al. (2000). "Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies." BMJ **321**(7257): 323-329.
- Pham, L., B. Kaiser, et al. (2011). "HDAC3 and HDAC7 have opposite effects on osteoclast differentiation." J Biol Chem **286**(14): 12056-12065.
- Pimkina, J., O. Humbey, et al. (2009). "ARF induces autophagy by virtue of interaction with Bcl-xL." J Biol Chem. **284**(5):2803-10.
- Politi, K., M. F. Zakowski, et al. (2006). "Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGF receptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors." Genes Dev **20**(11): 1496-1510.
- Politi, K., P. D. Fan, et al. (2010). "Erlotinib resistance in mouse models of epidermal growth factor receptor-induced lung adenocarcinoma." Dis Model Mech **3**(1-2): 111-119.
- Pollice, A., V. Nasti, et al. (2004). "Functional and physical interaction of the human ARF tumor suppressor with Tat-binding protein-1." J Biol Chem **279**(8): 6345-6353.
- Pollice, A., M. Sepe, et al. (2007). "TBP-1 protects the human oncosuppressor p14ARF from proteasomal degradation." Oncogene **26**(35): 5154-5162.
- Psyrris, A., Z. Yu, et al. (2005). "Quantitative determination of nuclear and cytoplasmic epidermal growth factor receptor expression in oropharyngeal squamous cell cancer by using automated quantitative analysis." Clin Cancer Res **11**(16): 5856-5862.

Q

- Qi, Y., M. A. Gregory, et al. (2004). "p19ARF directly and differentially controls the functions of c-Myc independently of p53." Nature **431**(7009): 712-717.
- Quelle, D. E., F. Zindy, et al. (1995). "Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest." Cell **83**(6): 993-1000.

R

- Ramalingam, S. S., C. P. Belani, et al. (2009). "Phase II study of belinostat (PXD101), a histone deacetylase inhibitor, for second line therapy of advanced malignant pleural mesothelioma." J Thorac Oncol **4**(1): 97-101.
- Rapport-EMeA (Juillet 2009). <http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/iressa/iressa.htm>.
Iressa - European Public Assessment Report.
- Rauch, D. A., M. A. Hurchla, et al. (2010). "The ARF tumor suppressor regulates bone remodeling and osteosarcoma development in mice." PLoS One **5**(12): e15755.

- Reck, M. and L. Crino (2009). "Advances in anti-VEGF and anti-EGFR therapy for advanced non-small cell lung cancer." Lung Cancer **63**(1): 1-9.
- Reef, S., E. Zalckvar, et al. (2006). "A short mitochondrial form of p19ARF induces autophagy and caspase-independent cell death." Mol Cell **22**(4): 463-475.
- Ricciardi, S., S. Tomao, F. de Marinis (2009). "Pemetrexed as first-line therapy for non-squamous non-small cell lung cancer". Ther Clin Risk Manag. **5**:781-7.
- Riely, G. J., K. A. Politi, et al. (2006). "Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer." Clin Cancer Res **12**(24): 7232-7241.
- Riely, G. J., M. G. Kris, et al. (2008). "Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma." Clin Cancer Res **14**(18): 5731-5734
- Risch, A. and C. Plass (2008). "Lung cancer epigenetics and genetics." Int J Cancer **123**(1): 1-7.
- Rizos, H., A. P. Darmanian, et al. (2000). "Two arginine rich domains in the p14ARF tumour suppressor mediate nucleolar localization." Oncogene **19**(26): 2978-2985.
- Rizos, H., H. A. McKenzie, et al. (2006). "Physical and functional interaction of the p14ARF tumor suppressor with ribosomes." J Biol Chem **281**(49): 38080-38088.
- Rocha, S., M. D. Garrett, et al. (2005). "Regulation of NF-kappaB and p53 through activation of ATR and Chk1 by the ARF tumour suppressor." EMBO J **24**(6): 1157-1169.
- Rodriguez-Nieto, S. and M. Sanchez-Cespedes (2009). "BRG1 and LKB1: tales of two tumor suppressor genes on chromosome 19p and lung cancer." Carcinogenesis **30**(4): 547-554.
- Rodway, H., S. Llanos, et al. (2004). "Stability of nucleolar versus non-nucleolar forms of human p14(ARF)." Oncogene **23**(37): 6186-6192.
- Rosell, R., M. Taron, et al. (2006). "Epidermal growth factor receptor activation: how exon 19 and 21 mutations changed our understanding of the pathway." Clin Cancer Res **12**(24): 7222-7231.
- Ross, J. S., E. A. Slodkowska, et al. (2009). "The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine." Oncologist **14**(4): 320-368.
- Rowland, B. D., S. G. Denissov, et al. (2002). "E2F transcriptional repressor complexes are critical downstream targets of p19(ARF)/p53-induced proliferative arrest." Cancer Cell **2**(1): 55-65.
- Rusch, V., J. Baselga, 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.
- Rusch, V., D. Klimstra, et al. (1997). "Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression." Clin Cancer Res **3**(4): 515-522.

S

- Samuels, Y., Z. Wang, et al. (2004). "High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers." Science **304**(5670): 554.

- Samuels, Y. and T. Waldman (2010). "Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers." Curr Top Microbiol Immunol **347**: 21-41.
- Sanchez-Cespedes, M., A. L. Reed, et al. (1999). "Inactivation of the INK4A/ARF locus frequently coexists with TP53 mutations in non-small cell lung cancer." Oncogene **18**(43): 5843-5849
- Sanchez-Cespedes, M. (2003). "Dissecting the genetic alterations involved in lung carcinogenesis." Lung Cancer **40**(2): 111-121..
- Sanchez-Serrano, I. (2006). "Success in translational research: lessons from the development of bortezomib." Nat Rev Drug Discov **5**(2): 107-114.
- Sanders, H. R. and M. Albitar (2010). "Somatic mutations of signaling genes in non-small-cell lung cancer." Cancer Genet Cytogenet **203**(1): 7-15.
- Sapountzi, V., I. R. Logan, et al. (2006). "Cellular functions of TIP60." Int J Biochem Cell Biol **38**(9): 1496-1509.
- Sasaki, H., O. Kawano, et al. (2006). "Uncommon V599E BRAF mutations in Japanese patients with lung cancer." J Surg Res **133**(2): 203-206
- Sasaki, H., K. Okuda, et al. (2008). "AKT1 and AKT2 mutations in lung cancer in a Japanese population." Mol Med Report **1**(5): 663-666.
- Sasaoka, T., W. J. Langlois, et al. (1994). "The signaling pathway coupling epidermal growth factor receptors to activation of p21ras." J Biol Chem **269**(51): 32621-32625.
- Sato, J. D., T. Kawamoto, et al. (1983). "Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors." Mol Biol Med **1**(5): 511-529.
- Sato, M., Y. Horio, et al. (2002). "The expression of DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins is not associated with the methylation status of p14(ARF), p16(INK4a) and RASSF1A in human lung cancer cell lines." Oncogene **21**(31): 4822-4829.
- Schiller, J. H., D. Harrington, et al. (2002). "Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer." N Engl J Med **346**(2): 92-98.
- Schneller, D., G. Machat, et al. (2011). "p19(ARF) /p14(ARF) controls oncogenic functions of signal transducer and activator of transcription 3 in hepatocellular carcinoma." Hepatology **54**(1): 164-172.
- Sculier, J. P. and D. Moro-Sibilot (2009). "First- and second-line therapy for advanced nonsmall cell lung cancer." Eur Respir J **33**(4): 915-930.
- Sebastian, S., J. Settleman, et al. (2006). "The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: from expression to turnover." Biochim Biophys Acta **1766**(1): 120-139.
- Sekido, Y., K. M. Fong, et al. (2003). "Molecular genetics of lung cancer." Annu Rev Med **54**: 73-87.
- Selvaggi, G., S. Novello, et al. (2004). "Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer." Ann Oncol **15**(1): 28-32.
- Sequist, L. V., R. G. Martins, et al. (2008). "First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations." J Clin Oncol **26**(15): 2442-2449.

- Sequist, L. V., B. A. Waltman, et al. (2011). "Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors." Sci Transl Med **3**(75): 75ra26.
- Sharma, M., M. Zarnegar, et al. (2000). "Androgen receptor interacts with a novel MYST protein, HBO1." J Biol Chem **275**(45): 35200-35208.
- Sharma, S. V., M. A. Fischbach, et al. (2006). "'Oncogenic shock': explaining oncogene addiction through differential signal attenuation." Clin Cancer Res **12**(14 Pt 2): 4392s-4395s.
- Sharma, S. V., D. W. Bell, et al. (2007). "Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer." Nat Rev Cancer **7**(3): 169-181.
- Sharpless, N. E. (2004). "Ink4a/Arf links senescence and aging." Exp Gerontol **39**(11-12): 1751-1759.
- Sharpless, N. E. (2005). "INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus." Mutat Res **576**(1-2): 22-38.
- She, Q. B., D. Solit, et al. (2003). "Resistance to gefitinib in PTEN-null HER-overexpressing tumor cells can be overcome through restoration of PTEN function or pharmacologic modulation of constitutive phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway signaling." Clin Cancer Res **9**(12): 4340-4346.
- Shepherd, F. A., J. Rodrigues Pereira, et al. (2005). "Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer." N Engl J Med **353**(2): 123-132.
- Sherr, C. J. (2006). "Divorcing ARF and p53: an unsettled case." Nat Rev Cancer **6**(9): 663-673.
- Shields, P. G., G. X. Xu, et al. (1995). "Mutagens from heated Chinese and U.S. cooking oils." J Natl Cancer Inst **87**(11): 836-841.
- Shigematsu, H., L. Lin, et al. (2005). "Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers." J Natl Cancer Inst **97**(5): 339-346.
- Shigematsu, H. and A. F. Gazdar (2006). "Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers." Int J Cancer **118**(2): 257-262.
- Shtiegman, K., B. S. Kochupurakkal, et al. (2007). "Defective ubiquitinylation of EGFR mutants of lung cancer confers prolonged signaling." Oncogene **26**(49): 6968-6978.
- Shuai, K. and B. Liu (2003). "Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system." Nat Rev Immunol **3**(11): 900-911.
- Silva, J., G. Dominguez, et al. (2001). "Analysis of genetic and epigenetic processes that influence p14ARF expression in breast cancer." Oncogene **20**(33): 4586-4590.
- Silva, J., J. M. Silva, et al. (2003). "Concomitant expression of p16INK4a and p14ARF in primary breast cancer and analysis of inactivation mechanisms." J Pathol **199**(3): 289-297.
- Silva, J., J. M. Garcia, et al. (2006). "Implication of polycomb members Bmi-1, Me1-18, and Hpc-2 in the regulation of p16INK4a, p14ARF, h-TERT, and c-Myc expression in primary breast carcinomas." Clin Cancer Res **12**(23): 6929-6936.
- Soda, M., Y. L. Choi, et al. (2007). "Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer." Nature **448**(7153): 561-566.

- Sordella, R., D. W. Bell, et al. (2004). "Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways." Science **305**(5687): 1163-1167.
- Soria, J. C., H. Y. Lee, et al. (2002). "Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation." Clin Cancer Res **8**(5): 1178-1184.
- Sos, M. L., M. Koker, et al. (2009). "PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR." Cancer Res **69**(8): 3256-3261.
- Souquet, P. J., F. Chauvin, et al. (1993). "Polychemotherapy in advanced non small cell lung cancer: a meta-analysis." Lancet **342**(8862): 19-21.
- Sozzi, G., M. L. Veronese, et al. (1996). "The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer." Cell **85**(1): 17-26.
- Stephens, P., C. Hunter, et al. (2004). "Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours." Nature **431**(7008): 525-526.
- Stinchcombe, T. E. and M. A. Socinski (2009). "Current treatments for advanced stage non-small cell lung cancer." Proc Am Thorac Soc **6**(2): 233-241.
- Sugimoto, M., M. L. Kuo, et al. (2003). "Nucleolar Arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing." Mol Cell **11**(2): 415-424.
- Sun, S., J. H. Schiller, et al. (2007). "Lung cancer in never smokers--a different disease." Nat Rev Cancer **7**(10): 778-790.
- T**
- Tago, K., S. Chiocca, et al. (2005). "Sumoylation induced by the Arf tumor suppressor: a p53-independent function." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(21): 7689-7694.
- Tahara, T., T. Shibata, et al. (2010). "CpG island promoter methylation (CIHM) status of tumor suppressor genes correlates with morphological appearances of gastric cancer." Anticancer Res **30**(1): 239-244.
- Takano, T., Y. Ohe, et al. (2005). "Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol **23**(28): 6829-6837.
- Tam, I. Y., E. L. Leung, et al. (2009). "Double EGFR mutants containing rare EGFR mutant types show reduced in vitro response to gefitinib compared with common activating missense mutations." Mol Cancer Ther **8**(8): 2142-2151.
- Tanaka, H., K. Yanagisawa, et al. (2007). "Lineage-specific dependency of lung adenocarcinomas on the lung development regulator TTF-1." Cancer Res **67**(13): 6007-6011.
- Tang, X., M. Varella-Garcia, et al. (2008). "Epidermal growth factor receptor abnormalities in the pathogenesis and progression of lung adenocarcinomas." Cancer Prev Res (Phila) **1**(3): 192-200.
- Tassinari, D., S. Sartori, et al. (2011). "Bevacizumab in the treatment of advanced, non-squamous non-small cell lung cancer: an evidence-based approach." Oncology **80**(5-6): 350-358.

- Tatematsu, A., J. Shimizu, et al. (2008). "Epidermal growth factor receptor mutations in small cell lung cancer." Clin Cancer Res **14**(19): 6092-6096.
- Taubert, S., C. Gorrini, et al. (2004). "E2F-dependent histone acetylation and recruitment of the Tip60 acetyltransferase complex to chromatin in late G1." Mol Cell Biol **24**(10): 4546-4556.
- ten Hoeve, J., M. de Jesus Ibarra-Sanchez, et al. (2002). "Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase." Mol Cell Biol **22**(16): 5662-5668.
- Tergaonkar, V., M. Pando, et al. (2002). "p53 stabilization is decreased upon NFkappaB activation: a role for NFkappaB in acquisition of resistance to chemotherapy." Cancer Cell **1**(5): 493-503.
- Tervahauta, A., S. Syrjanen, et al. (1994). "Epidermal growth factor receptor, c-erbB-2 proto-oncogene and estrogen receptor expression in human papillomavirus lesions of the uterine cervix." Int J Gynecol Pathol **13**(3): 234-240.
- Testa, J. R. and J. M. Siegfried (1992). "Chromosome abnormalities in human non-small cell lung cancer." Cancer Res **52**(9 Suppl): 2702s-2706s.
- Thiberville, L. and C. Paris (2004). Epidémiologie et facteurs de risque des cancers bronchiques primitifs. EMC-pneumologie; 1 (1):7-18.
- Tiseo, M., F. Gelsomino, et al. (2011). "EGFR and EML4-ALK gene mutations in NSCLC: a case report of erlotinib-resistant patient with both concomitant mutations." Lung Cancer **71**(2): 241-243.
- Tracy, S., T. Mukohara, et al. (2004). "Gefitinib induces apoptosis in the EGFR L858R non-small-cell lung cancer cell line H3255." Cancer Res **64**(20): 7241-7244.
- Travis, W. D., L. B. Travis, et al. (1995). "Lung cancer." Cancer **75**(1 Suppl): 191-202.
- Tsao, M. S., A. Sakurada, et al. (2005). "Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome." N Engl J Med **353**(2): 133-144.
- Tsujimoto, H., A. Hagiwara, et al. (2002). "Promoter methylations of p16INK4a and p14ARF genes in early and advanced gastric cancer. Correlations of the modes of their occurrence with histologic type." Pathol Res Pract **198**(12): 785-794.
- Turke, A. B., K. Zejnullahu, et al. (2010). "Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC." Cancer Cell **17**(1): 77-88.

U

- Uramoto, H., T. Iwata, et al. (2010). "Epithelial-mesenchymal transition in EGFR-TKI acquired resistant lung adenocarcinoma." Anticancer Res **30**(7): 2513-2517.
- Ushiro, H. and S. Cohen (1980). "Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes." J Biol Chem **255**(18): 8363-8365.

V

- Vaillancourt, R. R., A. M. Gardner, et al. (1994). "B-Raf-dependent regulation of the MEK-1/mitogen-activated protein kinase pathway in PC12 cells and regulation by cyclic AMP." Mol Cell Biol **14**(10): 6522-6530.

- van Delft, M. F., A. H. Wei, et al. (2006). "The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized." Cancer Cell **10**(5): 389-399.
- Vaskivuo, L., J. Rysa, et al. (2006). "Azidothymidine and cisplatin increase p14ARF expression in OVCAR-3 ovarian cancer cell line." Toxicol Appl Pharmacol **216**(1): 89-97.
- Veale, D., T. Ashcroft, et al. (1987). "Epidermal growth factor receptors in non-small cell lung cancer." Br J Cancer **55**(5): 513-516.
- Vignot, S. and B. Besse (2007). "[Gemcitabine and non small-cell lung cancer]." Bull Cancer **94 Spec No Actualites**: S95-103.
- Vonlanthen, S., J. Heighway, et al. (2001). "The bmi-1 oncoprotein is differentially expressed in non-small cell lung cancer and correlates with INK4A-ARF locus expression." Br J Cancer **84**(10): 1372-1376.

W

- Wakeling, A. E., S. P. Guy, et al. (2002). "ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy." Cancer Res **62**(20): 5749-5754.
- Wang, Q., W. L. Li, et al. (2009). "Oncoprotein BMI-1 induces the malignant transformation of HaCaT cells." J Cell Biochem **106**(1): 16-24.
- Wang, Z., D. Shen, et al. (2004). "Mutational analysis of the tyrosine phosphatome in colorectal cancers." Science **304**(5674): 1164-1166.
- Weber, A., C. Wittekind, et al. (2003). "Genetic and epigenetic alterations of 9p21 gene products in benign and malignant tumors of the head and neck." Pathol Res Pract **199**(6): 391-397.
- Weber, H. O., T. Samuel, et al. (2002). "Human p14(ARF)-mediated cell cycle arrest strictly depends on intact p53 signaling pathways." Oncogene **21**(20): 3207-3212.
- Webster, G. A. and N. D. Perkins (1999). "Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53." Mol Cell Biol **19**(5): 3485-3495.
- Weinstein, I. B. (2002). "Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer." Science **297**(5578): 63-64.
- Wesarg, E., S. Hoffarth, et al. (2007). "Targeting BCL-2 family proteins to overcome drug resistance in non-small cell lung cancer." Int J Cancer **121**(11): 2387-2394.
- Williams, M. D. and A. B. Sandler (2001). "The epidemiology of lung cancer." Cancer Treat Res **105**: 31-52.
- Wu, J. Y., C. J. Yu, et al. (2011). "Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors on "uncommon" epidermal growth factor receptor mutations of unknown clinical significance in non-small cell lung cancer." Clin Cancer Res **17**(11): 3812-3821.

X

- Xiao, H., J. Chung, et al. (2003). "Tip60 is a co-repressor for STAT3." J Biol Chem **278**(13): 11197-11204.
- Xirodimas, D. P., J. Chisholm, et al. (2002). "P14ARF promotes accumulation of SUMO-1 conjugated (H)Mdm2." FEBS Lett **528**(1-3): 207-211.
- Xu, C. R., S. Lee, et al. (2009). "Bmi1 functions as an oncogene independent of Ink4A/Arf repression in hepatic carcinogenesis." Mol Cancer Res **7**(12): 1937-1945.

Y

- Yamamoto, C., Y. Basaki, et al. (2010). "Loss of PTEN expression by blocking nuclear translocation of EGR1 in gefitinib-resistant lung cancer cells harboring epidermal growth factor receptor-activating mutations." Cancer Res **70**(21): 8715-8725.
- Yamamoto, H., H. Shigematsu, et al. (2008). "PIK3CA mutations and copy number gains in human lung cancers." Cancer Res **68**(17): 6913-6921.
- Yamamoto, H., S. Toyooka, et al. (2009). "Impact of EGFR mutation analysis in non-small cell lung cancer." Lung Cancer **63**(3): 315-321.
- Yang, C. H., C. J. Yu, et al. (2008). "Specific EGFR mutations predict treatment outcome of stage IIIB/IV patients with chemotherapy-naive non-small-cell lung cancer receiving first-line gefitinib monotherapy." J Clin Oncol **26**(16): 2745-2753.
- Yang, S. C., S. N. Jenq, et al. (2000). "Identification of benzo[a]pyrene 7,8-diol 9,10-epoxide N2-deoxyguanosine in human lung adenocarcinoma cells exposed to cooking oil fumes from frying fish under domestic conditions." Chem Res Toxicol **13**(10): 1046-1050.
- Yang, S., S. Qu, et al. (2006). "Association with HSP90 inhibits Cbl-mediated down-regulation of mutant epidermal growth factor receptors." Cancer Res **66**(14): 6990-6997.
- Yano, S., W. Wang, et al. (2008). "Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations." Cancer Res **68**(22): 9479-9487.
- Yi, E. S., D. Harclerode, et al. (1997). "High c-erbB-3 protein expression is associated with shorter survival in advanced non-small cell lung carcinomas." Mod Pathol **10**(2): 142-148.
- Yuan, A., C. J. Yu, et al. (2000). "Correlation of total VEGF mRNA and protein expression with histologic type, tumor angiogenesis, patient survival and timing of relapse in non-small-cell lung cancer." Int J Cancer **89**(6): 475-483.
- Yuan, Z. L., Y. J. Guan, et al. (2005). "Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue." Science **307**(5707): 269-273.

Z

- Zakowski, M. F., M. Ladanyi, et al. (2006). "EGFR mutations in small-cell lung cancers in patients who have never smoked." N Engl J Med **355**(2): 213-215.

- Zhang, G. C., J. Y. Lin, et al. (2007). "Epidermal growth factor receptor double activating mutations involving both exons 19 and 21 exist in Chinese non-small cell lung cancer patients." Clin Oncol (R Coll Radiol) **19**(7): 499-506.
- Zhang, H. J., W. J. Li, et al. (2010). "p14ARF interacts with E2F factors to form p14ARF-E2F/partner-DNA complexes repressing E2F-dependent transcription." J Cell Biochem **109**(4): 693-701.
- Zhang, W., J. Zhu, et al. (2010). "Comparison of the inhibitory effects of three transcriptional variants of CDKN2A in human lung cancer cell line A549." J Exp Clin Cancer Res **29**: 74.
- Zhang, X., J. Gureasko, et al. (2006). "An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor." Cell **125**(6): 1137-1149.
- Zhang, X., A. Guo, et al. (2007). "Identification of STAT3 as a substrate of receptor protein tyrosine phosphatase T." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(10): 4060-4064.
- Zhang, Y., Y. Xiong, et al. (1998). "ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways." Cell **92**(6):725-34.
- Zhang, Y., E. M. Sturgis, et al. (2011). "p14ARF genetic polymorphisms and susceptibility to second primary malignancy in patients with index squamous cell carcinoma of the head and neck." Cancer **117**(6): 1227-1235.
- Zhao, Z. H., S. F. Wang, et al. (2008). "Overexpression of Pokemon in non-small cell lung cancer and foreshowing tumor biological behavior as well as clinical results." Lung Cancer **62**(1): 113-119.
- Zhong, Y., S. G. Carmella, et al. (2011). "Immediate consequences of cigarette smoking: rapid formation of polycyclic aromatic hydrocarbon diol epoxides." Chem Res Toxicol **24**(2): 246-252.
- Zhou, C., Y. L. Wu, et al. (2011). "Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study." Lancet Oncol **12**(8): 735-742.
- Zochbauer-Muller, S., K. M. Fong, et al. (2001). "Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers." Cancer Res **61**(1): 249-255.
- Zochbauer-Muller, S., A. F. Gazdar, et al. (2002). "Molecular pathogenesis of lung cancer." Annu Rev Physiol **64**: 681-708.

Contrôle de la signalisation oncogénique du mutant L858R de l'EGFR par la protéine suppresseur de tumeur p14^{ARF} dans les adénocarcinomes pulmonaires.

Le récepteur à l'EGF (**EGFR**) est un oncogène puissant impliqué dans le développement des cancers du poumon. Dans ces cancers, la présence de mutations activatrices de l'EGFR (majoritairement **L858R** et **Del19**) est un facteur prédictif de réponse aux agents pharmacologiques qui ciblent spécifiquement ce récepteur (**EGFR-TKI**). Cependant, l'association entre réponse thérapeutique et mutation est plus complexe que prévue, soulignant la nécessité d'approfondir la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de ces cancers. Nous avons précédemment montré que la quasi-totalité des tumeurs pulmonaires avec des mutations activatrices de l'EGFR présente une expression faible ou indétectable de la protéine suppressive de tumeur **p14^{ARF}**. Ces résultats nous ont conduites à émettre l'hypothèse que l'expression de **p14^{ARF}** était un frein essentiel à l'expansion clonale de ces cellules.

Nous décrivons pour la première fois une relation fonctionnelle entre **p14^{ARF}** et du mutant **L858R** de l'EGFR dans laquelle **p14^{ARF}** inhibe la croissance de cellules exprimant ce mutant en induisant leur apoptose. Les effets suppresseurs de tumeur de **p14^{ARF}** impliquent une fonction pro-apoptotique originale de **STAT3** qui conduit à l'inhibition de l'expression de la protéine anti-apoptotique **Bcl-2**. De plus, nous montrons que les cellules **EGFR-L858R** maintiennent leur avantage de croissance en inhibant l'expression de **p14^{ARF}** et la signalisation pro-apoptotique **STAT3/Bcl-2** qui en découle. Nos résultats identifient également **p14^{ARF}** comme une nouvelle cible transcriptionnelle de **STAT3**, mettant ainsi en évidence une boucle de rétrocontrôle positif entre ces deux protéines qui pourrait entretenir la signalisation pro-apoptotique médiée par **STAT3**. Sur la base de ces résultats, nous suggérons que la réactivation de la voie **p14^{ARF}/STAT3/Bcl-2** pourrait être une nouvelle stratégie thérapeutique dans le traitement de ces cancers.

Control of EGFR-L858R oncogenic signaling pathway by the p14^{ARF} tumor suppressor in lung adenocarcinoma.

The EGF receptor (**EGFR**) is a strong oncogene involved in lung carcinogenesis. In these cancers, sensitivity to inhibitors of the EGFR tyrosine kinase activity (**EGFR-TKI**) has been shown to be related to the presence of activating mutations in the TK domain of EGFR (mainly **L858R** and **Del19**). However, the association between mutations and responsiveness to **EGFR-TKI** based treatment is more complex than previously envisioned, underlying the pressing need to study thoroughly the molecular mechanisms of lung cancer growth. We previously showed that almost all lung cancer with **EGFR** activated mutations has very low or undetectable levels of the **p14^{ARF}** tumor suppressor protein. These results led us to postulate that expression of **p14^{ARF}** is an efficient break against clonal proliferation of these cells.

We report for the first time a relationship between **p14^{ARF}** and mutant **EGFR-L858R** in which **p14^{ARF}** inhibits the growth of **EGFR-L858R** expressing cells by inducing apoptosis. The **p14^{ARF}** tumor suppressor effects involve an original **STAT3 pro-apoptotic** function that drives the inhibition of the anti-apoptotic **Bcl-2** protein. Moreover, we show that the **EGFR-L858R** mutant maintains their survival and proliferation characteristics by inhibiting **p14^{ARF}** expression and consequently the **STAT3/Bcl-2** pro-apoptotic pathway. Our results also identify **p14^{ARF}** as a new transcriptional target of **STAT3**, therefore providing evidence of a positive feed-back loop that could maintain **STAT3** pro-apoptotic pathway. Based on these data, we suggest that manipulation of this pathway could be a therapeutic strategy for lung cancer treatment.